

2 m 11. 34.94.1

Université de Montréal

Glucotoxicité cellulaire comme modèle de vieillissement du récepteur du
facteur de libération de l'hormone de croissance

par
Karine Bédard

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

Août 2006
© Karine Bédard, 2006



(1)
4
058
2007
v.045

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 :

Glucotoxicité cellulaire comme modèle de vieillissement du récepteur du
facteur de libération de l'hormone de croissance

Présenté par:
Karine Bédard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

D^r Jean-Louis Chiasson : Président rapporteur
D^r Réjean Couture : Membre du jury
D^r Pierrette Gaudreau : Directrice de recherche

I. Résumé et mots clés français

Au cours du vieillissement et du diabète de type 1 survient une diminution de la sécrétion d'hormone de croissance (GH), associée à une perte de sensibilité des cellules somatotropes au facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH). Les niveaux d'ARNm du récepteur hypophysaire du GHRH (GHRH-R) subissent également des perturbations similaires chez le rat vieillissant ou atteint d'un diabète de type 1. Une augmentation de la glycémie est observée chez le rat âgé suggérant qu'une glucotoxicité modérée prolongée puisse engendrer des effets délétères sur le GHRH-R, *via* un état de stress oxydatif chronique, tel que dans l'hypophyse antérieure de rat diabétique.

L'objectif principal du présent projet était de déterminer les effets de la glucotoxicité sur le GHRH-R, dans les cellules d'hypophyse antérieure de rats. Des cellules hypophysaires ont été cultivées en présence de différentes concentrations de glucose, soit 6, 12 et 33 mM, correspondants à la glycémie retrouvée chez les rats jeunes, âgés et diabétiques de type 1, respectivement. Une quantification de la lipoperoxydation membranaire a montré une augmentation rapide et importante du stress oxydatif en présence de 12 et 33 mM D-glucose. Des changements significatifs des niveaux d'ARNm du GHRH-R ont été observés suite à une exposition de 24 et 48 h en présence de 12 et 33 mM de D-glucose. La fonctionnalité de GHRH-R a également été affectée par la glucotoxicité puisque des modifications de la capacité d'internalisation du GHRH-R et de la production d'AMPc, stimulée par le GHRH ont été observées.

Une étude complémentaire de régulation génique a été effectuée dans l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus de rats âgés, soumis à la restriction calorique modérée de longue durée (RCMLD) ou nourris *ad libitum*. Sachant que la RCMLD est la stratégie la plus efficace pour prévenir ou retarder les effets du vieillissement, cette étude nous a permis d'identifier certains

mécanismes impliqués dans le maintien de la fonction somatotrope, particulièrement du GHRH-R, en lien avec le contrôle du stress oxydatif.

Mots clés : GHRH-R, Hypophyse, Glucotoxicité, Stress oxydatif, Restriction calorique modérée de longue durée, Vieillesse, Diabète de type 1.

II. RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS ANGLAIS

Aging and type 1 diabetes are characterized by a decrease of growth hormone (GH) secretion, related to a loss of somatotroph sensitivity to growth hormone-releasing hormone (GHRH). Similar alterations of the GHRH receptor (GHRH-R) mRNA level occur in the anterior pituitary of aged and type 1 diabetic rats. An increase of glycemia is observed in aged rats suggesting that long-term moderate glucotoxicity could cause deleterious effects to the GHRH-R, through chronic oxidative stress, as in the diabetic rat.

The main objective of this project was to determine the effects of glucotoxicity on the GHRH-R in rat anterior pituitary cells. Pituitary cells were cultured in the presence of 6, 12 or 33 mM of D-glucose, corresponding to glycemia found in young rats, aged rats and type 1 diabetics rats, respectively. Quantification of membrane lipoperoxidation showed a rapid and high increase of oxidative stress in the presence of 12 and 33 mM of D-glucose. Significant changes in GHRH-R mRNA transcript levels were observed after a 24- and 48 h-incubation period in 12 or 33 mM of D-glucose. GHRH-R functionality was also affected by glucotoxicity as modifications of GHRH-R internalization capacity and GHRH-induced cAMP production were observed. A complementary gene array study was performed in the anterior pituitary and hypothalamus of aged rats, submitted either to long-term moderate caloric restriction (RCMLD) or fed *ad libitum*. Knowing that RCMLD is the most efficient strategy to prevent or delay aging effects, this study allowed the identification of some of the mechanisms involved in the maintenance of the somatotroph axis functionality, particularly the GHRH-R, in link with oxidative stress regulation.

Keywords : GHRH-R, Anterior pituitary, Glucotoxicity, Oxidative stress, Long-term moderate caloric restriction, Aging, Type 1 diabetes.

III. TABLE DES MATIÈRES

I.	Résumé et mots clés français	i
II.	Résumé et mots clés anglais	iii
III.	Table des matières	iv
IV.	Liste des figures.....	viii
V.	Liste des tableaux	xi
VI.	Liste des abréviations	xii
VII.	Remerciements	xvii
VIII.	Dédicace	xix
1.	INTRODUCTION	1
1.1.	LE FACTEUR DE LIBÉRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE ...	2
1.1.1.	Structure du facteur de libération de l'hormone de croissance ...	2
1.1.2.	Structure du gène du facteur de libération de l'hormone de croissance	4
1.1.3.	Localisation du facteur de libération de l'hormone de croissance	5
1.1.4.	Rôles du facteur de libération de l'hormone de croissance	6
1.1.4.1.	Stimulation de la synthèse et de la sécrétion de l'hormone de croissance.....	6
1.1.4.2.	Prolifération et différenciation cellulaire	9
1.1.4.3.	Contrôle de l'appétit	10
1.1.4.4.	Contrôle du sommeil	11
1.1.5.	Régulation de l'expression du facteur de libération de l'hormone de croissance	11

1.2.	LE RÉCEPTEUR DU FACTEUR DE LIBÉRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE	12
1.2.1.	Structure et isoformes du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance	12
1.2.2.	Structure du gène du GHRH-R	16
1.2.3.	Localisation du GHRH-R	17
1.2.4.	Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du GHRH-R	19
1.2.5.	Voies de signalisation du GHRH-R	20
1.2.5.1.	La voie adénylate cyclase-AMPc-protéine kinase A	22
1.2.5.2.	La voie des phosphatidylinositols/diacylglycérol/ protéine kinase C	23
1.2.5.3.	La voie des MAPK	24
1.2.6.	Régulation de l'expression du GHRH-R	24
1.2.6.1.	GHRH et IGF-1	25
1.2.6.2.	Les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes	26
1.2.6.3.	Conditions physiologiques et pathologiques	27
1.3.	GLUCOTOXICITÉ CELLULAIRE	29
1.3.1.	Définition de la glucotoxicité	29
1.3.2.	Mécanismes de la glucotoxicité	30
1.3.2.1.	Voie du Polyol	30
1.3.2.2.	Formation des AGEs	32
1.3.2.3.	Activation de la protéine kinase C	32
1.3.2.4.	Voie des hexosamines	33
1.3.3.	Définition et mécanismes du stress oxydatif	33

1.3.4.	Conséquences du stress oxydatif	35
1.3.4.1.	Peroxydation des lipides	35
1.3.4.2.	Oxydation des protéines	35
1.3.4.3.	Dommmages à l'ADN	36
1.3.4.4.	Dommmages aux polysaccharides	36
1.4.	STRATÉGIES NUTRITIONNELLES	37
1.4.1.	Restriction calorique modérée de longue durée	37
1.4.2.	Alimentation riche en antioxydants	41
1.4.2.1.	Les vitamines	41
1.4.2.2.	Les minéraux	43
1.4.2.3.	Les phytonutriments	44
2.	JUSTIFICATION DE L'ÉTUDE	47
3.	MANUSCRITS	50
3.1.	Strecko J*, Bédard K* , Theriault K, Boisvert C, Veyrat-Durebex C, Hoa S, Gaudreau P. Regulation of the growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocin-diabetic rats: <i>in vitro</i> evidence for a direct effect of glucotoxicity	51
3.2.	Annexe 1 : Résultats non-inclus dans le manuscrit 3.1	120
3.3.	Bédard J*, Bédard K* , Ferland G, Fulop T, Jacques D, Khalil A, Veyrat-Durebex C, Wagner R, Gaudreau P. Effects of aging and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus	125
4.	DISCUSSION	147
4.1.	Niveaux d'ARNm du GHRH-R dans les cellules hypophysaires en situation de glucotoxicité et présence de stress oxydatif	149
4.2.	Effets de la glucotoxicité sur la fonctionnalité du GHRH-R	153

4.3.	Effets du vieillissement et de la restriction calorique de longue durée sur la modulation de gènes impliqués dans la fonction somatotrope	157
4.4.	Effets du vieillissement et de la restriction calorique de longue durée sur la modulation de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif	159
5.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	163
6.	BIBLIOGRAPHIE	167
7.	ANNEXE 2 : Autorisations des co-auteurs à l'utilisation des articles dans le mémoire de maîtrise	203

I. LISTE DES FIGURES

1. INTRODUCTION

Figure 1	Régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance dans la cellule somatotrope	7
Figure 2	Représentation schématique du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat	14
Figure 3	Voies de signalisation impliquées dans la réponse au GHRH dans l'hypophyse antérieure	21
Figure 4	Mécanismes impliqués dans la glucotoxicité cellulaire	31

2. MANUSCRITS

2.1.	Regulation of the growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocin-diabetic rats: <i>in vitro</i> evidence for a direct effect of glucotoxicity	51
------	--	----

Figure 1	Levels of GHRH-R mRNA transcripts in the anterior pituitary of control (C) and STZ-diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration	100
Figure 2	Levels 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	102
Figure 3	Levels of ¹²⁵ I-GHRH-GHRH-R complexes in anterior pituitary homogenates of control (C) and diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration	104
Figure 4	Levels of ¹²⁵ I-GHRH-GHRH-R complex in semi-purified thin limb Henle's loop cells of control (C) and diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration.	106

Figure 5	Effect of deglycosylation on the level of ^{125}I -GHRH-GHRH-R complexes in anterior pituitary homogenates and semi-purified thin limb Henle's loop cells.	108
Figure 6	Effect of radioligand concentration on the level of anterior pituitary ^{125}I -GHRH-GHRH-R complexes.....	110
Figure 7	Generation of lipoperoxidation by D-glucose in anterior pituitary cultured cells.	112
Figure 8	Levels of GHRH-R mRNA in anterior pituitary cultured cells exposed to high D-glucose concentrations for various periods of time.....	114
Figure 9	Levels of Fluo-GHRH in rat anterior pituitary cultured cells exposed to high D-glucose concentrations.....	116
Figure 10	Levels of GHRH-induced cAMP in rat anterior pituitary cultured cells exposed to high D-glucose concentrations.....	118

Annexe 1 : Résultats non-inclus dans le manuscrit 3.1 124

Figure A	Effet des différentes concentrations de glucose sur la lipoperoxydation membranaire des cellules hypophysaires de rats normaux, mises en culture
Figure B	Effet des différentes concentrations de glucose sur les niveaux d'ARNm du GHRH-R des cellules hypophysaires, de rats normaux, mises en culture
Figure C	Internalisation du Fluo-GHRH dans les cellules hypophysaires, de rats normaux, mises en culture
Figure D	Effet des différentes concentrations de glucose sur les niveaux d'internalisation du Fluo-GHRH dans les cellules hypophysaires, de rats normaux, mises en culture
Figure E	Effet des différentes concentrations de glucose sur la production d'AMPC induite par une stimulation au GHRH dans les cellules hypophysaires, de rats normaux, mises en culture. Incubation 4h



Figure F Effet des différentes concentrations de glucose sur la production d'AMPc induite par une stimulation au GHRH dans les cellules hypophysaires, de rats normaux, mises en culture. Incubation 24h

Figure G Effet des différentes concentrations de glucose sur la production d'AMPc induite par une stimulation au GHRH dans les cellules hypophysaires, de rats normaux, mises en culture. Incubation 48h



II. LISTE DES TABLEAUX

3. MANUSCRITS

3.1. Regulation of the growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocin- diabetic rats: in vitro evidence for a direct effect of glucotoxicity	49
---	----

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 GRHR-R mRNA study	98
---	----

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-GRHR-R cross-linking study	99
---	----

3.2. Effects of aging and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus.	125
---	-----

Table 1 Gene regulation in anterior pituitary	145
--	-----

Table 2 Gene regulation in hypothalamus	146
--	-----

I. LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	Acide aminé
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
AGE	<i>Advanced glycation end product</i>
AMPc	Adénosine 3'-5'-cyclique monophosphate
AP-1	Protéine activatrice-1
ARN	Acide ribonucléique
ARNc	Acide ribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
AT1	Angiotensine 1
AT1-R	Récepteur de l'angiotensine 1
Bcl2	<i>B cell lymphoma gene 2</i>
Bcl2l1	<i>Bcl2-like 1</i>
BHK	Lignée de cellules rénales de bébé hamster
Brn-2	Facteur de transcription brain-2
BSA	Albumine sérique bovine
CAT	Catalase
Cdkn 2c	Inhibiteur de la kinase cycline dépendante 2
C/EBP α	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
c-fos	proto-oncogène fos
Cos	Fibroblaste de singe (CV-1) transformée par le virus SV40
Cox6a2	Sous-unité VIa de la cytochrome c oxydase, polypeptide 2
Cox8h	Sous-unité VIIIh de la cytochrome c oxydase
CRB	Protéine nucléaire de liaison au facteur CREB
CRE	Élément de réponse à l'adénosine 3'-5' monophosphate

CREB	Facteur de transcription se liant à l'élément de réponse à l'adénosine 3'-5' monophosphate
Cu	Cuivre
DAG	Diacylglycérol
DMEM	Dulbecco modified Eagle's medium
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ER	Récepteur à l'œstrogène
Ets-1	<i>E26 transformation-specific-1 factor</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	Sérum bovin fœtal
Fluo-GHRH	Analogue fluorescent du GHRH
Gs	Protéine G de type stimulatrice de l'adénylate cyclase
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase
GH	Hormone de croissance
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
GHS	Sécrétagogues de la GH
GHS-R	Récepteur aux sécrétagogues de la GH
GIP	Peptide gastro-inhibiteur
GLP	<i>Glucagon-like peptide</i>
GnRH	Facteur de libération de l'hormone gonadotropine
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
GPx	Glutathione peroxydase
GSH	Gluthathion
GSSG	Gluthathion oxydé
Gsta1	glutathion-s-transférase alpha 1
h	Heure

HeLa	Cellules épithéliales humaines d'adénocarcinome du col de l'utérus
hGHRH	Facteur de libération de l'hormone de croissance humain
Hmox	Hème oxygénase
4-HNE	4-hydroxynonéal
H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
ICV	Intracérébroventriculaire
IGF-I	Facteur insulinique de croissance de type I
IP3	1,4,5-inositol-phosphate
JAK2	Janus Kinase 2
kb	Kilo paire de base
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoprotéines de faible densité
LPO	Lipoperoxydation
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDA	Malondialdéhyde
MEK	<i>MAPK/ERK (extracellular-signal-regulated kinase) kinase</i>
min	Minute
Mn	Manganèse
MtT/S	Lignée cellulaire tumorale de somatotropes de rat
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Forme réduite du NAD ⁺
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Nf-1	Facteur nucléaire 1
NF-κB	Facteur nucléaire Kappa B
Nfkbia	Inhibiteur alpha du NFκB
NO	Oxyde nitrique
NREMS	<i>Non-rapid-eye-movement sleep</i>
OH ⁻	Radicaux hydroxyles

O ₂ ⁻	Anion superoxyde
8-OhdG	8-hydroxydeoxyguanosine
PACAP	Peptide activateur de l'adénylate cyclase hypophysaire
Pb	Paire de bases
PDB	Phorbol 12,13-dibutyrate
IP ₃ K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
Pit-1	Facteur de transcription spécifique à l'hypophyse
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PMA	4β-phorbol 12-myristate 13-acétate
PPAR _γ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>
RAGE	Récepteur des produits avancés de glycation
RCMLD	Restriction calorique modérée de longue durée
REM	<i>Rapid-eye-movement sleep</i>
rGHRH	Facteur de libération de l'hormone de croissance de rat
ROS	Espèces réactives à l'oxygène
RPA	Protection à la RNase
RT-PCR	Amplification en chaîne par une polymérase précédée d'une étape de transcription inverse
Sec	Seconde
SIR2	<i>Silent information regulator 2</i>
Sirt1	<i>Silent mating type information regulation 2 homolog 1</i>
SOD	Superoxydes dismutases
Sp1	Protéine spécifique 1
SRIF	Somatostatine
Sstr2	Récepteur de la somatostatine 2
Sstr5	Récepteur de la somatostatine 5
STZ	Streptozotocine
TAS	Capacité antioxydante totale

TGF- β	Facteur de croissance transformant bêta
TRH	Thyréolibérine
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
UDP-N-GlcNAc	Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine
USF	<i>Upstream regulatory factor</i>
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire
VIP	Peptide intestinal vasoactif
Vol	Volume
WI-38	Lignée de fibroblastes humains de poumon
Zn	Zinc

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à ma directrice de recherche, le D^r Pierrette Gaudreau pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir guidée tout au long de mon projet de maîtrise. Elle est une source inépuisable de connaissances et d'encouragements et elle m'a transmis sa passion pour la recherche fondamentale. C'est avec une immense joie et un très grand intérêt que j'entreprendrai une autre étape de mon cheminement académique sous sa direction.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de mémoire, les D^{rs} Jean-Louis Chiasson et Réjean Couture d'avoir accepté de corriger mon mémoire de maîtrise. C'est un grand honneur pour moi de bénéficier de vos commentaires et suggestions qui en rehausseront la qualité.

Je voudrais également remercier le centre de recherche du CHUM (CRCHUM), le programme de Sciences biomédicales de l'Université de Montréal ainsi que le Réseau Québécois de la recherche sur le vieillissement (RQRV) pour m'avoir accordé des bourses tout au long de ma formation de maîtrise.

Merci à tous les membres du laboratoire NEV, Karyne, Julie B., Patricia, Sophie, Luc, Julie S, Christelle et Daniel, pour leur support et leurs prodigieux conseils. J'associe à chacun de vous une série de bons souvenirs et de moments agréablement partagés. Au fil des mois vous êtes devenus plus que de simples collègues, mais de grands amis. Je veux remercier aussi les membres du laboratoire de D^r Lapointe que j'ai eu grand plaisir à connaître et à côtoyer au long de ma maîtrise. Un remerciement particulier à mon amie Marie-Andrée qui m'a encouragée à débiter cette maîtrise et m'a soutenue durant ces trois ans, un gros merci!

Finalement, je voudrais remercier mon conjoint Philippe, pour son amour, sa patience, son soutien et sa présence dans tous les moments de cette expérience. J'ai vraiment beaucoup de chance de t'avoir à mes côtés. Un gros merci à ma famille, pour leurs encouragements constants, leur compréhension et l'amour qu'ils me donnent. La confiance et la fierté que vous avez placé en moi me stimulent à avancer toujours plus et à passer au travers des moments plus difficiles. Merci aussi à mes amis, spécialement à Nathalie et Jessica pour être toujours aussi présentes et ce malgré la distance et le temps.

En route vers la prochaine étape ...

Je dédie ce mémoire à...

Mon amour Philippe et à mon amie Marie-Andrée

*Pour vos encouragements constants,
votre étonnante foi en mes capacités et
votre présence dans les moments difficiles.*

*Pour toutes ces petites attentions qui me
permettent de me surpasser chaque jour.*

Merci !

1. INTRODUCTION

1.1 LE FACTEUR DE LIBÉRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE

1.1.1 Structure du facteur de libération de l'hormone de croissance

Le facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH) a été isolé en 1982, à partir de tumeurs pancréatiques provenant de deux patients atteints d'acromégalie (Guillemin et coll., 1982; Rivier et coll., 1982). Le GHRH est le seul neuropeptide à avoir été isolé et caractérisé en premier chez l'homme et non à partir de tissus provenant d'animaux. Ces travaux ont mis en évidence trois formes de GHRH humain: le GHRH(1-44)NH₂ (fonction carboxamide en C-terminal) (Guillemin et coll., 1982), le GHRH(1-40)OH (fonction carboxylique libre en C-terminal) (Rivier et coll., 1982) et le GHRH(1-37)NH₂. Les deux premières formes, soit le (1-40)OH et le (1-44)NH₂, ont été identifiées par la suite dans l'hypothalamus humain (Böhlen et coll., 1983). Chez le rat, le GHRH est composé de 43 acides aminés (aa) et possède une fonction carboxylique libre en C-terminal (Spiess et coll., 1983). Des études *in vivo* ont démontré que la portion 1-29 aa était suffisante à l'activité biologique maximale du peptide (Guillemin et coll., 1982). Des homologies de séquence avec le GHRH humain sont retrouvées chez le rat (62%) et la souris (67%) (Suhr et coll., 1989 ; Frohman et coll., 1989a ; Mayo et coll., 1985b). La structure primaire du GHRH est également identifiée chez le bœuf (Esch et coll., 1983), le porc (Bohlen et coll., 1983), la chèvre et le mouton (Brazeau et coll., 1984).

Des études de structure-affinité, dans l'hypophyse antérieure de rat, ont permis l'identification des aa et régions du GHRH(1-29) nécessaires au maintien d'une haute affinité de liaison à son récepteur. Il a été démontré que la monodélétion de l'aa Tyr¹, Ser⁹, Lys¹², Val¹³, Gly¹⁵, Gln¹⁶ ou Lys²¹ diminue drastiquement l'affinité de liaison du GHRH, alors que la monodélétion de l'aa Asn⁸, Gln²⁴, Asp²⁵, Ile²⁶, Met²⁷, Ser²⁸ ou Arg²⁹ a moins d'impact négatif. La délétion multiple d'aa dans la région 13-21, ou le remplacement des segments 13-14, 13-15, 16-18 ou 19-21 par une entité octanoyl, conduit également à une perte importante d'affinité du GHRH (Gaudreau et coll., 1992). Ces résultats indiquent

que les aa contenus dans le segment 13-21 sont plus important que ceux du segment 24-29 pour assurer le maintien d'une haute affinité ou d'une conformation optimale, permettant la liaison du GHRH à son récepteur (Gaudreau et coll., 1992).

Une étude de structure-affinité où chaque aa du hGHRH(1-29)NH₂ a été substitué par un résidu alanine ou son stéréoisomère de forme D, a permis d'identifier les pharmacophores de liaison du GHRH dans l'hypophyse antérieure de rat. Les aa Tyr¹, Asp³, Tyr¹⁰, Arg¹¹, Lys¹², Leu¹⁴, Leu¹⁷, Arg²⁰ et Lys²¹ seraient nécessaire à la liaison de haute affinité du GHRH alors que les aa Ala⁴, Val¹³, Ala¹⁹ et Ile²⁶ seraient responsables du maintien de la structure du GHRH permettant une liaison de haute affinité. Les aa Ile⁵ et Phe⁶ apparaissent importants tant pour la structure du GHRH que pour sa liaison au récepteur. Les aa impliqués dans la liaison au récepteur seraient également nécessaires à l'activation du récepteur du GHRH (GHRH-R) et à la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Lefrançois et coll., 1994).

Le GHRH est un membre de la superfamille de peptides régulateurs qui comprend le VIP (peptide intestinal vasoactif), le PACAP (peptide activateur de l'adénylate cyclase hypophysaire), la sécrétine, le glucagon, les GLP (glucagon-like peptide) et le GIP (peptide gastro-inhibiteur) (Campbell et Scanes, 1992). Ces peptides possèdent la plus forte homologie de séquence dans leur partie N-terminale (Campbell et Scanes 1992). Ils agissent en stimulant l'adénylate cyclase, menant à l'activation de la protéine kinase A (PKA). Certains de ces peptides peuvent également activer la production d'inositol 3-phosphate (IP3), menant à la stimulation de la protéine kinase C (PKC) et à l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants (Anderson et coll., 2004).

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

Le gène du GHRH a été cloné quelques années après l'isolation du peptide, à partir du génome humain (Mayo et coll., 1985a), de rat (Mayo et coll., 1985b) et de souris (Suhr et coll., 1989). Ce gène unique a été localisé chez l'humain sur le chromosome 20 (Mayo et coll., 1985a), sur le chromosome 2 chez la souris (Godfrey et coll., 1993) et sur le chromosome 3 chez le rat (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Le gène du GHRH est réparti sur cinq exons, totalisant une longueur de 18kb. Les exons 2-5 sont communs au GHRH placentaire et hypothalamique, le troisième exon code pour le GHRH(1-37) et le quatrième, pour le groupement terminal COOH (Mayo et coll., 1985a). Il possède deux régions promotrices différentes dans le premier exon, l'un pour le peptide hypothalamique et l'autre pour le peptide placentaire. Un seul site d'initiation de la transcription a été retrouvé dans l'hypothalamus et dans le placenta (Gonzalez-Crespo et Boronat, 1991). Ainsi, l'utilisation de l'un ou l'autre des promoteurs permet la production de deux ARN messagers (ARNm) distincts dans l'hypothalamus et le placenta qui codent pour une protéine précurseur et un GHRH identique dans les deux tissus. Le préproGHRH est codé par quatre exons. Le cinquième exon de l'ARNm du préproGHRH hypothalamique comprend une portion non-traduite qui contient des éléments TATA et de type CCAAT impliqués dans l'initiation de la transcription. Cette région est hautement conservée chez l'humain, le rat et la souris (Suhr et coll., 1989).

Composé de 108 acides aminés, le préproGHRH comprend un peptide signal, le GHRH(1-44), un peptide carboxyterminal et un signal d'amidation. Le clivage du peptide signal entraîne la formation du proGHRH. Celui-ci est à son tour clivé par les endopeptidases en GHRH(1-45), puis transformé en GHRH(1-44)NH₂ par la peptidylglycine monooxygénase α -amidante (Frohman et coll., 1992). Le GHRH(1-40)OH est obtenu à partir du GHRH(1-45) clivé par les endopeptidases présentes entre autre dans l'hypophyse et l'hypothalamus. Ces résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle les formes plus courtes du GHRH seraient des produits de protéolyse du GHRH(1-44)NH₂ (Guillemin et coll., 1982).

1.1.3 Localisation du facteur de libération de l'hormone de croissance

Le noyau arqué de l'hypothalamus est la source majeure de neurones GHRHergiques tant chez les primates que les rongeurs (Frohman et coll., 1989). Ces cellules expriment l'ARNm du préproGHRH, ce qui montre leur capacité à synthétiser le GHRH. Un réseau d'axones des neurones à GHRH a été localisé par immunocytochimie dans l'éminence médiane jusqu'au système vasculaire porte où le GHRH est libéré vers l'hypophyse antérieure. Cette sécrétion dans le système portal est épisodique ce qui contribue à la sécrétion pulsatile de la GH (Petersenn et Schulte., 2000).

En plus de l'hypothalamus, l'ARNm du préproGHRH a été retrouvé dans plusieurs autres tissus. L'ARNm du préproGHRH et le GHRH ont été retrouvés principalement dans les cellules du cytotrophoblaste, chez le rat et les cellules du trophoblaste et du labyrinthe placentaire, chez la souris (Suhr et coll., 1989 ; Margioris et coll., 1990). Ces derniers ont été aussi retrouvés dans les ovaires (Moretti et coll., 1990), les cellules de Leydig (Ciampani et coll., 1992) et les cellules germinales des testicules, chez le rat et l'humain (Srivastasa et coll., 1993). Dans le système digestif, l'ARNm du préproGHRH et son peptide (GHRH), sont présents dans la muqueuse épithéliale du jéjunum et du duodénum (Lehy et coll., 1986). Ils ont aussi été détectés dans le thymus et la rate, plus précisément dans les cellules lymphocytaires (Guarcello et coll., 1991) et finalement dans le pancréas (Shibasaki et coll., 1984). Une étude par RT-PCR a permis la détection d'une faible expression de l'ARNm du préproGHRH dans l'hypophyse, le cœur, le poumon, le duodénum, l'intestin grêle, la glande surrénale, l'épididyme, le muscle squelettique et le rein (Matsubara et coll., 1995). Dans ces tissus, le GHRH exerce son rôle *via* un mécanisme d'action autocrine et paracrine.

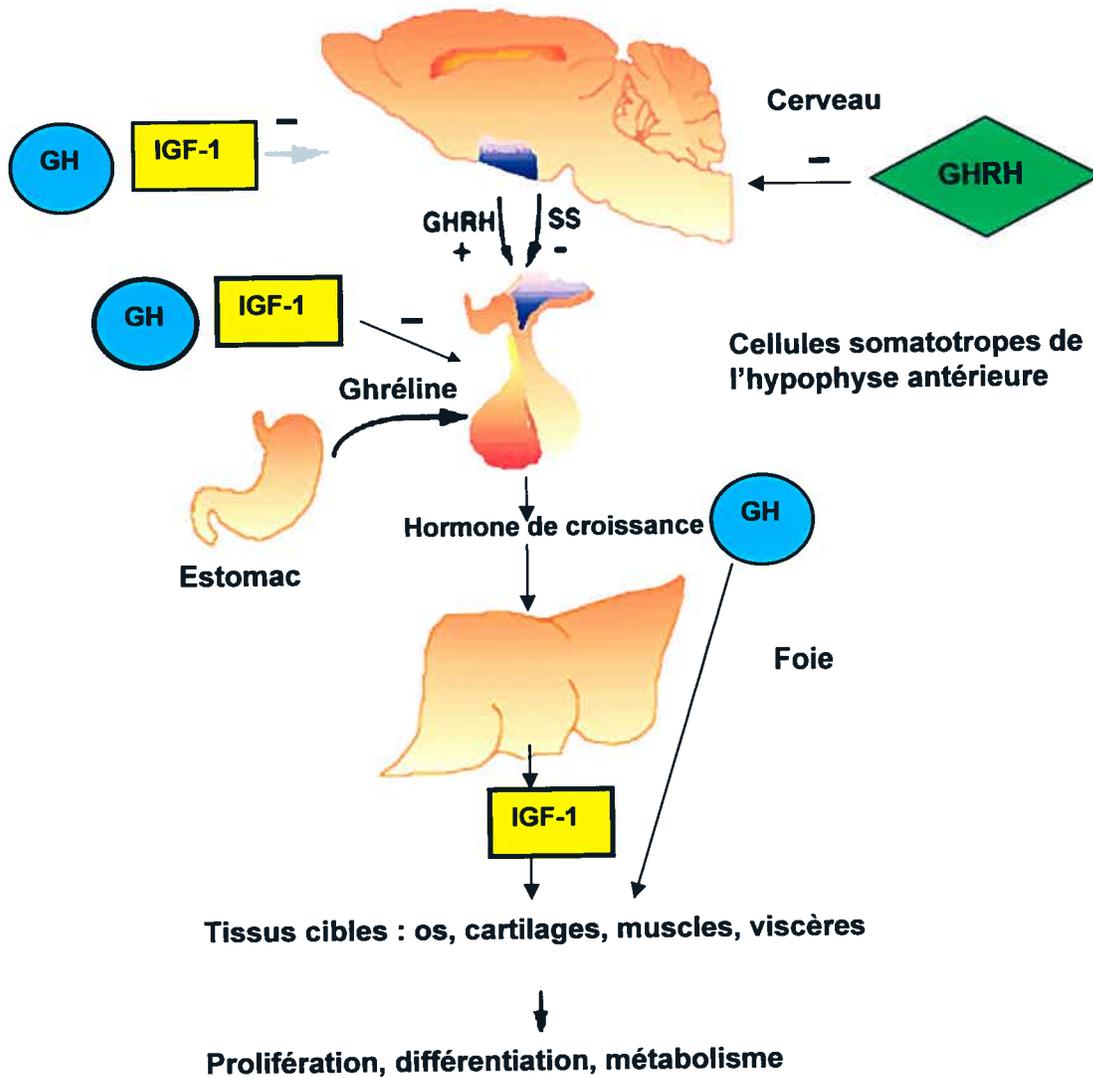
1.1.4 Rôles du facteur de libération de l'hormone de croissance

1.1.4.1 Stimulation de la synthèse et de la sécrétion de l'hormone de croissance

La GH exerce un rôle central dans la croissance longitudinale de la naissance jusqu'à la puberté alors que chez l'adulte, elle joue un rôle majeur dans le maintien des fonctions métaboliques et de l'intégrité tissulaire et cellulaire (Andreasen et coll., 1996). Ainsi, elle induit la prolifération et la différenciation cellulaire de plusieurs tissus et organes incluant les os, les cartilages, les muscles et les viscères (Andreasen et coll., 1996). Elle est également l'une des hormones anaboliques les plus importantes de l'organisme (Andreasen et coll., 1996). Ainsi, la GH augmente la synthèse protéique en stimulant l'entrée d'acides aminés dans les cellules et diminue le catabolisme protéique (Andreasen et coll., 1996). La GH stimule l'utilisation des réserves adipeuses comme source d'énergie en augmentant la lipolyse (Bengtsson et coll., 1992). Elle exerce également un effet hyperglycémiant en diminuant l'utilisation du glucose par les cellules (Doré, 1996).

Chez les mammifères, la sécrétion de GH est pulsatile (Tannebaum et Martin, 1976 ; Veldhuis et Bowers, 2003) et suit un rythme circadien qui se caractérise par une amplitude accrue des pics de sécrétion durant le sommeil (Takahashi et coll., 1968). Cette sécrétion épisodique est principalement contrôlée par deux hormones hypothalamiques, le GHRH (noyau arqué ; Barinaga et coll, 1983) et la somatostatine (SRIF, noyau périventriculaire ; Tannenbaum et Ling, 1984) (Figure 1). Le GHRH exerce des effets stimulants sur la synthèse et la sécrétion de GH (Tannenbaum et Ling, 1984 ; Barinaga et coll, 1983) alors que la SRIF les inhibe (Tannenbaum et Ling, 1984 ; Sarret et coll, 1999).

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>.

Des boucles de rétrocontrôle positives et négatives, ont été décrites où le GHRH, la SRIF, la GH et le facteur de croissance insulinique de type 1 (IGF-1) contribuent à activer ou inhiber la sécrétion de GH (Figure 1). La GH exerce un rétrocontrôle négatif en inhibant la sécrétion de GHRH, sa propre sécrétion et en stimulant celle de la SRIF (Andreasen et coll., 1996). La présence du récepteur de la GH (GH-R) et de son ARNm a été identifiée au niveau hypophysaire ce qui suggère un rétrocontrôle négatif direct de la GH sur sa propre sécrétion (Fraser et coll., 1991). L'IGF-1 participe également à la régulation de la synthèse et sécrétion de la GH. Les récepteurs de l'IGF-1 (IGF1R) ont été identifiés dans l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure de rat (Goodyer et coll., 1984 ; Sugihara et coll., 1999). Dans l'hypophyse antérieure, l'IGF-1 inhibe la sécrétion de GH et l'expression de son gène (Yamashita et Melmed, 1986). Dans l'hypothalamus, l'IGF-1 stimule directement la libération de la SRIF et inhibe la libération de GHRH (Berelowitz et coll., 1981).

La ghrelina contribue également au contrôle de la sécrétion de GH (Kamegai et coll., 2004). Produite dans l'estomac, l'intestin grêle et le système nerveux central, elle est un ligand naturel du récepteur des sécrétagogues de la GH (GHS-R). Elle stimule directement la sécrétion de la GH dans l'hypophyse antérieure et agit aussi au niveau hypothalamique, en augmentant la sécrétion de GHRH (Anderson et coll., 2005). La ghrelina est également un peptide fortement impliqué dans le contrôle de l'appétit, en stimulant la prise alimentaire (Toshinai et coll., 2003). En plus de ces hormones, plusieurs autres neurotransmetteurs et neuropeptides sont impliqués dans la régulation de la sécrétion de la GH : le TRH (thyroliberine) (Hanew et coll., 1998), le PACAP (peptide activateur de l'adénylate-cyclase hypophysaire) (Murakami et coll., 2001), la galanine (Anderson et coll., 2005), le GnRH (facteur de libération des gonadotropines) et la leptine (Tannenbaum et coll., 1998).

En plus de son rôle dans la sécrétion de GH, le GHRH contrôle également sa synthèse. Il a été démontré dans des cultures primaires de cellules hypophysaires qu'il augmente l'ARNm de la GH en stimulant la transcription de son gène (Barinaga et coll., 1985). Cette transcription est régulée entre autre, par l'action de l'AMPc stimulant le facteur de transcription Pit-1 (McCormick et coll., 1990).

1.1.4.2 Prolifération et différenciation cellulaire

Le rôle du GHRH dans la prolifération cellulaire a été proposé suite à des observations chez des patients atteints de tumeurs sécrétant le GHRH, où l'hyperplasie hypophysaire, l'acromégalie et une augmentation de la croissance somatique concordait avec une élévation des taux plasmatiques de GH (Thorner et coll., 1982 ; Frohman et Szabo, 1981). Le même type de résultats a été retrouvé chez des souris transgéniques surexprimant le GHRH (Hammer et coll., 1985). Des études d'incorporation de thymidine radiomarquée ont permis de démontrer que le GHRH est impliqué dans le processus de prolifération des cellules somatotropes (Billestrup et coll., 1986). De plus, l'utilisation de la forskoline (un activateur de l'adénylate cyclase) dans des cultures primaires de cellules hypophysaires a permis de mettre en évidence une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de GH *via* une augmentation de la production d'AMPc ainsi qu'une augmentation de la prolifération des somatotrophes (Billestrup et coll., 1986). Ceci indique que le second messager AMPc joue un rôle important dans la régulation de la prolifération (Billestrup et coll., 1986). Une contribution du proto-oncogène *c-fos* à ce mécanisme a également été proposée, puisqu'une stimulation au GHRH provoque l'augmentation de l'ARNm et de la protéine *c-fos* dans les somatotropes en culture (Billestrup et coll., 1987).

Le rôle du GHRH dans la prolifération cellulaire a été rapporté dans des tissus extrahypophysaires. Dans le placenta de souris et de rate, les niveaux d'ARNm du préproGHRH varient durant la grossesse, suggérant une participation du GHRH à la sécrétion fœtale de la GH au cours du développement prénatal (Spatola et coll., 1991). Le GHRH placentaire pourrait aussi stimuler la production de d'autres hormones placentaires et contribuer à la croissance et à la différenciation cellulaire du fœtus (Mayo et coll., 1996). Dans les cellules de la granulosa de l'ovaire de rate et humaine, le GHRH stimule la folliculostimuline (FSH), augmentant ainsi la maturation folliculaire (Bagnato et coll., 1992 ; Moretti et coll., 1990). Dans les testicules de rat, le GHRH agit sur les cellules de Leydig pour stimuler la stéroïdogénèse. Il provoque également la prolifération des cellules de Sertoli par une voie AMPc-dépendante, impliquant une augmentation d'expression du gène c-fos (Srivastava et coll., 1993a). L'action proliférative du GHRH a aussi été rapportée dans les cellules épithéliales de l'intestin (Lehy et coll., 1986) et dans les lymphocytes de la rate et du thymus chez le rat (Guarcello et coll., 1991).

1.1.4.3 Contrôle de l'appétit

Le GHRH exerce un effet positif sur la régulation circadienne de l'appétit. En effet, l'injection intra-cérébroventriculaire (ICV) de GHRH chez le rat augmente la prise alimentaire durant le jour et n'a aucun effet ou diminue la prise alimentaire durant la nuit (Feifel et Vaccarino, 1989). De plus, l'injection d'antisérum anti-GHRH dans le noyau suprachiasmique et la région préoptique médiane supprime la prise alimentaire durant le cycle nocturne, période où les rats effectuent 80% de leur consommation quotidienne (Vaccarino et coll., 1991). Le GHRH agit de façon dose-dépendante, puisqu'une augmentation de la prise alimentaire est remarquée à faibles doses (0.4 - 4 pmoles) alors qu'à des doses supérieures à 4 pmoles, une inhibition est observée (Tanaka et coll., 1991). Finalement, une étude effectuée chez des rats âgés a montré que l'administration périphérique de GHRH diminue la prise alimentaire et lipidique, mais augmente la prise protéique, alors que l'injection intra-cérébroventriculaire (ICV) de GHRH diminue la prise alimentaire et lipidique

(Veyrat-Durebex et coll., 2001). Ces résultats montrent la complémentarité des sites d'actions du GHRH dans le contrôle de la prise alimentaire.

1.1.4.4 Contrôle du sommeil

Le GHRH est un important inducteur de sommeil. En effet, l'injection icv ou intra-hippocampique de GHRH déclenche la phase du sommeil profond (Ehlers et coll., 1986). Il a été observé qu'une activité accrue du GHRH est associée à de nombreuses périodes de sommeil NREMS (*non-rapid-eye-movement-sleep*), une des phases cycliques du sommeil chez l'humain. De plus, l'utilisation d'antagonistes du GHRH ou d'anticorps anti-GHRH réduit le sommeil NREMS (Obal et coll., 1992). Finalement, l'injection de GHRH intrapréoptique fait augmenter la durée et l'intensité du sommeil REM (*rapid-eye-movement*) (Zhang et coll., 1999).

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

La régulation majeure de l'ARNm du GHRH est liée à l'augmentation des taux circulants de GH. Les niveaux d'ARNm du GHRH augmentent chez les rats hypophysectomisés. Cette situation peut être renversée par une administration de GH (Chomczynski et coll., 1988). Le même effet a été mis en évidence chez des rats nains déficients en GH et traités de façon systémiques à la GH, mettant ainsi en évidence le rôle de la GH dans la régulation du GHRH (Sato et Frohman 1993). Une boucle ultracourte de rétrocontrôle négatif existe également au niveau hypothalamique où le GHRH agit sur sa propre sécrétion (Lumpkin et McDonald, 1989).

Les concentrations de préproGHRH et de GHRH hypothalamique sont plus élevées chez le rat mâle que chez la femelle, suggérant un effet des stéroïdes sexuels (Argente et coll, 1991). La testostérone stimule l'expression de l'ARNm du préproGHRH chez le rat tandis que l'estrogène la diminue (Senaris et coll., 1992). Chez le rat, l'ablation des gonades provoque une diminution des niveaux d'ARNm

du GHRH (Fodor et coll., 2001). Les neurones hypothalamiques GHRHergiques sont plus nombreux chez le rat que chez la rate (Chowen et coll., 2004), ce qui pourrait s'expliquer par la différence d'environnement en stéroïdes sexuels durant la période néonatale et post-pubère (Argente et coll., 1991). Il a été démontré que la testostérone en période néonatale peut exercer un rôle sur le nombre de neurones à GHRH et leur capacité à répondre aux androgènes et aux œstrogènes produits en période post-natale (Chowen et coll., 2004).

Les hormones thyroïdiennes exercent un effet inhibiteur sur la synthèse et la sécrétion de GHRH. En effet, chez le rat, une thyroïdectomie entraîne une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH et du GHRH, alors que l'hyperthyroïdie les diminue (Jones et coll., 1990). Finalement, les glucocorticoïdes exercent un contrôle négatif sur les niveaux d'ARNm du GHRH dans le noyau arqué (Senaris et coll., 1996).

1.2 RÉCEPTEUR DU FACTEUR DE LIBÉRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE

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

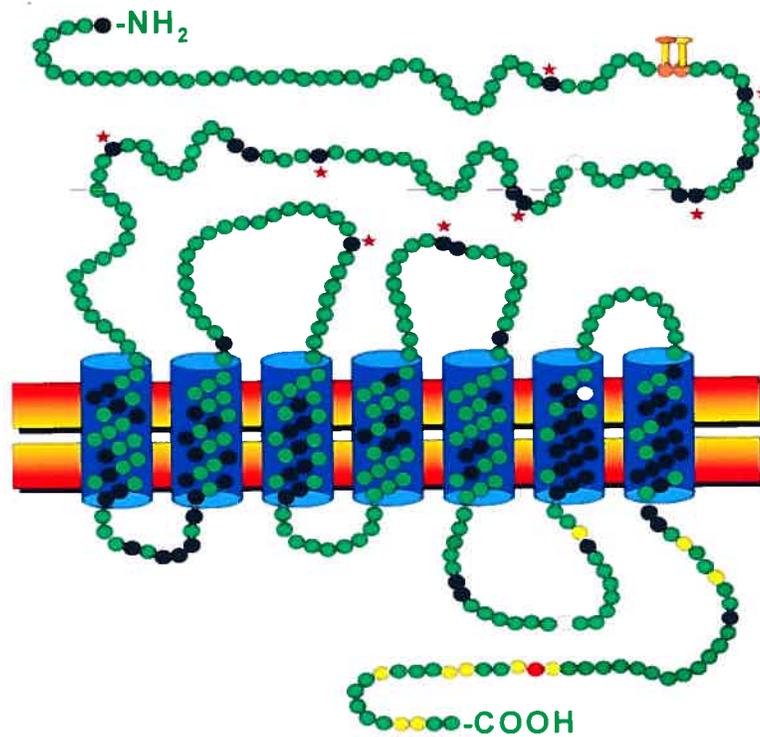
La sécrétion de GH est initiée, dans les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure, par la liaison du GHRH à son récepteur membranaire (GHRH-R). Le GHRH-R a été cloné pour la première fois en 1992 dans l'hypophyse humaine (Mayo, 1992; Lin et coll., 1992), de rat (Mayo, 1992) et de souris (Lin et coll., 1992). Il a par la suite été cloné dans l'hypophyse antérieure de plusieurs autres mammifères, tel que le porc (Hassan, 2001; Hsiung et coll., 1993), le bœuf et le mouton (Horikawa et coll., 2001) et à partir d'adénomes d'hypophysaires humains (Tang et coll., 1995 ; Hashimoto et coll., 1995 ; Gaylinn et coll., 1993). La taille de la protéine traduite est de 423 acides aminés chez l'homme, le rat, la souris, le porc et le bœuf alors qu'elle est de 407 aa chez le

mouton. Les récepteurs de rat et de souris sont homologues à 94% entre eux et à 82% avec la séquence du récepteur humain (Mayo, 1992).

La stratégie de clonage du GHRH-R était basée sur la prémisse que ce récepteur utilisait une protéine G stimulatrice (G_s) pour transmettre son signal. Le clonage du récepteur a confirmé cette hypothèse en démontrant la présence des caractéristiques des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Mayo et coll., 1995). Le GHRH-R est un membre de la sous-famille B-III des GPCR, qui comprend également les récepteurs du peptide intestinal vasoactif (VIP) (Ishihara et coll., 1992), de la sécrétine (Ishihara et coll., 1991) et du glucagon (Jelinek et coll., 1993).

La structure du GHRH-R est constituée de sept domaines transmembranaires dont trois boucles intra-cytoplasmiques et trois boucles extracellulaires. Les deuxièmes et troisièmes boucles extracellulaires possèdent des résidus cystéines, qui pourraient être impliqués dans la formation de ponts disulfures (Mayo, 1992). La partie C-terminale intra-cytoplasmique renferme une cystéine pouvant être palmitoylée (Veyrat-Durebex et coll., 2005) ainsi que des sites potentiels de phosphorylation (Mayo, 1992). Ces sites sont aussi retrouvés dans la troisième boucle cytoplasmique de la protéine. La partie N-terminale possède au moins un site de N-glycosylation et comporte six cystéines conservées (Mayo, 1992 ; Mayo et coll., 1996). La présence de cystéines et de ponts disulfures est particulièrement importante au maintien de la structure et de la fonction de la sous-famille B-III des GPCR (Laburthe et coll., 1996).

Figure 2 : Représentation schématique du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat.



:Site potentiel de N-glycosylation



:Site potentiel de palmitoylation



:Acides aminés conservés dans la sous-famille B-III



:Sites potentiels de phosphorylation



:Résidus de cystéine conservés

Tiré de : Mayo et coll., 1996, Growth hormone secretagogues, Bercu BB and Walker RF Eds, Springer-Verlag, p. 56.

Les premiers travaux d'analyse de l'ARNm du GHRH-R dans l'hypophyse antérieure de rat ont mis en évidence la présence de deux transcrits d'environ 2,5 et 4 kb (Mayo, 1992; Lin et coll., 1992). Le transcrit de 2,5 kb représente la forme prédominante dans l'hypophyse antérieure, qui est traduite en la forme fonctionnelle du GHRH-R de 423 aa (Mayo, 1992; Miller et coll., 1999), alors que la structure et le rôle du transcrit de 4 kb demeurent à élucider.

Deux isoformes du GHRH-R ont été identifiées dans l'hypophyse de rat. La première, constituée de 464 aa, contient une insertion de 41 aa (addition de 123 pb) dans la troisième boucle intracytoplasmique, située immédiatement avant le sixième domaine transmembranaire (Mayo, 1992). Ce point d'insertion correspond à une jonction intron-exon, suggérant que cette forme longue du récepteur résulterait d'un processus d'épissage alternatif (Mayo, 1992). La forme de 464 aa est moins affine pour le GHRH en comparaison avec la forme native du récepteur de 423 aa et ne peut provoquer la production d'AMPc suite à une stimulation au GHRH. La deuxième isoforme, décrite par Zeitler et coll. (1998), possède 480 aa, soit l'insertion de 41 aa dans la troisième boucle cytoplasmique, ainsi qu'une délétion de 131 pb (1279-1408), se traduisant par une substitution des cinq derniers aa de l'extrémité C-terminale et l'addition de 17 aa. La protéine résultante de 42 kDa a la propriété de stimuler la voie de l'adénylate cyclase, à divers degrés selon la lignée cellulaire utilisée (fibroblastiques rénales de singe (Cos) ou cancéreuses humaines (Hela)) (Zeitler et coll., 1998).

Dans les hypophyses et adénomes humains, la présence de transcrits d'ARNm de 2,0, 2,8 et 4,5 kb a été rapportée (Hashimoto et coll. (1995). Le transcrit de 2,0 kb correspondant à la protéine de 423 aa est retrouvé en abondance dans l'hypophyse et permet la transmission intracellulaire de signaux *via* l'AMPc. Les transcrits de 2,8 et 4,5 kb renferment un codon stop imbriqué dans leur séquence, générant des récepteurs tronqués au niveau de la troisième boucle intracytoplasmique. La transfection de ces transcrits ne provoque aucune réponse cellulaire, suite à une stimulation au GHRH. Toutefois, celle du transcrit de 4,5 kb interfère avec le GHRH-R fonctionnel et entraîne une diminution de la production

d'AMPc suite à une stimulation au GHRH, suggérant un rôle de dominant négatif (Motomura et coll., 1998). Trois isoformes, résultant de l'épissage alternatif de l'exon 11, ont été identifiés à partir de tumeurs hypophysaires humaines GH-sécrétantes et non sécrétantes et d'hypophyses humaines normales (Tang et coll., 1995). Ils présentent une taille partielle de 1,3, 1,7 et 1,8 kb. La forme de 1,3 kb était la plus abondante et correspondrait au GHRH-R natif, alors que les deux autres variants contenant des insertions d'environ 400 et 500 pb respectivement, seraient traduites en des isoformes de 325 et 338 aa, respectivement. Les 12 derniers aa de la forme de 338 aa étant différents de ceux de la forme de 423 aa (Tang et coll., 1995).

D'autres isoformes du GHRH-R ont été identifiées dans l'hypophyse de différents mammifères, à partir de bibliothèques d'ADNc. Chez la brebis, la forme de 407 aa correspond aux 407 premiers acides aminés de la séquence de 423 aa (Horikawa et coll., 2001). Chez la souris, trois isoformes ont été décrites, l'une est la forme de 423aa et les deux autres renferment soit une insertion, similaire à celle retrouvée chez le rat, ou une délétion des nucléotides qui codent pour la première boucle extracellulaire (Lin et coll., 1992). Chez le porc, en plus de l'isoforme de 423 aa, une isoforme de 451 aa a été identifiée. Elle possède une séquence identique à celle de 423 aa pour les aa 1-418, mais différente pour les aa 419–423 (Hassan, 2001).

1.2.2 Structure du gène du GHRH-R

Le gène encodant le GHRH-R humain a été localisé sur le bras court du chromosome 7 [7p14 (Gaylinn et coll., 1994) ou 7p15 (Wajnrajch et coll., 1994)]. Il s'étend sur 15 kb et renferme 13 exons (Petersenn et coll., 1998). Un seul site d'initiation de la transcription, situé à 40 pb en amont du site d'initiation de la traduction, a été identifié (Petersenn et coll., 1998). L'étude de la séquence du promoteur du gène du GHRH-R humain a permis d'identifier des sites de liaison de facteurs de transcription de base, tel que le facteur nucléaire 1 (Nf-1), l'*upstream regulatory factor* (USF) et la protéine stable-1 (SP-1) (Petersenn et coll., 1998).

Des sites de liaison de facteurs de transcription tissu-spécifiques, tel que le facteur Pit-1 ou *growth hormone factor 1* (GHF-1) et le facteur de transcription *brain-2* (Brn-2) (Petersenn et coll., 1998) ont également été observés. Finalement, des sites de liaison de facteurs sensibles aux stimuli exogènes, tel que la protéine activatrice-1 (AP-1), la protéine de liaison à l'élément de réponse de l'AMPc (CREB), les récepteurs aux œstrogènes (ER) et aux glucocorticoïdes (GR), ainsi qu'au facteur nucléaire Kappa B (NF- κ B) sont présents dans la région promotrice du GHRH-R humain (Petersenn et coll., 1998). L'élément de réponse aux glucocorticoïdes est positif et celui aux œstrogènes est négatif (Petersenn et coll., 1998).

Chez le rat, le gène du GHRH-R est composé de 14 exons, s'étendant sur 15 kb (Miller et coll., 1999). Trois sites majeurs d'initiation de la transcription ont été localisés aux positions 286, 93 et 84 pb en amont du site d'initiation de la traduction (Miller et coll., 1999). La région promotrice de 1,9 kb renferme plusieurs sites de liaison pour les facteurs de transcription Pit-1, CREB, Ets-1 (E26 transformation-specific-1) et C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein) (Miller et coll., 1999). Nogami et coll. (2002) ont également identifié deux éléments de réponse fonctionnels aux glucocorticoïdes et un élément de réponse aux hormones thyroïdiennes. Un élément de réponse fonctionnel à l'acide rétinoïque a également été mis en évidence (Miller et Mayo, 1997).

1.2.3 Localisation du GHRH-R

Dans l'hypophyse antérieure, l'expression du GHRH-R est exclusive aux cellules somatotropes. L'immunohistochimie a permis de localiser le récepteur à la membrane cytoplasmique, la membrane de granules de sécrétion de la GH, la matrice cytoplasmique et la membrane nucléaire des cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure de rat et d'humain (Morel et coll., 1999).

L'ARNm du GHRH-R est présent dans plusieurs autres tissus. Dans l'hypothalamus, il est retrouvé dans le noyau arqué, ventromédial ainsi que les noyaux périventriculaires (Takahashi et coll., 1995). La présence du GHRH-R dans le noyau arqué renforce l'hypothèse d'une boucle de rétrocontrôle ultra-courte du GHRH sur sa propre sécrétion. Dans les noyaux périventriculaires, le GHRH stimule la sécrétion de SRIF (Aguila et coll., 1994). Le GHRH-R est également présent en faible concentration dans le cervelet, le cortex et le tronc cérébral, suggérant un rôle dans certaines fonctions du système nerveux central, entre autres dans le contrôle du sommeil et de l'appétit (Matsubara et coll., 1995). L'ARNm du GHRH-R a été mis en évidence par RT-PCR dans le muscle squelettique, la glande thyroïde, le duodénum, l'intestin grêle, le colon, la rate, l'épididyme, l'urètre, le cœur, le poumon, le cerveau et la glande surrénale et le rein (Matsubara et coll., 1995). Au niveau du tractus gastro-intestinal, la liaison du GHRH à son récepteur stimule la prolifération des cellules de la muqueuse gastroduodénale (Konturek et coll., 1988). Le GHRH-R pourrait aussi être impliqué dans les fonctions immunitaires particulièrement en activant la prolifération leucocytaire dans la rate et le thymus (Guarcello et coll., 1991). Le GHRH-R a également été localisé dans le placenta de rat (Takahashi et coll., 1995) et humain (Mayo et coll., 1996). Parmi ces tissus extrahypophysaires, la médulla rénale, plus spécifiquement l'anse de Henlé, renferment les plus hauts niveaux d'ARNm du récepteur (Matsubara et coll., 1995; Boisvert et coll., 2002). Il a été proposé que le GHRH-R rénal puisse jouer un rôle dans le contrôle de l'oxygénation, le transport d'électrolytes et dans l'expression ou la régulation de protéines impliquées dans le mécanisme de concentration de l'urine (Matsubara et coll., 1995; Boisvert et coll., 2002). Il pourrait également favoriser la prolifération et la différenciation des cellules de l'anse de Henlé (Boisvert et coll., 2002).

1.2.4 Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du GHRH-R

Des études de saturation avec le radioligand [$^{125}\text{I-Tyr}^{10}$]hGHRH(1-44)NH₂ ($^{125}\text{I-GHRH}$), ont été menées dans des homogénats d'hypophyses antérieures de rats de 2 mois révélant la présence de deux types de sites de liaison: un premier site à haute affinité et basse capacité, et un deuxième site à basse affinité et haute capacité (Abribat et coll., 1990). L'analyse des complexes covalents ligand-récepteur, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide suite à une expérience de réticulation chimique, a révélé la présence d'entités de 27 et 42 kDa (Guarcello et coll., 1991) ou de 28, 47 et 65 kDa (Boulanger et coll., 1999). De plus, l'immunobuvardage Western, à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-GHRH-R(392-404) a révélé la présence de trois protéines immunoréactives de 44, 47 et 65 kDa (Boulanger et coll., 1999). L'entité de 47 kDa correspondrait au GHRH-R de 423 aa décrit par Mayo (1992), alors que les entités de 28 et 44 kDa pourraient être des formes tronquées de la protéine de 47 kDa ou des isoformes du GHRH-R. L'entité de 65 kDa pourrait être une forme dimérique ou glycosylée du GHRH-R, étant donné la présence de sites potentiels de N-glycosylation (Mayo, 1992 ; Lin et coll., 1992). Dans l'hypophyse de bœuf, des complexes de 31 kDa et 55 kDa ont été identifiés. Suite à une déglycosylation enzymatique, l'entité de 55 kDa est réduite à une taille moléculaire de 45 kDa, indiquant un état natif glycosylé (Zysk et coll., 1996). Des résultats similaires ont été obtenus chez le mouton (Gaylinn et coll., 1994).

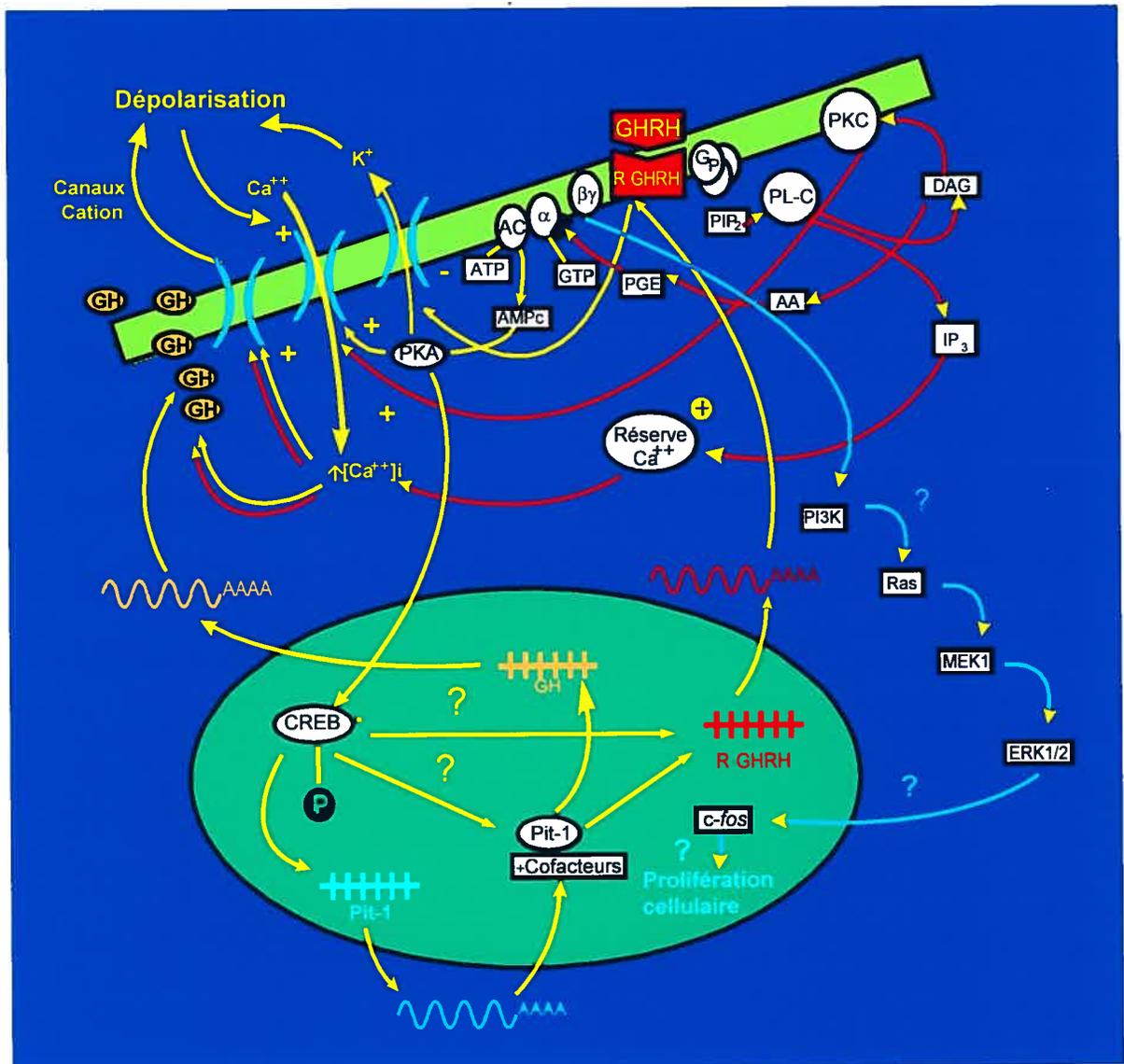
Chez l'humain, des études d'immunobuvardage Western ont permis de détecter des protéines de 52 et 55 kDa dans des préparations membranaires d'hypophyse antérieure (Boulanger et coll., 1999). Par ailleurs, des complexes de ($^{125}\text{I-GHRH-GHRH-R}$ de 35, 45 et 72 kDa ont été détectés dans les cellules BHK transfectées avec le GHRH-R humain et une entité immunoréactive de 45 kDa (Boulanger et coll., 1999). Parmi ceux-ci, celui de 45 kDa montre une affinité de liaison plus élevée pour le GHRH (Boulanger et coll., 1999).

Les régions du GHRH-R responsables de sa liaison au GHRH ont été étudiées à l'aide de récepteurs tronqués ou chimériques. Ces études ont démontré le rôle crucial de l'extrémité N-terminale extracellulaire de la protéine, en association avec les segments transmembranaires et leurs boucles extracellulaires, pour l'interaction initiale ligand-récepteur (DeAlmeida et Mayo, 1998). La spécificité de liaison au GHRH est associée aux résidus des boucles extracellulaires, en relation avec des domaines trans-membranaires (DeAlmeida et Mayo, 1998). De plus, les domaines C-terminal et N-terminal sont essentiels à une liaison optimale du GHRH (DeAlmeida et Mayo, 1998).

1.2.5 Voies de signalisation impliquées dans la fonctionnalité du GHRH-R

La liaison du GHRH à son récepteur déclenche une cascade de signalisation intracellulaire menant à la synthèse et à la sécrétion de l'hormone de croissance ainsi qu'à la prolifération et différenciation. Ce processus nécessite la participation de plusieurs voies, soit les voies de l'adénylate cyclase-AMPC-PKA, des phosphatidylinositols-PKC et des mitogen-activated protein kinases (MAPK) (Figure 3). La voie de l'adénylate cyclase est considérée comme la voie principale utilisée dans l'activation du GHRH-R par le GHRH.

Figure 3 : Voies de signalisation impliquées dans la réponse au GHRH dans l'hypophyse antérieure.



Adapté de : Frohman L, et Mayo et coll.,1996, Growth hormone secretagogues, Bercu BB and Walker RF Eds, Springer-Verlag, pages 67 et 138.

1.2.5.1 La voie adénylate cyclase-AMPC-protéine kinase A

Le GHRH-R étant un récepteur couplé aux protéines G, la liaison du GHRH active la sous unité $G_s-\alpha$ qui permet l'activation de l'adénylate cyclase. Suivant cette activation, les taux intracellulaires d'AMPC augmentent, ce qui conduit à la phosphorylation de la PKA, qui à son tour phosphoryle des cibles protéiques tels que les canaux calciques membranaires (Cuttler et coll., 1992; Lussier et coll., 1991). Des canaux sodiques insensibles à la tétrodothine et des canaux cationiques non-sélectifs sont également activés, menant à la dépolarisation de la membrane cytoplasmique et à une plus grande entrée de calcium (Kato et coll., 1992; Frohman, 1996) *via* l'activation de canaux calciques voltage-dépendants de types T et L (Anderson et coll., 2004). L'entrée de calcium extracellulaire permet la margination et l'exocytose des granules de sécrétion de la GH. L'augmentation d'AMPC joue aussi un rôle dans la prolifération des cellules somatotropes. En effet, l'utilisation de la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, stimule la prolifération de cultures primaires de somatotropes, de façon analogue au GHRH (Billestrup et coll., 1986).

La PKA, constituée de 2 sous-unités catalytiques et deux sous-unités régulatrices, subit un changement de conformation suite à la liaison de l'AMPC aux sites régulateurs provoquant un changement conformationnel des sous-unités régulatrices et la dissociation des deux sous-unités catalytiques, qui phosphorylent le facteur de transcription CREB (Brindle et Motminy, 1992). La protéine CREB est reconnue pour stimuler le facteur de transcription Pit-1, lequel déclenche la transcription du gène de la GH et du GHRH-R (Mayo et coll., 1996). En effet, deux motifs spécifiques à l'élément de réponse à l'AMPC sont retrouvés sur le promoteur du gène de la GH et un seul sur celui du GHRH-R (Peterssen et coll., 1998). D'autres études ont suggéré la présence d'un intermédiaire entre le facteur CREB et Pit-1. Ainsi, une protéine nucléaire ayant la capacité de lier le facteur CREB (CRB) pourrait interagir avec le facteur Pit-1 afin de contrôler l'expression du promoteur de la GH (Cohen et coll., 1999).

1.2.5.2 La voie des phosphatidylinositols/ diacylglycérol/ protéine kinase C

Une mobilisation intracellulaire de calcium est observée suite à une stimulation du GHRH-R par le GHRH, suggérant l'implication de la voie des phosphatidylinositols/ diacylglycérol (DAG)/PKC. La liaison du GHRH à son récepteur déclenche l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate (PIP₂), *via* la phospholipase C en inositol 2, 4, 5 triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). L'IP₃ contrôle la libération de calcium emmagasiné dans le réticulum endoplasmique alors que le DAG stimule la PKC. Cette dernière joue un rôle similaire à l'adénylate cyclase quant à l'élévation d'AMPc et à la stimulation de l'entrée du calcium extracellulaire (Frohman, 1996). Néanmoins, certaines études ont montré que la voie PKC n'est pas essentielle à la sécrétion de GH, contrairement à la voie de l'adénylate cyclase (French et coll., 1989 ; Lussier et coll., 1991).

Plusieurs stratégies ont été élaborées afin de comprendre la dynamique de cette voie de signalisation en lien avec la sécrétion de GH. L'utilisation de molécules activatrices de la PKC, tel que 4β-phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) et l'acétate de tétradécanoylphorbol (TPA) montrent un effet additif au GHRH, sur la sécrétion de GH, appuyant l'hypothèse selon laquelle cette voie est impliquée dans le système GH-GHRH (Ohmura et Friesen, 1985; Judd et coll., 1986). De plus, le PMA augmente la quantité d'AMPc produite dans les cellules de l'hypophyse antérieure de rat, suite à une stimulation au GHRH (Cronin et coll., 1986). Le phorbol 12,13-dibutyrate (PDB) provoque une augmentation des concentrations de calcium intracellulaires *via* l'activation de la PKC, dans les somatotropes (Holl et coll., 1989). Finalement, la phospholipase C, permettant la formation de DAG endogène, ainsi que le DAG synthétique, agissent en mobilisant le calcium intracellulaire afin d'augmenter la sécrétion de GH (Judd et coll., 1986).

1.2.5.3 La voie des MAPK

Les MAPK sont des protéines de la famille des sérine-thréonines kinase dont la principale fonction consiste en la phosphorylation et l'activation de facteurs nucléaires, sollicités dans la synthèse d'ADN et la division cellulaire. Leur implication a donc été proposé dans la prolifération des cellules somatotropes stimulées par le GHRH (Pombo et coll., 2000 ; Zeitler et Siriwardana, 2000). L'activation de la voie MAPK aurait lieu *via* les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G_s couplée au GHRH-R. Celle-ci serait indirecte et nécessiterait la présence de la protéine oncogénique $p21^{ras}$ ainsi que d'une kinase de l' IP_3 (IP_3K) (Pombo et coll., 2000). La stimulation de $p21^{ras}$ conduirait à l'activation de raf-1, une sérine-thréonine kinase qui phosphoryle les kinases de la famille MAPK/ERK (MEK) (Pombo et coll., 2000). Ces dernières ont le pouvoir de phosphoryler directement les MAPKs. Le rôle de l' IP_3K n'a pas encore été élucidé mais serait possiblement activé directement par les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G_s du GHRH-R (Pombo et coll., 2000). L'implication de la voie des MAPKs dans la prolifération stimulée par le GHRH a été confirmée dans une étude sur des lignées de cellules somatotropes (GH4), où la prolifération a été inhibée par le PD98095, un inhibiteur des MEKs (Zeitler et Siriwardana, 2000).

1.2.6 Régulation de l'expression du récepteur du GHRH.

Les changements dans la sécrétion de la GH qui surviennent au cours du développement post-natal, de la puberté ainsi que du vieillissement sont associés à des changements de niveaux de GHRH-R. Plusieurs hormones sont impliquées dans le contrôle de l'expression du GHRH-R telles que le GHRH, l'IGF-1, les hormones stéroïdiennes et les hormones thyroïdiennes.

1.2.6.1 GHRH et IGF-1

Le GHRH représente l'un des plus importants régulateurs du GHRH-R. Des études effectuées dans des cellules hypophysaires de rats nouveau-nés et adultes, traitées au GHRH, montrent des changements d'expression de l'ARNm du récepteur (Lasko et coll., 2001), suggérant une régulation du GHRH-R par son ligand endogène. La désensibilisation des somatotropes, résultant d'une exposition prolongée au GHRH contrôle à la baisse le nombre de sites de liaison du GHRH (Bilezikjian et coll., 1986). Une diminution significative de des niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire a également été mise en évidence dans l'hypophyse de rat nouveau-né, traité au GHRH durant une période de 10 jours (Horikawa et coll., 1996). Des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules hypophysaires de rat en culture, suite à un traitement de 4 h avec 0,1 ou 1 nM de GHRH, provoquant une diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R de manière concentration-dépendante (Aleppo et coll., 1997). Cet effet est spécifique au GHRH puisque qu'un pré-traitement à la GH n'affecte pas la production d'AMPc induite par le GHRH (Aleppo et coll., 1997). L'administration de 0,5 mg/kg de GHRH durant 14 j chez les rat de 2 mois permet d'augmenter le nombre de sites de liaison tandis qu'une injection de 1 mg/kg les diminuent. Chez le rat de 18 mois, seule l'administration de 1 mg/kg permet de restaurer les paramètres de liaison du GHRH-R similaires à ceux observés chez des rats de 2 mois, suggérant une régulation de l'affinité du GHRH-R pour le GHRH en fonction de l'âge (Girard et coll., 1999).

L'internalisation et l'adressage intracellulaire du GHRH-R sont également des mécanismes qui affectent les quantités de récepteurs disponibles à la surface de la membrane cytoplasmique. Des études d'internalisation, dans des cellules d'hypophyse antérieure de rat et dans des cellules BHK transfectées avec le GHRH-R humain (h) et de rat (r), ont montré que le hGHRH-R est internalisé de façon clathrine-dépendante, alors que le rGHRH-R est internalisé de façon cavéoline-dépendante (Veyrat-Durebex et coll., 2005). Une synthèse *de novo* de GHRH-R ainsi que leur recyclage à la membrane cytoplasmique sont nécessaires

dans les cellules somatotropes au maintien d'une concentration optimale de récepteurs fonctionnels, alors que dans les cellules BHK transfectées avec le GHRH-R, seule une synthèse *de novo* en assure le maintien (Veyrat-Durebex et coll., 2005). Par ailleurs, l'IGF-1 supprime l'expression du GHRH-R dans l'hypophyse antérieure en inhibant le facteur de transcription Pit-1 (Sugihara et coll., 1999). En effet, une diminution de des niveaux d'ARNm du facteur Pit-1 est observée suite à une stimulation avec l'IGF-1 dans la lignée cellules GH3 (Castillo et Aranda, 1997).

1.2.6.2 Les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes sont également des modulateurs de l'expression du GHRH-R. Les niveaux d'ARNm du GHRH-R chez la femelle jeune représentent 15% de ceux retrouvés chez le mâle (Ono et coll., 1995), traduisant ainsi un dimorphisme sexuel de la régulation du GHRH-R. Ce niveau d'expression du GHRH-R se traduit par une production plus faible de GH chez la femelle, ce qui pourrait expliquer sa croissance plus lente et son poids corporel inférieur à celui du mâle à l'âge adulte (Ono et coll., 1995). La castration chez le rat diminue les niveaux de GHRH-R suggérant que la testostérone joue un rôle dans la régulation de l'expression du récepteur (Ono et coll., 1995). Une stimulation aux œstrogènes diminue également des niveaux d'ARNm du GHRH-R dans l'hypophyse du rat mâle, démontrant que les œstrogènes régulent négativement l'expression du GHRH-R hypophysaire (Lam et coll., 1996).

Les hormones thyroïdiennes T_3 (Korytko et Cuttler, 1997) et T_4 (Miki et coll., 1995) augmentent également l'expression du gène du GHRH-R dans les cellules hypophysaires de rat. En effet, l'hypothyroïdie chez le rat diminue les niveaux d'ARNm du GHRH-R et de sa protéine (Miki et coll., 1995). Une administration de T_3 (Korytko et Cuttler., 1997) et T_4 (Miki et coll., 1995) palie à ce problème en agissant directement sur le gène du GHRH-R dans les cellules hypophysaires de rat. Une hypothyroïdie de trois semaines, reconnue pour diminuer les transcrits de 2,5 et 4 kb d'ARNm du GHRH-R, affecte la concentration des complexes

immunoréactifs de 65- et 47-kDa, en les diminuant de 1,3 et 3,5 fois, respectivement. Des diminutions de la capacité maximale des sites de liaison à haute et basse affinité sont également observés de 4,6 et 15,2 fois, respectivement (Boulanger et coll., 1999).

Un traitement à la dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, augmente l'ARNm du GHRH-R hypophysaire chez le rat, suggérant une régulation de l'expression du gène du GHRH-R par les glucocorticoïdes (Lam et coll., 1996 ; Miller et Mayo, 1997). L'inhibition de la transcription par l'actinomycine D bloque cet effet, indiquant que les modifications sont de nature transcriptionnelle (Miller et Mayo, 1997). Il a aussi été rapporté dans des cellules MtT/S en culture ainsi que dans des cellules d'hypophyse fœtale de rat que l'administration de l'acide rétinoïque ou l'hormone thyroïdienne T_3 , avec la dexaméthasone produit un effet synergique qui augmente l'expression de l'ARNm du GHRH-R (Nogami et coll., 2000).

1.2.6.3 Conditions physiologiques et pathologiques

Les niveaux de GHRH-R sont contrôlés de façon différentielle à chaque étape du développement, de la naissance à la puberté, où ils atteignent les taux les plus hauts, puis à l'âge adulte où débute une diminution avec l'âge. Le vieillissement est donc caractérisé par une diminution des niveaux de GHRH-R. Dans l'hypophyse antérieure de rats de 8 mois, la diminution du nombre de sites de liaison à haute affinité du GHRH constitue la première modification survenant au récepteur. Elle est suivie d'une augmentation du nombre de sites à basse affinité à 14 mois. Chez les rats âgés de 18 mois, les sites à haute affinité sont complètement émoussés et une réduction du nombre total de sites de liaison est présente (Aribat et coll., 1991; Lefrançois et coll., 1995). Les effets du vieillissement sur la protéine se traduisent par une diminution des entités de 65 et 47 kDa (Gaudreau et coll., 1999b). Les niveaux d'ARNm du GHRH-R sont également affectés par le vieillissement. Chez les rats de 18 mois, le transcrit de 4 kb est augmenté de 1,5 à 2 fois dans la totalité hypophysaires étudiées

(Gaudreau et coll., 1999a). Une étude de Shimokawa et coll. (2000) a confirmé par RT-PCR la diminution progressive des niveaux d'ARNm du GHRH-R, chez des rats de 6 à 24 mois. Ces résultats suggèrent que ces altérations du GHRH-R puissent être responsables de la diminution de sécrétion de GH observée durant le vieillissement.

L'impact du diabète de type 1 sur l'axe somatotrope a été étudié au cours des dernières décennies. Chez les rats diabétiques, une diminution de la sécrétion de GH et la perte des pics de sécrétion de haute amplitude ont été mises en évidence (Tannebaum, 1981). Elles impliqueraient au niveau hypophysaire, une diminution du nombre de somatotropes (Boujon et coll., 1995), du niveau d'ARNm de la GH et du contenu immunoréactif en GH (Bedo et coll., 1991), ainsi qu'une diminution des niveaux d'ARNm du récepteur de la GH (GH-R) (Busiguina et coll., 2000). Les niveaux hypothalamiques d'ARNm de GHRH et la sécrétion de GHRH sont également réduits au cours du diabète (Olchosvsky et coll., 1990). Une étude sur des rats traités à la streptozotocine (STZ) a montré que le contenu hypothalamique en GHRH augmente de 2 à 4 jours après l'induction du diabète, retourne à des niveaux normaux après 7 jours puis diminue par la suite (Leidy et coll., 1995). Une étude récente, chez des rats traités à la STZ (dose unique intrapéritonéale (ip) de 80mg/kg de poids corporel), un agent alkylant de la famille des nitroso-urées qui détruit les cellules β -pancréatiques, a montré une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH-R détecté par RT-PCR (Kim et coll., 2006). Une étude menée dans notre laboratoire, en utilisant des rats traités à la STZ en dose unique ip de 100 mg/kg (évaluation 2 et 21 jours post-injection) ou de 65 mg/Kg (évaluation 60 jours post-STZ) a mis en évidence une dynamique de changement tissu-spécifique des niveaux d'ARNm du GHRH-R et des complexes ^{125}I -GHRH-GHRH-R (Voir manuscrit 1).

1.3 GLUCOTOXICITÉ CELLULAIRE

1.3.1 Définition de la glucotoxicité

Le glucose est le principal substrat métabolique utilisé par la cellule comme source énergétique. Chez l'homme, les valeurs normales de glucose sanguin à jeun sont en dessous de 5.7 mM (Association Canadienne du Diabète, www.diabetes.ca). Lorsque la glycémie à jeun se situe entre 5.7 et 6.9 mM, un dépistage du diabète s'avère nécessaire afin d'identifier des stratégies de prévention de la maladie (Association Canadienne du Diabète, www.diabetes.ca). L'hyperglycémie et le diabète se caractérisent par une concentration de glucose sanguin à jeun dépassant 7 mM (Association Canadienne du Diabète, www.diabetes.ca). Les conséquences d'une hyperglycémie chronique tels que les états pré-diabétiques non diagnostiqués et les diabètes mal contrôlés sont multiples. En effet, il est établi que l'hyperglycémie chronique est responsable de complications diabétiques telles que la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie (Brownlee, 2003).

La glucotoxicité cellulaire est décrite comme étant l'ensemble des effets délétères d'une hyperglycémie sur la structure et la fonction des cellules de différents tissus de l'organisme (Robertson et Harmon, 2006). Ses effets sur la cellule apparaissent de manière lente et progressive, suite à une exposition prolongée à des concentrations élevées de glucose (Poitout et Robertson, 2002). Le concept de glucotoxicité est largement utilisé pour décrire les effets du diabète de type 2 sur la cellule β -pancréatique (Brownlee, 2003 ; Robertson et coll., 2003).

L'hyperglycémie affecte également l'axe somatotrope et plus précisément la sécrétion de la GH (Tannenbaum et Martin, 1976). Chez des sujets normaux, une ingestion de glucose abaisse les concentrations sériques de GH de façon significative, 45 à 60 min après l'ingestion (Shibasaki et coll., 1989). Le même type de résultat a été observé en utilisant des cultures primaires de cellules d'hypophyse antérieure de rat Sprague Dawley exposées de façon prolongée (72

h) à des concentrations élevées de glucose (22 mM) (Renier et Serri, 1991). De plus, des injections intraveineuses de glucose, répétées aux 5 h chez des rats Wistar, ont démontré une augmentation de l'ARNm hypothalamique du préproGHRH, possiblement due à un mécanisme compensatoire à la diminution de sécrétion de GH (Murao et coll., 1994).

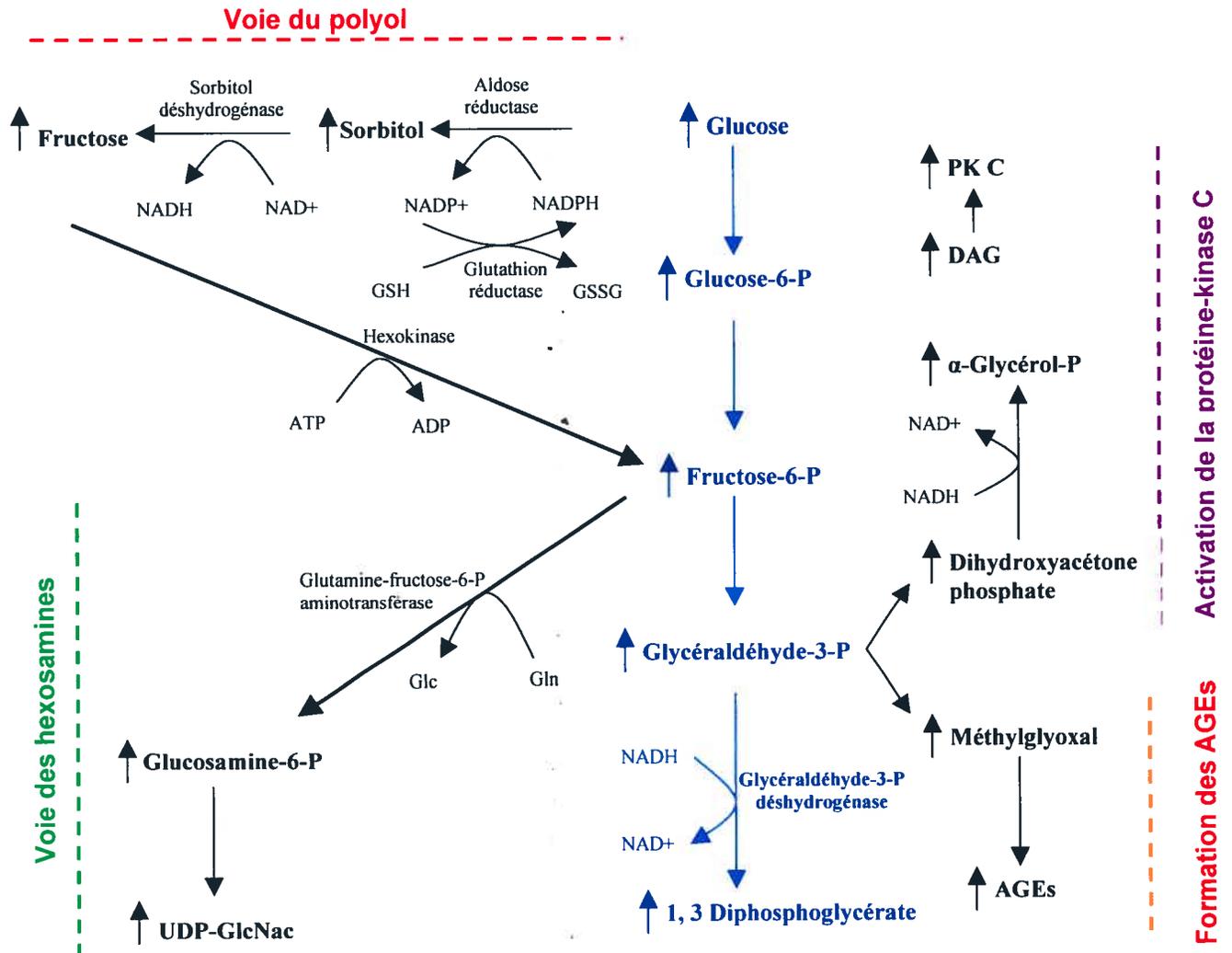
1.3.2 Mécanismes de la glucotoxicité

Jusqu'à présent, quatre importants mécanismes stimulés par l'hyperglycémie et contribuant à la glucotoxicité cellulaire ont été suggérés ; la voie du polyol, la formation des AGEs (produits avancés de la glycation), l'activation de la protéine-kinase C et la voie des hexosamines (Rolo et Palmeira, 2006). Ces voies ont une finalité commune ; la génération des espèces réactives à l'oxygène (ROS).

1.3.2.1 Voie du polyol

La voie du polyol est présente dans les tissus non dépendants de l'action de l'insuline soit le rein, l'œil et le tissu nerveux. Elle transforme le glucose en sorbitol à l'aide de l'enzyme aldose réductase. Cette réaction nécessite l'utilisation de NADPH en grande quantité pénalisant la régénération des systèmes glutathion ce qui favorise l'accumulation des ROS (Bonfont-Rousselot, 2002). L'augmentation de la synthèse de sorbitol en période d'hyperglycémie cause un dérèglement de l'osmolarité cellulaire dans la cornée, menant à la formation de cataractes (Mooradian et Thurman, 1999) et au niveau des nerfs, induisant la neuropathie (Obrosova, 2005)

Figure 4 : Mécanismes impliqués dans la glucotoxicité cellulaire



Tiré de Rolo AP, Palmeira CM 2006 Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol 212: 167-178.

1.3.2.2 Formation des AGEs

Les AGEs sont formés à partir d'associations et de réorganisations entre le glucose et des groupements aminés d'une protéine (Wolff et coll., 1991). Ces produits de réactions irréversibles stimulent la production de ROS, conduisant à l'augmentation de la LPO membranaire (Mullarkey et coll., 1990). Les récepteurs spécifiques aux AGEs (RAGE) sont présents dans plusieurs types cellulaires et sont également retrouvés dans la circulation sanguine sur les membranes des érythrocytes (Wautier et coll., 1994).

La liaison ligand-récepteur engendre un signal de stress oxydatif à la cellule qui enclenche l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Yan et coll., 1994). Les AGEs altèrent les caractéristiques structurales et fonctionnelles des protéines causant entre autres, la réticulation de protéines (Bonfont-Rousselot, 2002) et la formation d'agrégats de protéines emprisonnant quelquefois des lipoprotéines, comme dans le cas des cellules endothéliales (Mooradian et Thurman, 1999). En plus des protéines, les lipides (Bucala et coll., 1993) et les acides nucléiques (Bucala et coll. 1984) peuvent également être glycosylés.

1.3.2.3 Activation de la protéine kinase C

L'augmentation du glycéraldéhyde-3-phosphate lors de l'hyperglycémie mène à une plus grande synthèse de diacylglycérol (DAG) qui stimule la protéine kinase C (Robertson, 2004). Une activation accrue de la protéine kinase C provoque des perturbations, surtout au niveau microvasculaire, par l'augmentation du facteur de croissance transformant bêta (TGF- β), du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), de l'endotheline-1, du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) et des ROS (Brownlee, 2001). Dans la rétine de boeuf, il a été mis en évidence que la protéine kinase C active la phospholipase A2 cytosolique qui à son tour stimule l'acide arachidonique, résultant en l'inhibition de la Na⁺-K⁺-ATPase, importante pour le maintien de l'intégrité de la cellule vasculaire (Xia et coll., 1995).

1.3.2.4 Voie des hexosamines

Lorsqu'il se retrouve en excès, le fructose-6-phosphate se transforme en glucosamine-6-phosphate puis en uridine diphosphate-N-acetylglucosamine (UDP-N-GlcNAc) par la voie des hexosamines. En condition physiologique normale, environ 1-3% du glucose est métabolisé par cette voie (James et coll., 2002). En situation d'hyperglycémie, une augmentation de plus de deux fois de l'activité de la voie des hexosamines a été rapportée dans les cellules endothéliales d'aorte de bœuf (Du et coll., 2000). La formation de UDP-N-GlcNAc aurait pour conséquence l'activation du facteur de transcription de la *protein specific 1* (Sp1) induisant l'expression des cytokines de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) et TGF- β 1 (Du et coll., 2000).

1.3.3 Définition et mécanismes du stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme le déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants, générateurs de ROS et les systèmes anti-oxydants de la cellule. Il peut être causé par une augmentation de la production des ROS mais aussi par une diminution d'efficacité des systèmes antioxydants (Bonnetfont-Rousselot et coll., 2000).

Chez l'homme, les cellules métabolisent environ 10^{12} molécules d'oxygène par jour par la respiration normale et environ 1% de cet oxygène est transformé en ROS (Ikner et Shiozaki, 2005). Plusieurs types de ROS peuvent être formés ; l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le monoxyde d'azote (NO) et les radicaux hydroxyles (OH^-). Afin de contrer les effets négatifs de la production de ROS, les cellules possèdent plusieurs systèmes de défense antioxydants. Les enzymes antioxydants les plus importants sont les superoxydes dismutases (SOD) à manganèse (Mn) et à cuivre (Cu)/zinc (Zn), qui se retrouvent dans la mitochondrie et le cytosol, respectivement, ainsi que la catalase (CAT) localisée dans les peroxysomes, et la glutathione peroxydase (GPx) qui peut être cytosolique, nucléaire ou mitochondriale. La SOD catalyse la réaction de formation

d' H_2O_2 à partir du radical O_2^- , alors que la CAT réduit le H_2O_2 en H_2O et O_2 , grâce à un transfert d'électrons entre deux molécules d' H_2O_2 . Finalement, la GPx réduit le H_2O_2 en H_2O , en oxydant le glutathion (GSH à GSSG), lequel est régénéré en GSH grâce à la glutathione reductase. L'efficacité maximale de ces enzymes est liée à la présence de cofacteurs, incluant le sélénium pour la GPx, le cuivre, le zinc et le manganèse pour les SOD et le fer pour la CAT (Maritim et coll., 2003).

Plusieurs études ont consolidé l'hypothèse selon laquelle la présence d'une concentration élevée en glucose augmente la formation de ROS, déclenchant ainsi un stress oxydatif. Une augmentation de l'activité de l'enzyme NADPH oxydase et une diminution des niveaux de glutathion intracellulaires de deux fois ont été observées dans les cellules endothéliales de microvaisseaux coronariens de rats, cultivées dans un milieu à teneur élevée en glucose (22 mM) (Weidig et coll., 2004). Dans les neurones de ganglions rachidiens, la formation d'anions superoxydes et la LPO a également été démontrée, suite à une incubation d'une heure en présence de 45 mM de glucose (Vincent et coll., 2005). Une hausse de la production de ROS *via* la NADPH oxydase a également été détectée dans les cellules mésangiales de rat, suite à une exposition à une concentration de 33 mM de glucose (Hua et coll., 2003).

Une étude récente dans les cellules endothéliales aortiques bovines propose l'anion superoxyde comme élément central d'activation des différentes voies métaboliques dans des situations d'hyperglycémie. En effet, l'utilisation de l'inhibiteur du transport d'électron de la chaîne respiratoire mitochondriale, d'un découpleur de la phosphorylation oxydative, de la protéine découplante-1 ou de la MnSOD ont conduit à une suppression des voies des polyols, des hexosamines et de la PKC, de même que de la formation des AGEs (Nishikawa et coll., 2000). Au cours du diabète autant chez le rat que chez l'humain, une augmentation de la production des ROS (Ceriello, 2000) ou une baisse d'activité des systèmes antioxydants (GPx, CAT, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD) est détectée (Saxena et coll., 1993).

1.3.4 Conséquences du stress oxydatif

1.3.4.1 Peroxydation des lipides (LPO)

La production abondante de radicaux libres mène entre autres à la peroxydation des lipides (LPO), réaction en plusieurs étapes, dont l'initiation débute par l'action d'un radical hydroxyle qui soustrait un atome d'hydrogène d'une double liaison d'un acide gras polyinsaturé et se termine par la génération en chaîne de radicaux peroxydes qui se combinent à un hydrogène pour former des lipides hydroxyperoxydes (Gardner, 1989 ; Maritim et coll., 2003). Cette transmission continue peut être bloquée par la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique membranaire. La LPO génère plusieurs sous-produits dont l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) ainsi que le 4-hydroxynonéal (4-HNE) qui sont très utilisés comme marqueurs biologiques de l'état de stress oxydatif cellulaire (Marnett, 1999). Cette détérioration des lipides peut également se produire sur les lipoprotéines circulantes de faible densité (LDL) formant alors des LDL oxydées, lesquelles une fois captés par des macrophages, participeront à la formation des plaques athéromateuses (Girotti, 1998). Les attaques de la membrane lipidique cellulaire altèrent la fluidité membranaire (Hong et coll., 2004) et modifient ainsi le fonctionnement de plusieurs récepteurs membranaires et voies de signalisation (Van der Vliet et Bast, 1992).

1.3.4.2 Oxydation des protéines

L'agression des protéines par les ROS se traduit soit par une réticulation, des clivages de la protéine ou encore des modifications des chaînes latérales de certains acides aminés (aa) (Davies, 2001). Les protéines sont particulièrement oxydées lorsqu'elles possèdent des aa (Met, Cys) possédant un groupement sulfhydrile (SH) tel que plusieurs enzymes, transporteurs et récepteurs. L'oxydation des protéines mène à la perte de leurs fonctions biologiques (Dean et coll., 1997). Elles deviennent également plus hydrophiles et plus sensibles à la protéolyse (Davies, 2001).

1.3.4.3 Dommages à l'ADN

L'ADN est également une molécule très vulnérable à l'exposition aux ROS. Le stress oxydatif peut endommager l'ADN de façon directe, par l'oxydation des acides nucléiques ou du désoxyribose, ou de façon indirecte, par l'addition de composés formés durant la LPO. Le MDA et le 4-HNE sont les plus fréquents parmi ces molécules et réagissent avec les acides nucléiques, particulièrement la désoxy-guanosine pour former des produits d'addition (Marnett, 1999). Ces perturbations de l'ADN sont souvent prises en charge par les systèmes de réparation de l'ADN (Croteau et Bohr, 1997). Néanmoins la surcharge ou encore des dérèglements de ces systèmes peuvent entraîner de graves conséquences. Notamment des erreurs de la réplication de l'ADN, dues aux mutations ponctuelles, mènent à des protéines non-fonctionnelles ou encore à l'apoptose. Les dommages à l'ADN sont également mis en cause dans le développement de cancers (Feng et coll., 2003).

1.3.4.4 Dommages aux polysaccharides

Bien que moins étudié que les autres types d'oxydation, celle des polysaccharides n'en demeure pas moins importante. En effet, les ROS peuvent attaquer les mucopolysaccharides, en particulier les protéoglycans renfermés dans la matrice du cartilage articulaire favorisant le développement de l'arthrose (Yudoh et coll., 2005). Les radicaux hydroxyles agissent en soustrayant un hydrogène aux carbones de la molécule de glucide brisant ainsi la chaîne moléculaire.

1.4 STRATÉGIES NUTRITIONNELLES

1.4.1 Restriction calorique modérée de longue durée

De nombreuses études ont porté sur les relations entre la nutrition et le vieillissement chez l'animal. Il est maintenant acquis qu'une consommation excessive de calories provoque des effets délétères à l'organisme menant à l'obésité, au cancer, au diabète, à l'athérosclérose et accélère les détériorations physiologiques reliés au vieillissement (Gracia, 2006 ; Bengmark, 2006). La notion de restriction calorique a été abordée en 1935 (McCay et coll., 1935) et se définit comme étant une diète réduite en calories, sans malnutrition. Actuellement, la restriction calorique modérée de longue durée représente la stratégie la plus efficace pour prévenir ou retarder les maladies reliées au vieillissement et allonger l'espérance de vie moyenne et maximale (McCay et coll., 1935; Heilbronn et Ravussin, 2003).

Les mécanismes par lesquels la restriction calorique exerce ses effets bénéfiques sont en voie d'investigation. Étant donné les nombreux changements biologiques déclenchés par la restriction calorique, plusieurs hypothèses ont été proposées pour tenter de les expliquer. La diminution du stress oxydatif (Sohal et Weindruch, 1996), de la glycation (Kristal et Yu, 1992) et de l'activité métabolique (Walford et Spindler, 1997) ainsi que l'altération de l'expression génique, de la dégradation des protéines (Van Remmen et coll., 1995) et finalement les changements du système neuroendocrinien (Nelson et coll., 1995) en sont quelques exemples. Le niveau d'activité métabolique et de stress oxydatif vont habituellement de pair, considérant qu'une diminution du rythme de la consommation d'oxygène diminue la quantité de stress oxydatif générée. Ainsi, une étude menée chez des singes rhesus, soumis à une restriction calorique durant 11 ans, a montré une réduction de la dépense énergétique de l'ordre de 13% (Blanc et coll., 2003). Dans les hépatocytes de rats et les cellules HeLa, cultivées en présence de sérum provenant de rats ayant été soumis à une restriction calorique de 6 à 12 mois, une réduction du potentiel membranaire

mitochondrial parallèle à une diminution de la présence de ROS a été observée (López-Lluch et coll., 2006).

Plusieurs faits expérimentaux indiquent que le vieillissement est accompagné d'une accumulation de radicaux libres, menant à des dommages oxydatifs cellulaires. Suite à une restriction calorique modérée, une diminution de la production mitochondriale de H_2O_2 et une réduction des dommages oxydatifs à l'ADN est observée dans le foie, le cœur, le muscle squelettique et le cerveau de rat âgé (Gredilla et Barja, 2005). De plus, les concentrations d'enzymes antioxydants, tel que la superoxyde dismutase CuZn, la catalase et la glutathione peroxydase sont augmentés dans le foie de rats de 21 à 28 mois en restriction calorique de 40% (Rao et coll., 1990). La restriction calorique modérée, de longue durée, diminue également le niveau des résidus carbonyles dans le cerveau de rats âgés (Forster et coll., 2000).

La restriction calorique exercerait également un rôle bénéfique dans le maintien de la fonction somatotrope. Chez les rats âgés soumis à la restriction calorique, le profil de sécrétion de la GH s'apparente à celui des rats jeunes (D'Costa et coll., 1993). Une augmentation du niveau de phosphorylation de la JAK2 kinase et de l'activité des MAPKs, deux éléments nécessaires à la transduction des signaux par le GH-R, a également été mise en évidence dans le foie (Xu et Sonntag, 1996). Une restriction calorique de 40%, appliquée à partir de l'âge de 8 mois chez le rat Sprague-Dawley, suggère un rôle protecteur du GHRH-R. En effet, la restriction calorique permet le maintien des paramètres de liaison du GHRH retrouvée dans l'hypophyse antérieure de rats jeunes, mais absents chez les rats de 18 mois nourris *ad libitum* (Girard et coll., 1998). Les niveaux de transcrits d'ARNm du GHRH-R de 2,5 et 4 kb sont également restaurés à ceux des rats jeunes (Gaudreau et coll., soumis 2006). Shimokawa et coll. (2000) ont montré que les niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire, quantifié par RT-PCR, étaient diminués avec le vieillissement dans l'hypophyse de rat et légèrement augmentés par la restriction calorique. De plus, une augmentation des niveaux d'ARNm de la

GH a été montrée dans l'hypophyse antérieure de rat, en situation de restriction calorique (Han et coll., 2001).

Étant donné les nombreux gènes modulés par la restriction calorique, plusieurs travaux d'expression génique par biopuces d'ADN ont été effectués afin de mettre en évidence les différents mécanismes responsables des effets biologiques positifs de cette stratégie nutritionnelle. Une étude comparative de l'expression génique, dans le foie de souris âgées nourries *ad libitum* ou soumises à une restriction calorique de longue durée a démontré une expression différentielle significative de 6 des 588 gènes étudiés. Seul le gène de l'inhibiteur 2 de la kinase cycline dépendante (Cdkn 2c), un gène mitogénique, était modifié par le vieillissement et cette modification était atténuée par la restriction calorique (Han et coll., 2001). Une étude similaire réalisée dans le muscle *gastrocnemius* de souris a montré que l'expression de plusieurs gènes affectés au cours du vieillissement était complètement (33 gènes) ou partiellement restaurée par la restriction calorique (38 gènes). Dans cette même étude, la restriction calorique augmentait de 1,8 fois et plus l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans le contrôle du métabolisme énergétique (glucose-6-phosphate isomérase, fructose 1.6 biphosphatase et transketolase) et dans la synthèse et le *turnover* protéique (activateur du protéasome PA28, protéine ribosomale 60s L23 et facteur d'élongation 1-gamma) (Weindruch et coll., 2001). Une étude dans le cœur de souris a montré que la restriction calorique prévenait complètement les changements de niveaux de certains gènes provoqués par le vieillissement. A titre d'exemple, l'augmentation d'expression des gènes codant pour plusieurs membres de la famille du collagène et la phosphofructokinase, ainsi que la diminution de celle du PDK4 (pyruvate déshydrogénase kinase 4) au cours du vieillissement, sont normalisés par la restriction calorique (Lee et coll., 2002). Une étude récente sur le muscle squelettique de singes rhésus a mis en évidence des effets de la restriction calorique sur les gènes codant pour des protéines structurales, ceux du cytosquelette et de la fonction mitochondriale. Toutefois, le patron d'expression des gènes régulés par le vieillissement n'a pas été modifié par la restriction calorique (Kayo et coll., 2001).

Le gène du *peroxisome proliferator activated receptor gamma* (PPAR γ) a été proposé comme molécule clé dans la régulation génique initiée par la restriction calorique (Corton et coll., 2005). PPAR γ exerce plusieurs rôles, entre autres, dans la régulation des gènes de la gluconéogénèse, le transport des acides gras et la β -oxydation, la réponse au stress et la réparation tissulaire (Corton et coll., 2000). Chez la levure, le gène du *silent inductor regulator* (SIR2) est impliqué dans la prolongation de la durée de vie suite à une restriction calorique (Yamaza et coll., 2002). Son analogue chez les mammifères, le *silent mating type information regulation 2 homolog* (Sirt1), qui augmente la sécrétion d'insuline, peut réguler négativement l'adipogénèse via le blocage de l'expression de PPAR γ et ainsi diminuer les réserves lipidiques (Picard et coll., 2004). Comme une diminution de la masse adipeuse peut augmenter la durée de vie (Guarente et Picard, 2005), il a été suggéré que l'activation de Sirt1 soit un mécanisme responsable de certains effets bénéfiques de la restriction calorique. Une étude dans des cellules embryonnaires rénales humaines a montré une expression de Sirt1 deux fois plus élevée, lorsqu'elles sont supplémentées avec du sérum provenant d'animaux soumis à une restriction calorique (Cohen et coll., 2004).

Quelques essais d'implantation de la restriction calorique à long terme chez l'humain ont été effectués. Le projet Biosphère 2, qui a étudié les effets de la restriction calorique sur une période de deux ans, a pu montrer des diminutions significatives des facteurs de risques associés aux maladies cardiovasculaires, des marqueurs d'inflammation et des concentrations d'insuline et de glucose à jeun (Verdery et Walford, 1998). Une évaluation des effets d'une restriction calorique de six mois sur les marqueurs de longévité a été réalisée dans l'étude CALERIE (Comprehensive Assessment of the Long Term Effects of Reducing Intake Energy), révélant une diminution des concentrations sériques d'insuline, de la dépense énergétique au repos, de la température corporelle, des concentrations de T₃ et des dommages à l'ADN chez des adultes âgés de 30 à 45 ans (Heilbronn et coll., 2006).

1.4.2 Alimentation riche en antioxydants

L'un des moyens de contrer le stress oxydatif généré par l'hyperglycémie est d'augmenter les défenses antioxydantes. En effet, une étude menée sur des patients atteints de diabète de type 1 a indiqué une diminution de la capacité totale antioxydante de l'ordre de 16% par rapport à des sujets sains (Vessby et coll., 2002). La réduction du stress oxydatif par des stratégies nutritionnelles demeure une hypothèse controversée (Yeum et coll., 2003). Néanmoins, de nombreuses études d'intervention ont montré que la prise d'antioxydants naturels, provenant de l'alimentation ou de suppléments vitaminiques, augmente la capacité antioxydante chez l'homme (Miller, 1998). Ainsi, plusieurs groupes d'aliments dits « fonctionnels » ont la propriété de réduire les risques de cancer et de maladies cardiovasculaires par le biais de leurs propriétés antioxydantes (Hasler, 2000). Ces aliments possèdent des composantes qui leur confèrent leur pouvoir antioxydants et qui peuvent être classés en trois groupes: les vitamines, les minéraux et les phytonutriments.

1.4.2.1 Les vitamines

Selon plusieurs études, les vitamines antioxydantes et suppléments vitaminiques aident à réduire les marqueurs de stress oxydatif et la LPO membranaire chez les sujets diabétiques et chez les animaux (Rahimi et coll., 2005 ; Seven et coll., 2004). Jusqu'à présent, les vitamines les plus étudiées pour leur grand pouvoir antioxydant sont les vitamines C et E.

La vitamine C, ou acide ascorbique, est une molécule à caractère hydrophilique dont la fonction principale est de détruire les radicaux libres particulièrement les groupements hydroxyles. Il participe également à la régénération de la vitamine E, augmente les taux de glutathion et protège le groupement thiol des protéines contre l'oxydation (Rahimi et coll., 2005). Il a été rapporté que la vitamine C réduit de façon significative la formation de 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), principal marqueur de dommages à l'ADN,

dans les cellules de thymus de veau en culture, exposées au peroxyde d'hydrogène (Fischer-Nielsen et coll., 1992). L'addition de vitamine C à l'eau de consommation (2% poids/volume) chez des rats traités à la STZ atténue l'hyperglycémie, l'hyperlipidémie, les concentrations d'hémoglobine glyquée ainsi que la production de corps cétoniques (Clarke et coll., 1996). De plus, Ahn et coll. (2006) ont montré que l'administration orale de vitamine C (20mg/100g de poids/jour durant 4 semaines) permet une normalisation complète des niveaux de radicaux libres (ROS) dans le foie de rats diabétiques et réduit partiellement les ROS dans le rein, mais n'a aucun effet dans le cerveau et le pancréas. Plusieurs fruits et légumes, tels que le poivron rouge, les fraises, les agrumes ainsi que le brocoli contiennent une teneur appréciable en vitamine C (Nutrition et alimentation, Santé et services sociaux du gouvernement du Québec, <http://msssa4.msss.gouv.qc.ca>).

La vitamine E, ou α -tocophérol, est de nature lipophile et interfère, de façon importante, dans la LPO membranaire. Elle protège également les LDL, les protéines membranaires et l'ADN de l'oxydation et de la détérioration de la membrane (Fang et coll., 2002). Il a été récemment montré que la vitamine E diminue la LPO dans le foie de rats traités à la STZ (Seven et coll., 2004). Chez les patients atteints de diabète de type 1, une augmentation des concentrations de glutathion (9%), ainsi qu'une diminution de malondialdéhyde (MDA) (23%), un marqueur de la LPO, ainsi que d'hémoglobine glyquée (16%) ont été observées dans les érythrocytes, suite à un traitement de trois mois à la vitamine E (Jain et coll., 2000). La vitamine E prévient également la formation des produits de glycation avancés (AGEs) induite par des concentrations élevées de glucose (30 mM) dans les cellules endothéliales cardiaques bovines (Giardino et coll., 1996). Les huiles de noix, les noix, l'avocat et la papaye sont des aliments riches en vitamine E (Nutrition et alimentation, Santé et services sociaux du gouvernement du Québec, <http://msssa4.msss.gouv.qc.ca>). Toutefois, l'étude HOPE-TOO (Heart Outcomes Prevention Evaluation-The Ongoing Outcomes), une étude longitudinale d'une durée moyenne de 7.2 ans, chez des sujets âgés de 50 à 75 ans ayant des risques connus de maladies cardiovasculaires, a démontré que la prise de

vitamine E (400 IU/j) ne réduisait pas les risques d'événements cardiovasculaires ni les cancers (Lonn et coll., 2005). Bien que ces résultats ne soient pas en accord avec les autres études biologiques portant sur les effets de la vitamine E, la force de l'étude HOPE-TOO réside dans son devis de type longitudinal ainsi que dans le grand nombre de sujets évalués (3994). Il faut cependant noter que les sujets étaient âgés et présentaient déjà des facteurs de risques de maladies cardiovasculaires. Il est donc possible qu'un traitement à la vitamine E, même d'une durée de 7 ans, soit insuffisant pour renverser les effets délétères accumulés au niveau du système cardiovasculaire durant plusieurs décennies. Il serait donc d'intérêt d'effectuer une telle étude chez des sujets en santé et plus jeunes pour vérifier si la vitamine E peut prévenir le développement de pathologies cardiovasculaires.

D'autres vitamines sont également impliquées dans la lutte contre le stress oxydatif telles que la vitamine A, la vitamine D3, la vitamine K2 et la niacine. Ces vitamines réduisent la formation de monoxyde d'azote (NO) dans plusieurs types cellulaires et préviennent donc la cytotoxicité reliée au stress oxydatif (Fang et coll., 2002).

1.4.2.2 Les minéraux

Les minéraux sont indispensables dans le fonctionnement des systèmes antioxydants. Le magnésium, le cuivre, le zinc, le manganèse et le sélénium sont des co-facteurs des enzymes clés dans les systèmes protecteurs de stress oxydatifs. Le magnésium est un cofacteur d'enzymes du cycle des pentose-phosphates, la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la 6-phosphogluconate, qui génèrent la transformation de NADP⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), en NADPH (forme réduite) (Leopold et coll., 2003). De ce fait, une carence en magnésium entraînerait une diminution de l'activité de la glutathion réductase et une hausse de stress oxydatif. Une augmentation de la production de radicaux hydroxyles a d'ailleurs été démontrée dans le muscle squelettique de rat suite à une déficience sévère en magnésium (Rock et coll., 1995). Le cuivre, le

zinc et le manganèse sont essentiels dans la formation des deux superoxydes dismutases (SOD) (CuZn-SOD et Mn-SOD). Ainsi, chez les rats nourris avec une diète déficiente en zinc, on remarque une augmentation des taux de MDA dans le sang, le pancréas et le foie ainsi qu'une diminution de l'enzyme CuZn-SOD dans le sang et le foie (Shaheen et El-Fattah, 1995). De même, tous les enzymes glutathion peroxydases (GPx) ont besoin de sélénium pour exercer leurs fonctions. Une étude chez le rat diabétique a mis en évidence qu'une déficience en sélénium amène une diminution des niveaux d'ARNm de GPx dans le glomérule rénal (Reddi et Bollineni, 2001). Le sélénium est également un cofacteur de la sélénoprotéine P dont le rôle est de détruire les peroxy-nitrites formés par les cellules phagocytaires à partir de NO en situation de réponse inflammatoire (Klotz et Sies, 2003).

1.4.2.3 Les phytonutriments

Les composés phénoliques sont retrouvés dans les céréales, certains légumes et fruits, les noix, l'huile d'olive, le thé vert et le vin rouge. Les flavonoïdes, appartiennent à la grande famille des polyphénols, et sont présentes dans toutes les parties des végétaux supérieurs. Leur principale fonction est la pigmentation des plantes et ils sont reconnus pour leur fort pouvoir antioxydant (Fang et coll., 2002). Par exemple, l'administration de vin rouge à des rats diabétiques permet un rétablissement des niveaux d'enzymes antioxydantes tels que la catalase, la SOD et la GPx ainsi qu'une diminution de la LPO dans le cerveau et le rein (Montilla et coll., 2005). L'extrait de pépins de raisins, contenant la proanthocyanine, augmente également l'activité de la SOD dans le cerveau de rats et diminue les taux de MDA (Devi et coll., 2006). Le thé vert s'est montré efficace pour éliminer les superoxydes et les radicaux hydroxyles et protéger les LDL de l'oxydation chez les rats hypercholestérolémiques (Yokozawa et coll., 2002). Une récente étude chez des sujets humains (hommes et femmes) de tous âges (22 à 63 ans) a montré que l'ingestion quotidienne de thé vert durant trois semaines augmente la capacité antioxydante (TAS) et réduit les concentrations de MDA et 4-hydroxynonanal (4-HNE; marqueur de la LPO) dans le sérum (Coimbra

et coll., 2006). Une multitude d'études portant sur les fèves de soja lui ont attribué un rôle hypocholestérolémiant et réducteur de stress oxydatif. A titre d'exemple, une étude clinique chez des sujets hypercholestérolémiques, a montré une augmentation de 10% de la capacité antioxydante après une diète riche en soja ainsi qu'une diminution de l'oxydation des protéines dans le plasma (Vega-López et coll., 2005). D'autres études ont été effectuées avec le jus de raisin (Shukitt-Hale et coll., 2006), le jus de pomme (Tchantchou et coll., 2004), les extraits d'ail (Dhawan et Jain, 2005) et différentes baies (Kahkonen et coll., 2001) mettant en évidence leur pouvoir antioxydant.

Les caroténoïdes, en particulier le β -carotène, réagissent avec les radicaux peroxydes pour former une structure stable, bloquant ainsi les effets provoqués par les ROS (Iannone et coll., 1998). Le β -carotène est aussi appelé provitamine A, pour sa capacité à se transformer en vitamine A dans l'organisme (Iannone et coll., 1998). Le lycopène, composé de la famille des caroténoïdes retrouvé dans la tomate, est le plus abondant dans le plasma (Rao et Agarwal, 2000). Des études associatives ont suggéré que le lycopène exerçait des effets protecteurs contre certains types de cancers, tel que le cancer de la prostate, et les maladies cardiovasculaires, en protégeant les lipides, protéines et acides nucléiques du stress oxydatif (Agarwal et Rao, 2000). Une diète riche en lycopène imposée durant une semaine à des sujets sains a démontré une diminution de la LPO et de l'oxydation des LDL (Agarwal et Rao, 1998). Par ailleurs, les extraits de brocoli, renfermant une grande quantité d'isocyanates, sont des stimulateurs d'enzymes antioxydants tels que la glutathion-S-transférase et la NADPH quinone réductase *in vitro* (Fahey et coll., 1997).

Finalement, les propriétés antioxydante du curcuma, une épice utilisée dans la cuisine indienne, ont été découvertes récemment, bien qu'il soit utilisé depuis des siècles par les indigènes dans le traitement des processus inflammatoires (Osawa et Kato, 2005). En effet, ces capacités antioxydantes ont été étudiées dans les fibroblastes de souris, montrant qu'il provoque une diminution de la LPO et une réduction des anions superoxydes et radicaux hydroxyles en situation

d'hypoxie cellulaire (Ruby et coll., 1995). Il a également été rapporté que le curcuma augmente l'activité hème oxygénase-1 dans les cellules endothéliales vasculaires bovines, suggérant un rôle protecteur dans les maladies cardiovasculaires (Motterlini et coll., 2000). Chez les rats diabétiques, le curcumin semble retarder la formation de cataractes en diminuant la production de MDA et le dommage aux protéines dans le cristallin (Suryanarayana et coll., 2005).

2 JUSTIFICATION DE L'ÉTUDE

Dans les cellules somatotropes, le GHRH et son récepteur sont responsables de la synthèse et sécrétion de GH. Au cours du vieillissement, la concentration circulante de GH ainsi que l'amplitude des pics de sécrétion de GH diminuent. Ce phénomène est lié à une perte de sensibilité des cellules somatotropes au GHRH (Sonntag et coll., 1980; Deslauriers et coll., 1991). Des modifications des niveaux de transcrits d'ARNm du GHRH-R sont également observées (Gaudreau et coll., 1999b; Gaudreau et coll., 2006), menant à une diminution significative de l'affinité de liaison du GHRH à son récepteur et de la concentration de GHRH-R fonctionnels (Atribat et coll., 1991 ; Gaudreau et coll., 2006).

L'axe somatotrope est également affecté au cours de l'évolution du diabète de type 1. Une étude sur des rats diabétiques de type-1 a montré une augmentation du contenu hypothalamique en GHRH de 2 à 4 jours après l'induction du diabète, une normalisation de ces niveaux après 7 jours puis une diminution par la suite (Leidy et coll., 1995). Les niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire et de complexes ^{125}I -GHRH-GHRH-R subissent plusieurs modifications selon la durée et la sévérité du diabète. Il en résulte une augmentation de GHRH-R fonctionnel lors d'un diabète de 2 et 21 jours et une diminution dans le cas d'un diabète de 60 jours (Article 1).

Ainsi, il existe des similarités dans la régulation des niveaux de GHRH-R hypophysaire entre le vieillissement et le diabète de type 1. Comme, une augmentation significative des taux de glucose sériques et la présence d'une résistance à l'insuline sont présentes chez les rats âgés nourris *ad libitum* (Gaudreau et coll., 2006), la glucotoxicité modérée, mais de longue durée, pourrait constituer l'un des mécanismes qui affecte la sensibilité des somatotropes au GHRH, *via* des altérations du GHRH-R. En utilisant des cultures primaires de cellules de tubules proximales de lapin, Park et Han (2002) ont montré que les niveaux d'ARNm et de protéines du récepteur de type 1 de l'angiotensine (AT1)

sont diminués suite à une exposition prolongée à des concentrations élevées de glucose (25 mM versus 6 mM). Le stress oxydatif, généré par la glucotoxicité a été proposé comme étant l'un des mécanismes impliqués dans cette régulation, en activant la voie PKC -TGF- β (Park et Han, 2002). Le récepteur AT1 étant de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, tel que le GHRH-R, il est raisonnable d'avancer que la glucotoxicité *via* la génération du stress oxydatif puisse affecter directement le GHRH-R dans les états diabétiques et au cours du vieillissement.

Ainsi, l'objectif principal de ce projet était la caractérisation et la quantification des effets *in vitro* de la glucotoxicité sur le GHRH-R hypophysaire, en fonction de la concentration de glucose et de la durée d'exposition. Un environnement natif, soit les cellules d'hypophyse antérieure de rats sains de 2 mois en culture primaire, a été utilisé comme modèle. Une mise au point des conditions optimales de culture des cellules d'hypophyse antérieure a été effectuée. Les concentrations de glucose dans le milieu de culture ont été sélectionnées afin de correspondre aux concentrations physio-pathologiques de glucose retrouvés chez le rat jeune (6 mM), âgé, nourris *ad libitum* (12 mM) et diabétique de type 1, non traité à l'insuline (33 mM). La participation du stress oxydatif au processus de glucotoxicité dans notre modèle *in vitro* a été mise en évidence, en mettant au point une mesure de la LPO membranaires en microscopie à fluorescence. Les effets de la glucotoxicité sur l'ARNm du GHRH-R ont été quantifiés par la technique de RT-PCR en temps réel. Les effets de la glucotoxicité sur la fonctionnalité du GHRH-R ont été étudiés en mesurant l'intensité de fluorescence internalisé d'un agoniste fluorescent hGHRH(1-29)NH₂, alors que la sensibilité des somatotropes au GHRH a été évaluée en mesurant le niveau basal d'AMPc immunoréactive et suite à une stimulation avec des concentrations croissantes de rGHRH(1-29)NH₂.

Le deuxième objectif était de déterminer, par une étude de régulation génique dans l'hypophyse et l'hypothalamus de rats jeunes et âgés nourris *ad libitum* ou âgés soumis à une restriction calorique modérée de longue durée (RCMLD) et ayant comme source de protéine alimentaire la caséine ou le soja, l'effet de l'apport calorique et de la qualité de l'apport protéique sur des familles de gènes reliés à la fonction somatotrope et au stress oxydatif. La RCMLD est reconnue pour permettre le maintien de la fonction somatotrope au cours du vieillissement et maintenir la balance anti-oxydante positive, alors qu'une alimentation riche en soja peut également contribuer à réduire les dommages cellulaires engendrés par le stress oxydatif (Vega-López et coll., 2005). Cette étude, dont l'analyse des résultats dépasse le cadre du présent projet, a comme finalité l'identification de marqueurs de vieillissement réussi ainsi qu'une contribution à l'élucidation de mécanismes moléculaires et cellulaires du vieillissement et l'élaboration de stratégies efficaces pour contrer ou ralentir les effets délétères du vieillissement sur la fonction somatotrope, particulièrement *via* le maintien d'une concentration optimale de GHRH-R fonctionnel.

2. MANUSCRITS

Titre de l'article : Regulation of the growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocin-diabetic rats: *in vitro* evidence for a direct effect of glucotoxicity

Auteurs: Julie Strecko*, Karine Bédard*, Karyne Thériault, Chantale Boisvert, Christelle Veyrat-Durebex, Sabrina Hoa et Pierrette Gaudreau

Participation : La totalité des expériences portant sur les effets de la glucotoxicité sur les cellules hypophysaires, de même que l'analyse des résultats ont été effectuées par Karine Bédard. La mise au point des conditions optimales de culture cellulaire ainsi que de plusieurs techniques utilisées dans cette étude (mesure de peroxydation des lipides, quantification de la production d'AMPc, évaluation de la consommation cellulaire de glucose, détermination des niveaux d'apoptose et de nécrose) ont été réalisés par Karine Bédard. L'induction du diabète, le suivi des colonies de rats diabétiques, ainsi que la quantification et caractérisation du récepteur hypophysaire et rénal du GHRH ont été réalisées par Julie Strecko. Sabrina Hoa, stagiaire d'été de niveau collégial, a collaboré à l'étude de la deuxième colonie de rats diabétiques. Chantale Boisvert, étudiante au doctorat en biochimie, a participé à l'étude de quantification des niveaux d'ARNm du récepteur rénal par protection à la RNase. Karyne Thériault, étudiante à la maîtrise en biologie moléculaire, a réalisé l'étude de déglycosylation et de dimérisation du récepteur du GHRH. Les études d'internalisation du GHRH-R ont été faites par Christelle Veyrat-Durebex, stagiaire post-doctorale, et Karyne Thériault avec la collaboration de Karine Bédard. Karine Bédard, Julie Strecko et Christelle Veyrat-Durebex ont participé à la rédaction du manuscrit. Pierrette Gaudreau a supervisé les étapes de réalisation de l'étude et a complété la rédaction de l'article.

Julie Strecko

Karyne Thériault

Chantale Boisvert

Christelle Veyrat-Durebex

Sabrina Hoa

Pierrette Gaudreau

ACCORD DES COAUTEURS

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Karine Bédard
M.Sc. Sciences Biomédicales

2. Description de l'article

Strecko J*, **Bédard K***, Theriault K, Boisvert C, Veyrat-Durebex C, Hoa S, Gaudreau P.
Regulation the growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocin-diabetic rats:
in vitro evidence for a direct effect of glucotoxicity, *: equal contribution as first author.

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

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que
Karine Bédard inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour
titre "Glucotoxicité cellulaire comme modèle de vieillissement du récepteur
du facteur de libération de l'hormone de croissance"



Julie Strecko



Karyne Thériault

Chantale Boisvert

Christelle Veyrat-Durebex 

Sabrina Hoa



Pierrette Gaudreau

Regulation of the growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocin- diabetic rats: *in vitro* evidence for a direct effect of glucotoxicity

Julie Strecko*, Karine Bédard*, Karyne Thériault, Chantale Boisvert, Christelle Veyrat-Durebex, Sabrina Hoa 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

E-mail: [REDACTED]

Submitted to: Endocrinology, September 2006.

Running title: Regulation of the GHRH receptor in diabetic rats

Key words: GHRH receptor, Diabetes, Glucotoxicity, Anterior pituitary, Henle's loop, Northern blotting, RPA, RT-PCR, Cross-linking, Deglycosylation, Cell culture, Fluorescence imaging

*: Equal contribution as first author

ABSTRACT

The pituitary and renal GH/IGF-I systems are affected in type-I diabetes. The present study was designed to quantify GHRH receptor (GHRH-R) mRNA and protein levels in the pituitary and renal medulla of streptozotocin (STZ)-diabetic rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration. In the pituitary, 2 days post-STZ, the 2.5-kb GHRH-R mRNA transcript, coding for the functional receptor, was increased. Twenty-one days post-STZ, both the 2.5- and 4-kb transcripts were elevated, as well as the 72-kDa ¹²⁵I-GHRH-GHRH-R complex. Sixty days post-STZ, the 4-kb transcript remained elevated and a 2.2-fold decrease of the 45-kDa ¹²⁵I-GHRH-GHRH-R complex (functional receptor) was seen. In the renal medulla, GHRH-R mRNA levels declined 2 days post-STZ and subsequently returned to 71-77% of normal values. This was accompanied, 2 days post-STZ, by an increase of a 68-kDa ¹²⁵I-GHRH-GHRH-R complex, and at 21 days post-STZ, by an elevation of the 53-kDa complex (putative functional receptor). Either comparing cellular or systemic impacts of diabetes on GHRH-R mRNA and protein levels, the results suggest that glucotoxicity induces tissue-specific dysregulation of the GHRH-R. To strengthen this hypothesis, the effect of high glucose (33 mM versus 6 mM) was examined in rat anterior pituitary cultured cells. Membrane lipoperoxidation was observed post high glucose exposure (1-48 h). Moreover, GHRH-R mRNA levels diminished 1.3 times after 24 h, Fluo-GHRH internalization was marginal after 16-24 h and GHRH-induced cAMP levels were decreased 1.5-2.1 times after a 24-48-h culture period with high glucose. Altogether, these results support a direct effect of glucotoxicity on 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) (1-4) stimulates the production of intracellular cAMP (5), leading to GH secretion (6,7) and synthesis (7) as well as somatotroph proliferation (8). In addition to protein kinase (PK) A (9, 10), PKC (10) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) (11-12) pathways are activated by GHRH.

The GHRH receptor (GHRH-R) has been cloned in the anterior pituitary of several mammalian species (3, 13-15), including human normal and tumoral tissues (3, 16-18). It belongs to the subfamily B-III of GPCR, which also includes receptors for VIP, secretin, glucagon, GIP, PTH, calcitonin, CRF and PACAP (3). In rat and mouse pituitaries, the presence of \approx 2.5-kb and \approx 4-kb GHRH-R mRNA transcripts has been reported (3, 13). While the short and most abundant transcript is known to generate the 423-amino-acid (aa) functional GHRH-R (3, 19), the structure of the 4-kb transcript remains to be elucidated. Correlative evidence suggest that the ratio of 4/2.5-kb transcript may reflect the apparent concentration of high and low affinity GHRH binding sites in the rat pituitary (20). GHRH-R variants, with either a longer third intracytoplasmic loop than that of the 423-aa receptor (3) or a modified C-terminus (21), have been identified in this tissue. However, neither their precise concentration compared to the native GHRH-R nor

their ability to mediate cellular events, upon GHRH activation, has been studied in depth. In the rat pituitary, chemical cross-linking with ^{125}I -GHRH(1-44) NH_2 allowed to identify the presence of specific 27- and 42-kDa (22) or 28-, 47- and 65-kDa labeled entities (23). The 47-kDa entity corresponds to the functional GHRH-R (3), while the lower molecular weight entity is likely a proteolytic fragment of GHRH-R and the higher one, a glycosylated or dimeric form of the receptor (24).

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 (25). Up to now, the renal medulla is the sole tissue containing a sufficient concentration of GHRH-R mRNA to allow its detection without amplification (25, 26). The size of medullary GHRH-R mRNA transcripts is similar to that found in the pituitary (26). Thin limb Henle's loop (HL) cells represents the site of localization of GHRH-R mRNA and its functional receptor (26). Chemical cross-linking has shown that 65-, 55- and 38-kDa ^{125}I -GHRH(1-44) NH_2 -specific complexes are present in the renal medulla (24). It was proposed that the 55-kDa entity is a functional homologue of the 47-kDa pituitary GHRH-R, while lower and higher molecular weight entities would represent, as in the pituitary, a GHRH-R fragment and glycosylated or dimeric forms, respectively (24). This specific localization, as well as GHRH-R developmental and aging patterns of expression, suggest roles associated with proliferation, differentiation and/or water/electrolyte transport (26). Moreover, our preliminary results from high density micro-array, in purified thin limb cells

stimulated 4 h or not with GHRH(1-29)NH₂, strongly indicate that GHRH activation of the renal GHRH-R regulates sets of genes involved in cell proliferation and survival (to be published elsewhere).

Pituitary and renal GHRH-R mRNA levels are regulated in a complex manner by physiological (20, 26, 27) and hormonal status (20, 26, 28-33). Estrogens decrease pituitary GHRH-R mRNA levels while thyroid hormones and glucocorticoids increase them (28-33). 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 are decreased (34-37). This has been related in part to a marked reduction of hypothalamic preproGHRH mRNA levels from 17 to 60 days post-streptozotocin (STZ) administration (38, 39). A time-course study in STZ-diabetic rats has shown that hypothalamic GHRH content rises 2 to 4 days post-STZ administration, returns to normal after 7 days and declines thereafter (40). In this investigation, pituitary GH content and serum GH and IGF-I levels of diabetic rats decreased over time (40). Busiguina *et al.* also reported a decline of pituitary GH mRNA expression in long-term diabetic rats (39). Other studies have reported a greater *in vivo* (41) or *in vitro* (42) sensitivity of STZ-rat to GHRH, to induce GH secretion. These discrepancies could originate from variations in the duration and severity of diabetes as well as in STZ dosage and route of administration. 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 (43, 44) while IGF-I mRNA levels increased from day 1 to day 2, post-STZ administration (45), and returned to normal levels or decreased from day 4 (44, 45). Other reports showed that medullary GH-R, IGF-I and IGF-I receptor mRNA and protein levels were normal 7 days post-STZ administration (46) or that medullary IGF-I immunoreactivity was transiently increased 7 days post-STZ (47).

The pituitary and renal GHRH-R could also be affected during the evolution of diabetes and glucotoxicity may play an important role in cell sensitivity to GHRH. Since no study has yet examined directly the effect of glucotoxicity *in vivo* and *in vitro* on the GHRH-R, aims of the present study were to determine the time-course changes of GHRH-R mRNA and protein levels, in the anterior pituitary and renal medulla of 2-month-old rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration and to determine whether or not glucotoxicity represents a mechanism by which the GHRH-R is affected, using anterior pituitary cultured cells.

MATERIALS AND METHODS

Animal handling and streptozotocin administration

Two-month-old male Sprague Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, CA) (body weight (BW): 175-225 g) 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. The rats used to study the effects of streptozotocin-induced diabetes 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 the 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 standard 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) (39). 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 published data (39) and because normalization of serum glucose levels is possible in these conditions upon insulin treatment (39). This

intraperitoneal dose-range has also been shown to cause no general anterior pituitary or renal toxicity (39, 48), while intravenous administration of 100-200 mg/kg BW STZ results in GH secretory defect (49). 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. Glucose and ketones urine analyses were performed on a 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 anterior pituitaries and renal medullas were 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), 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 (23, 24). 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 (26). For cell culture, anterior pituitaries from 2-month-old healthy male Sprague Dawley rats 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 μ M Na_2HPO_4 , 11 mM D-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 3 medullas (1 medulla/5 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 (26). 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

pellet resuspended in HEPES-Ringer buffer. This step was repeated and the 2 supernatants were combined, centrifuged at 150 g for 10 min (4°C), washed three times in HEPES-Ringer and resuspended in cross-linking buffer to obtain a concentration 1 mg protein/mL ($\approx 3 \times 10^7$ cells). Cell viability, assessed by the trypan blue exclusion method, was $\geq 95\%$.

Isolation and culture of anterior pituitary cells

Anterior pituitaries fragments were incubated for 120 min at 37°C in 25 mM HEPES buffer, 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 (50). The cells were subsequently 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 (Sigma-Aldrich Canada). The cells were cultured 16 h in this culture medium and subsequently for, 1, 4, 24 or 48 h in new medium containing 6 or 33 mM D- or L-glucose (37°C, 95% air-5% CO_2 ; $\approx 1 \times 10^6$ cells/mL). Culture media were changed after 24 h. Various experimental concentrations of glucose, as determined using the hexokinase assay (Sigma-Aldrich Canada), did not vary significantly over time (10 ± 2).

In some internalization experiments, cells were cultured 4 h in 6 mM D-glucose and 16 h in the medium containing 6 or 33 mM D- or L-glucose, 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 $0.5\text{-}0.8 \times 10^6$ cells/mL (50). Cell viability, assessed by the Trypan blue exclusion method, was $\geq 91\%$ after harvesting.

Detection of apoptosis and necrosis in anterior pituitary cultured cells

Anterior pituitary cells were plated on sterile glass coverslips in multiwell dishes, at a density of $\approx 1 \times 10^6$ cells/mL culture medium, containing 6 mM of D-glucose, and cultured for 16 h. They were subsequently incubated for 4, 24 or 48 h in new medium containing 6 or 33 mM D-glucose, followed by a 20-min incubation at 4°C with 100 μ l of YO-PRO-1 or propidium iodide solution, to label apoptotic and necrotic cells, respectively (Vybrant Apoptosis Assay Kit #4; Molecular Probes, Eugene, OR). Glass slides-mounted cells were kept on ice in the dark for immediate fluorescence microscopy analysis. Fluorescence imaging was performed using a Nikon Eclipse TE600 microscope (X20 objective) equipped with a coolsnap camera (0.45X), a Nikon super high-pressure mercury lamp, and filters for excitation/emission of green (485/520 nm), red (595/660 nm) and blue fluorescence (360/460 nm) (Nikon Canada Inc., Montreal, QC, CA). Fluorescence microscopy image acquisition was performed on ≈ 240

individual cells from 4 independent experiments for each condition. Data were analyzed with the MetaMorph 4.6 software (Universal Imaging Corporation, Canberra Packard Canada, Ltd., Mississauga, ON, CA). Results were expressed in percentage, in comparison to the total number of cells analyzed in each incubation condition by phase contrast microscopy.

Detection of membrane lipoperoxidation in anterior pituitary cultured cells

Anterior pituitary cells were plated as described above and cultured in 6 mM D-glucose for 16 h. They were subsequently incubated for 1, 4, 24 or 48 h in medium containing 6 or 33 mM D-glucose, then in culture medium containing 1 μ M 4, 4-difluoro-5-(4-phenyl-1, 3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diazas-indacene-3-undecanoic acid (C11-BODIPY 581/591; Molecular Probes) in a final concentration of 0.5% v/v DMSO for 30 min at 37°C, according to Pap *et al.* (51). Cells were also incubated in medium containing 6 or 33 mM D-glucose and 2.5 mM Trolox, an antioxidant water-soluble analogue of vitamin E, or 0.5 mM of the pro-oxidant cumene hydroperoxide, to determine the maximal degree of oxidation. Cells were subsequently washed twice in cold PBS, mounted on glass slides and put on ice in the dark for immediate fluorescence microscopy analysis. Ratios of green (presence of lipoperoxidation)/red fluorescence (absence of lipoperoxidation) (51) were determined by fluorescence imaging as described above on \approx 200 individual cells from 3 independent experiments performed in duplicate, for each condition. The intra-assay coefficient of variation was \leq 15% in all experiments. Results were

expressed in percentage of relative ratio of fluorescence intensities/cell to those obtained with 6 mM D-glucose.

Analysis of GHRH-R mRNA transcript levels in anterior pituitaries by Northern blotting

Total RNA was extracted from each anterior pituitary of control and STZ-rats, using a single step acid guanidium-phenol/chloroform procedure with TRIzol (Invitrogen Canada Inc). Northern blotting was performed as previously described with minor modification (26). Aliquots of 12 μg total RNA were used. Hybridization was performed in fresh Robbins' solution at 65°C, overnight, in the presence of $10 \times 10^6 \text{cpm}$ [^{32}P]RPR64/mL of solution. Membranes were subsequently washed (2X standard saline citrate (SSC) (1X SSC: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate), pH 7.0)/0.1% SDS, 23°C, 2X 10 min; 1X SSC/0.1% SDS, 65°C, 1-2x10 min; 0.5X SSC/0.1% SDS, 65°C, 1-2x10 min) and exposed to Biomax MS-1 films (Eastman Kodak, Rochester, NY) at -80°C with an intensifying screen. Membranes were 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. 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. 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. Results were expressed in percentage of relative densities to those of control groups, using a fixed amount of total RNA as well as total RNA from each target tissue.

Analysis of GHRH-R mRNA levels in renal medulla by ribonuclease protection assay

Total RNA from left renal medullas was extracted with TRIzol. Medullary GHRH-R mRNA levels were assessed using the RPR64 probe (3). 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 (26). Twenty μ g 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. 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. Quantification of GHRH-R mRNA protected fragments was performed using an IS1000 Digital imaging system. The validity of comparing GHRH-R mRNA levels, using RPA and Northern blotting, had been assessed using total RNA from the anterior pituitary of 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) (data not shown), indicating that pituitary and medullary GHRH-R mRNA levels can be compared. The intra-assay coefficient of variation of normalized GHRH-R mRNA levels was ≤ 10% in all experiments. Results were expressed in percentage of relative densities to those of control groups, using a fixed amount of total RNA as well as total RNA from each target tissue.

Analysis of GHRH-R mRNA levels in anterior pituitary cultured cells by quantitative real-time RT-PCR

Total RNA from anterior pituitary cells, cultured for 16 h in 6 mM D-glucose and subsequently for 24 or 48 h in new medium containing 6 or 33 mM D-glucose, was extracted with TRIzol. Samples were resuspended in RNase-free water

(Ambion). Reverse transcription of 2 μg total RNA was performed using the SuperScriptTM II RT kit (Invitrogen) and random hexamer primers, in a total volume of 21 μL , according to the manufacturer's protocol. mRNA levels of rat GHRH-R and rat GAPDH (internal control) were determined in separate tubes, by real-time PCR, using a 1/150 (GHRH-R) and 1/300 (GAPDH) dilution of the RT product and the reagents from the QuantitectTM SYBR[®] Green PCR kit (Qiagen, Mississauga, ON, CA), according to the manufacturer's recommendation. The ABI protocol was used except that the dUTP/uracil-N-glycosylase step was omitted. Reactions were performed in duplicate, in a final volume of 25 μL , containing 300 nM of sense and antisense primers, using a Rotor Gene 3000 real-time thermal cycler (Montreal Biotech Inc, Montreal, QC, CA). The parameters included a single cycle of 95°C for 15 min, followed by 45 cycles of 94°C for 15 sec, annealing at 52°C for 30 sec, extension at 72°C for 30 sec and a melting step going from 72°C to 99°C (ramping at 1°C/sec). The primers were: GHRH-R forward, 5'-CTGCTGTCTTCCAGGGTGAT-3'; GHRH-R reverse, 5'-TAGGAGATGTGGAGGCCAAC-3' (nt 578-736; Genbank NM_012850); GAPDH forward, 5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3'; GAPDH reverse, 5'-ACTGTGGTCATGAGCCCTTC-3' (nt 1242-1376, Genbank NM_017008). Specificity of the PCR products was established by melting curve analysis and by running products on 2% agarose gel, containing 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ethidium bromide, with a 100 bp molecular weight standard (Invitrogen). Results were analyzed using the Rotor-Gene application software (version 6.0). A five-point standard curve was

performed for each gene tested, using 1:5 serial dilutions (1:5 to 1:3125) of anterior pituitary total RNA from 2-month-old healthy male rats. Relative quantification of GHRH-R mRNA levels was performed in cells cultured with 33 mM D-glucose compared to 6 mM D-glucose, using the Pfaffl equation (52) where GAPDH was the reference gene. The intra-assay coefficient of variation of GHRH-R and GAPDH Ct values was $\leq 2.5\%$ in all experiments.

Analysis of GHRH/GHRH-R cross-linked complexes

For cross-linking experiments in rat anterior pituitary homogenates, [^{125}I -Tyr 10]human (h) GHRH(1-44)NH $_2$ (^{125}I -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 MgCl $_2$, 5 mM EDTA, 1 mM diprotin, 100 μM leupeptin (Sigma-Aldrich Canada; Boehringer-Mannheim), 0.42% BSA, (~ 175 pM ^{125}I -GHRH and 250 μl (≈ 375 μg protein) of homogenates, in a final volume of 1.5 mL (23, 24). Additional experiments were performed using anterior pituitaries from 2-month-old healthy rats to compare cross-linking patterns with 100 and 500 pM of radioligand.

For experiments conducted in semi-purified medullary thin limb HL cells, ^{125}I -GHRH binding was carried out at equilibrium, in the condition described above (24), using 250 μl (7.5×10^6 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 MgCl $_2$,

0.42% BSA, 5 mM EDTA, 1 mM diprotin, 100 μ M leupeptin, 100 μ M bacitracin, 1 mM benzamidin, 0.1 mg/mL trypsin inhibitor, 250 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ M bestatin and 0.3 μ M 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 μ M rat (r) GHRH (1-29)NH₂ (synthesized in our laboratory (53)). 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) (23, 24). Incubation (23°C, 30 min) was stopped with 50 mM glycine (23, 24). The final pellets were solubilized in 75 μ L of Laemmli buffer (54), boiled for 5 min, subjected to SDS/12% PAGE (Mini-protean II, Bio-Rad, Mississauga, ON, CA) 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 for 3-6 days, at -80°C with an intensifying screen. Quantification of ¹²⁵I-GHRH-GHRH-R complexes was performed using an IS1000 Digital imaging system. The intra-assay coefficient of variation was \leq 10% in all experiments. Results were expressed in percentage of relative specific densities (specific binding: total - non-specific) to those of control groups, using a fixed amount of protein.

Deglycosylation of GHRH/GHRH-R cross-linked complexes

Deglycosylation of ^{125}I -GHRH/GHRH-R complexes was performed using a glycoprotein deglycosylation kit (Calbiochem, San Diego, CA), containing N-glycosidase F, endo- α -N-acetylgalactosaminidase, α 2-3,6,8,9-neuraminidase, β 1,4-galactosidase and β -N-acetylglucosaminidase, according to the manufacturer's protocol. Pellets of 200 μg protein from rat anterior pituitary homogenates and semi-purified medullary thin limb HL cells, resuspended in 30 μL pico-pure water, were used. In each experiment, the two tissue preparations were submitted to the deglycosylation protocol without enzymes, as negative control. In addition, a standard of glycosylated proteins (phosphorylase B, BSA, aldolase, triose phosphate isomerase, trypsin inhibitor, lysozyme, supplied with the kit) was always used as positive control and detected with Ponceau red. Reaction was stopped on ice by acetone precipitation and centrifugation (12,000 g , 5 min, 4°C). Pellets were solubilized in Laemmli buffer and processed for SDS-PAGE as described above.

Determination of cAMP levels in anterior pituitary cultured cells

Anterior pituitary cells were cultured in multi-well plates ($\approx 1.2 \times 10^5$ cells/well/150 μL) in 6 mM D-glucose for 16 h and subsequently for 4, 24 or 48 h in new medium containing 6 or 33 mM D-glucose. At the end of the cultured period, the cells were washed twice with DMEM-0.2% BSA and equilibrated 30 min with this medium before a 15-min stimulation (37°C) with rGHRH(1-29) NH_2 (0.1-100

nM), in the presence of 1 mM isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). Basal levels were determined in DMEM-0.2% BSA /1 mM IBMX alone, which was used for GHRH serial dilutions. Forskolin (10 μ M, <0.01% v/v DMSO) was used as positive control in each experiment. The reaction was stopped by adding the lysis buffer supplied with the cAMP Direct Biotrak™ enzyme immunoassay kit (Amersham Biosciences) and the non-acetylated procedure of dosage was used, according to the manufacturer's recommendation. Optical densities were measured at 450 nm, using a microplate reader (Bio-Rad, model 3550). The intra-assay coefficient of variation was \leq 10% in all experiments. Total basal and GHRH-stimulated levels of immunoreactive cAMP (intracellular + extracellular) were expressed in pmol/120,000 cells (55). Net GHRH-induced cAMP levels (minus cAMP basal level) were expressed in percentage of relative levels compared to that obtained in the presence of 10 nM rGHRH, for each cultured period.

Internalization studies in anterior pituitary cultured cells with Fluo-GHRH

Anterior pituitary cells were 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) (50), at 4°C for 40 min. Non-specific binding was determined in the presence of 1 μ M rGHRH(1-29)NH₂. In all experiments, the final incubation volume with Fluo-GHRH was 200 μ L/assay point. After removal of the supernatant, the cells were washed once in cold Tris-sucrose buffer and either prepared for immediate visualization, or warmed at 37°C

for 90 min to allow Fluo-GHRH internalization. This reaction was stopped by washing in cold Tris-sucrose buffer and rapid cooling on ice (50). The cells cultured in Petri dishes were cytocentrifuged onto glass slides and coverslips were apposed for microscopic visualization, as previously described (50). Those cultured on glass coverslips in multiwell dishes were mounted on glass slides. All slides were kept on ice in the dark for immediate fluorescence microscopy analysis (50). Total fluorescence was quantified using the pseudo color/segmented histogram function, as previously described and results were expressed in intensity unit (50).

Statistical analysis

Results were expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between data from experimental (diabetes, deglycosylation, radioligand concentration, glucose concentration) and control conditions were performed using the unpaired Student's *t* test, with the Welch correction, when variances were significantly different. The combined effects of glucose concentration and Trolox or cumene hydroperoxide on cell membrane lipoperoxidation were analyzed by ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison 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, 21 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. No death occurred over the 2- to 60-day experimentation periods.

[Position of Tables 1 and 2]

Levels of GHRH-R mRNA transcripts in the anterior pituitary of normal and STZ-diabetic rats

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 (3, 20). 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 (Fig. 1A and 1B), and 21 (Fig. 1A and 1C) days post-STZ, respectively, in comparison to that of age-matched controls. No significant change was seen 60 days post-STZ (Fig. 1A and 1D), indicating a decline in comparison to shorter periods of diabetes. A significant increase of the 4-kb transcript was observed 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), confirming our visual observation of a diminished size of the pituitary gland at these two time-point. Therefore, when GHRH-R mRNA levels were expressed as a function of total RNA content per

anterior pituitary, differences were mainly observed at the level of the 2.5 kb GHRH-R mRNA transcript which decreased 1.6 and 1.9 times ($P<0.05$) 21 and 60 days post-STZ, respectively, in comparison to that of age-matched controls (data not shown).

[Position of composite Figure 1]

Levels of GHRH-R mRNA protected fragments in the renal medulla of normal and STZ-diabetic rats

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 times lower ($P<0.001$) in the medulla of diabetic rats 2 days post-STZ administration. They were partly restored 21 and 60 (Fig. 2A and 2B) days post-STZ administration since they were respectively 1.3 ($P<0.05$) and 1.4 ($P<0.01$) times lower in comparison to aged-matched controls. Medullary total RNA content increased 1.2 times ($P<0.05$), decreased 1.5 times ($P<0.01$) and returned to normal, 2, 21 and 60 days post-STZ, respectively (data not shown). These changes had no significant impact on GHRH-R mRNA levels when expressed as a function of total RNA per medulla (data not shown).

[Position of composite Figure 2]

Levels of ^{125}I -GHRH-GHRH-R complexes in the anterior pituitary of normal and STZ-diabetic rats

In anterior pituitary homogenates, ^{125}I -GHRH-GHRH-R levels were assessed after cross-linking. The presence of 72 ± 2 , 45 ± 1 and $24\text{-kDa} \pm 1$ ^{125}I -GHRH-labeled complexes was observed in the gland of both control and diabetic rats. Specific binding, determined in the presence of $1 \mu\text{M}$ rGHRH(1-29) NH_2 , represented 60 to 75% of the total binding for the 72- and 45-kDa entities and 40 to 55% of the total binding for that of 24-kDa. The level of complexes showed a number of changes during the evolution of diabetes (Fig. 3A-3D). The density of the 72-kDa complex increased 2.6 times ($P < 0.05$), 21 days post-STZ (Fig. 3). This increase did not remain significant (1.6 times) 60 days post-STZ (Fig. 3D), when compared to that of age-matched controls. A 2.2 times decrease of the 45-kDa complex ($P < 0.05$) was observed 60 days post-STZ (Fig. 3A and 3D). The level of the 24-kDa complex did not change in the course of diabetes. A low level of specific $\approx 150\text{-kDa}$ complex (3-7% of total densities) was also detected in samples, but its level did not change with diabetes.

When the level of complexes was expressed as a function of total protein contained per anterior pituitary, differences were mainly seen at the level of the 45-kDa complex which decreased 2.2 and 2.5 times ($P < 0.05$) 21 and 60 days post-STZ, respectively, in comparison to that of age-matched controls (data not shown).

[Position of composite Figure 3]

Levels of ^{125}I -GHRH-GHRH-R complexes in medullary thin limb Henle's loop cells of normal and STZ-diabetic rats

In semi-purified medullary thin limb HL cells, ^{125}I -GHRH-GHRH-R levels were also assessed after chemical cross-linking. Specific binding, determined in the presence of $1\ \mu\text{M}$ rGHRH(1-29) NH_2 , represented 55 to 65% of total signals, for each entity. The presence of 68 ± 3 , 53 ± 2 , 41 ± 1 and $35\text{-kDa} \pm 3$ ^{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 (Fig. 4A and 4B), decreased 2.0 times ($P < 0.05$) 21 days post-STZ (Fig. 4A and 4C) and returned to control levels, 60 days post-STZ (Fig. 4A and 4D). The 53-kDa entity did not significantly increase (4.2 times, $P > 0.05$) 2 days post-STZ but increase 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. As in anterior pituitary, the low level of specific $\approx 150\text{-kDa}$ complex (3-6% of total densities) did not change with diabetes.

When the level of complexes was expressed as a function of total protein contained in semi-purified medullary thin limb HL cells equivalent to a renal medulla, no significant change was observed for the 68- and 55-kDa complexes (data not shown).

[Position of composite Figure 4]

Levels of deglycosylated ^{125}I -GHRH-GHRH-R complexes in the anterior pituitary and medullary thin limb Henle's loop cells of normal rats

Using a panel of enzymes including N-glycosidase F, endo- α -N-acetylgalactosaminidase and α 2-3,6,8,9-neuraminidase, deglycosylation experiments in both tissue preparations from 2-month-old healthy rats, showed that the low abundance 153-kDa \pm 5 ^{125}I -GHRH-GHRH-R specific complexes was reduced to 105-kDa \pm 5 ($P < 0.05$) (Fig. 5). No other change was observed in the cross-linking pattern of ^{125}I -GHRH-GHRH-R complexes in our experimental conditions, even when optimal enzyme concentrations were increased 2-fold.

[Position of Figure 5]

Effect of radioligand concentration on the density of ^{125}I -GHRH-GHRH-R complexes in the anterior pituitary of normal rats

Our preliminary data in BHK cells, stably transfected with the human or rat GHRH-R, have shown significant increases of \sim 100 and \sim 150-kDa specific ^{125}I -GHRH-GHRH-R complexes, when 500 pM ^{125}I -GHRH was used in cross-linking experiments instead of 100 pM (56). This approach was therefore employed to induce changes in cross-linking patterns related to GHRH-R dimerization/oligomerization. Cross-linking experiments, performed with 100 or 500 pM ^{125}I -GHRH, revealed changes in the relative density of 25- and 69-kDa specific complexes compared to that of the 48-kDa complex (Fig. 6A and 6B). A 1.6-fold

decrease of the 25- \pm 1 ($P<0.02$) and 1.6-fold increase of the 69-kDa \pm 2 ($P<0.01$) bands was observed without any other significant change in the level of other molecular weight entities.

[Position of Figure 6]

Effect of glucose concentration on apoptosis, necrosis and membrane lipoperoxidation in anterior pituitary cultured cells from normal rats

The percentage of fluorescent apoptotic anterior pituitary cells, after a 16-24-h culture period, was 13 ± 1 % and 9 ± 4 % in 6 and 33 mM D-glucose, respectively and that of necrotic cells was 12 ± 1 % and 10 ± 1 %. The percentage of fluorescent apoptotic cells, after a 48h-culture period, was 5 ± 3 % and 6 ± 1 % in 6 and 33 mM D-glucose, respectively, and that of necrotic cells was 6 ± 1 % with both glucose concentrations. No significant variation occurred at any time when the cells were cultured either in 6 or 33 mM D-glucose.

The dynamic of anterior pituitary cell membrane lipoperoxidation was examined after a 1-, 4-, 24- and 48-h culture period in 6 or 33 mM D-glucose. As shown in Fig. 7A and 7C (top panel), the ratio of fluorescence intensity per cell was maximal after 1 h and 3.8 times higher in cells cultured in 33 mM D-glucose compared to those cultured in 6 mM ($P<0.001$). This level of lipoperoxidation was not different from that obtained in cells exposed to 33 mM D-glucose for 24 h in the

presence of 0.5 mM cumene hydroperoxide (Fig. 7B and 7C, bottom panel (d)). It remained 2.5, 1.8 and 2.4 times higher, when cells were exposed to 33 mM D-glucose for 4, 24 and 48 h ($P < 0.01$), respectively (Fig. 7A and 7C (top panel)). However, the level of lipoperoxidation were lower at 24 h ($P < 0.001$) and 48 h ($P < 0.01$), compared to 1 and 4 h (ANOVA, followed by Tuckey's multiple comparison test). Interestingly, lipoperoxidation induced by 33 mM D-glucose was prevented when anterior pituitary cells were cultured in the presence of 2.5 mM Trolox (Fig. 7B and 7C, bottom panel (b)).

[Position of Figure 7]

Effect of glucose concentration on GHRH-R mRNA levels in anterior pituitary cultured cells from normal rats

In pituitary cultured cells, quantification of GHRH-R mRNA levels was performed by real-time RT-PCR, allowing for high sensitivity while using small amounts of cells. As shown in Fig. 8, relative levels of GHRH-R mRNA, normalized with GAPDH, were decreased 1.3 and 1.1 times ($P < 0.01$), after a 24- and 48-h incubation in the presence of 33 mM D-glucose, respectively.

[Position of Figure 8]

Effect of glucose concentration on Fluo-GHRH internalization in anterior pituitary cultured cells from normal rats

After a 40-min incubation at 4°C with Fluo-GHRH, a low level of fluorescence was observed at the surface of cells incubated with 6 or 33 mM D-glucose (Fig. 9B). As Fluo-GHRH internalization is time and temperature-dependent, the incubation time of 90 min at 37°C was selected as optimal, based on our previous results in freshly dispersed anterior pituitary cells (50). When pituitary cells are warmed at 37°C for 90 min, a punctate pattern of fluorescence appeared with moderate to high levels of fluorescence, due to internalization and concentration of Fluo-GHRH in organelles (50). In pituitary cells cultured 16-24 h in the presence of 6 mM D-glucose, these changes were correlated with a 1.6-fold ($P < 0.001$) increase of total fluorescence and Fluo-GHRH internalization (Fig. 9A, panel a and 9B) while no significant increase of fluorescence and internalization was observed in cells cultured with 33 mM D-glucose (Fig. 9A, panel b and 9B). In cells cultured in the presence of 33 mM L-glucose, the level of total fluorescence was not different from that in 6 mM D-glucose (data not shown).

[Position of Figure 9]

Effect of glucose concentration on GHRH-induced cAMP levels in anterior pituitary cultured cells from normal rats

Neither basal and nor forskolin-stimulated levels of immunoreactive cAMP were affected after a 4-, 24- and 48-h culture period in the presence of 33 mM D-glucose compared to those in 6 mM D-glucose (data not shown). After 4-h culture period in the presence of 33 mM D-glucose, rGHRH(129)NH₂-induced response was not affected (Fig. 10A). However, after a 24-h culture period in 33 mM D-glucose, cAMP levels induced by 0.1, 1, 10 and 100 nM rGHRH(129)NH₂ decreased 2.1, 1.6 ($P<0.05$), 1.7 ($P<0.01$) and 1.8 times ($P<0.01$), respectively (Fig. 10B). Similarly, after a 48-h cultured period in 33 mM D-glucose, cAMP levels induced by 1, 10 and 100 nM rGHRH(129)NH₂ decreased 1.5 ($P<0.05$), 1.6 ($P<0.01$) and 2.1 times ($P<0.01$), respectively (Fig. 10C).

[Position of Figure 10]

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 (6, 7) as well as in somatotroph proliferation (8). In the kidney, more specifically in thin limb HL cells, activation of the GHRH-R likely participate to cell proliferation and survival (to be published elsewhere).

When analysed at the cellular level, anterior pituitary GHRH-R mRNA transcripts were submitted to a time-dependent regulation in diabetic rats. 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 ¹²⁵I-GHRH-GHRH-R complexes were 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, 40), it might be proposed that an increased GHRH tone may initially contribute to up-regulate the 2.5-kb GHRH-R mRNA transcript. Alternatively, an increased GHRH content may result from an accumulation of the peptide in hypothalamic neurons, leading to a reduced GHRH secretion and a compensatory up-regulation

of the 2.5-kb transcript. Nevertheless, these changes in hypothalamic GHRH appears to be insufficient to induce immediate *in vivo* changes at the GHRH-R protein level. Twenty-one days post-STZ, a time at which the hypothalamic expression of GHRH mRNA is reduced in poorly-controlled diabetic rats (39), both transcripts were significantly increased as well as the 4/2.5-kb ratio, underlying an important elevation of the 4-kb transcript. As previously shown, this may reflect a decrease of the apparent concentration of high affinity GHRH binding sites (20). The observed increase of the 72-kDa ¹²⁵I-GHRH-GHRH-R complex could therefore result from an increased level of 24-kDa/45-kDa dimer formation, in such a perturbed cellular environment, and as seen in the anterior pituitary from healthy rats, when ligand-induced dimer/oligomer formation is triggered. This phenomenon could mask a compensatory increase of the 45-kDa ¹²⁵I-GHRH-GHRH-R complex. Sixty 60 days post-STZ, only the 4-kb transcript remained elevated, leading to an increase of the 4/2.5-kb ratio and a decrease of the functional GHRH-R (45-kDa complex). Although the identity of the 4-kb transcript is currently unknown, our preliminary evidence suggests that it could represent a GHRH-R mRNA transcript bound to an adapter protein, preventing optimal translation (57). Interestingly, when the systemic impact of GHRH-R changes was considered (per pituitary), both the 2.5-kb transcript and 45-kDa band were found to be significantly decreased 21 and 60 days post-diabetes induction.

In the renal medulla of diabetic and control rats, a single pattern of GHRH-R mRNA protected fragments was identified, as previously reported (26). 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 if GHRH is involved in this regulation, it is likely from a medullary origin. Our recent results, showing the presence of preproGHRH mRNA and GHRH immunoreactivity in thin limb Henle's loop cells, support this hypothesis (to be published elsewhere). Changes in medullary GHRH-R mRNA levels were accompanied 2 days post-STZ by an increase of the 68-kDa ¹²⁵I-GHRH-GHRH-R (putative dimer of the 35-kDa GHRH-R fragment), a trend to an increase of the 53-kDa complex (functional GHRH-R, 26) and an increase of a weakly-labeled 44-kDa complex (proteolyzed GHRH-R), suggesting an increased translation. At 21 days post STZ, the 53-kDa complex increased, while no effect was observable 60 days post-STZ. The present results suggest a predominant effect of diabetes on the renal GHRH-R in early phases of the disease, both at the cell and tissue level. Whether or not an increased translation of the GHRH-R may be related to epithelial thin limb cell survival during cellular stress, such as provoked by hyperglycemia and glucotoxicity, remains to investigate.

Apart from GHRH, changes in serum nuclear hormones may influence GHRH-R mRNA levels. In STZ-diabetic rats, circulating levels of glucocorticoids are increased (58) while those of thyroid hormones are decreased (59, 60). Both of

them are required for optimal expression of GHRH-R in the pituitary (28-33) 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, it can be hypothesized that hyperglycemia itself, causing glucotoxicity/oxidative damage, directly regulated GHRH-R levels. It has already been reported that a 72-h exposure of anterior pituitary cultured cells to a high glucose level (22 mM) significantly reduces GHRH-induced GH secretion (61). To explore this mechanism, anterior pituitary cells from 2-month-old healthy rats were cultured for various period of time in the presence of 6 or 33 mM D-glucose. In our experimental conditions, high glucose did not promote necrosis and apoptosis. However, generation of reactive oxygen species, leading to a significant increased of membrane lipoperoxidation, was observed 1, 4, 24 and 48 h post high glucose exposure. In these conditions, GHRH-R mRNA levels were diminished, especially after a 24-h culture period in the presence of high glucose. Moreover, Fluo-GHRH internalization was marginal after a 16-24-h expose to high glucose, indicating low levels of functional GHRH-R. This change led to a significant diminution of GHRH-induced cAMP levels after a 24 and 48 h culture period in the presence of high glucose.

Altogether, this is the first demonstration of a direct effect of glucotoxicity on the GHRH-R, indicating that high glucose levels can regulate the GHRH-R and decreases GHRH sensitivity in somatotrophs, leading to a decrease of GH secretion *in vitro* (61) and *in vivo* (34-37). These results offer an explanation that may reconcile some of the divergent results on somatotroph sensitivity to GHRH, from a large variety of single time-point evaluations, ranging from 2- to 60-day post STZ administration. The differential regulation of the anterior pituitary and renal medulla GHRH-R mRNA and protein levels may be related to the target cell populations characteristics and functions (endocrine versus epithelial cells) and their specific extracellular environments.

The molecular and cellular events by which glucotoxicity affect the GHRH-R will now deserve investigation. Interestingly, in primary cultured rabbit proximal tubule cells, the angiotensin type 1 receptor mRNA and protein levels are down-regulated, *via* a PKC-oxidative stress-transforming growth factor- β 1 signal cascade (62). A similar mechanism could be proposed for the GHRH-R, affecting mRNA levels first. Alternatively, oxidative damage could alter the GHRH-R protein structure and regulate GHRH-R mRNA levels concurrently.

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 Julie Bédard (Laboratory of Neuroendocrinology of Aging), for her expert technical assistance in real-time RT-PCR.

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*. K Bédard was recipient of a studentship from *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal* Research Center (CHUM RC), S Hoa was recipient of a summer studentship from CHUM CR and Department of Medicine, University of Montreal. P Gaudreau held a scholarship *chercheur-boursier national* from FRSQ.

REFERENCES

1. Seifert H, Perrin M, Rivier J, Vale W 1985 Binding sites for growth hormone-releasing factor on rat anterior pituitary cells. *Nature* 313: 487-489.
2. Lau YS, Camoratto AM, Muller M, White, Moriarty CM 1991 Effect of lead on TRH and GHRH binding in rat anterior pituitary membranes. *Toxicology* 68: 169-179.
3. Mayo KE 1992 Molecular cloning and expression of a pituitary specific receptor for growth hormone-releasing factor. *Mol Endocrinol* 6: 1734-1744.
4. 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.
5. Bilezikjian LM, Vale WW 1983 Stimulation of adenosine 3', 5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 113: 1726-1731.
6. Tannenbaum GS, Ling N 1984 The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 115: 1952-1957.
7. Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale WW, Rosenfeld MG, Evans RM 1985 Independent effects of growth hormone-releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314: 279-281.

8. Billestrup N, Swanson LW, Vale W 1986 Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6854-6857.
9. 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.
10. Chen C, Xu R, Clarke IJ, Ruan M, Loneragan K, Roh SG 2000 Diverse intracellular signaling systems used by growth hormone-releasing hormone in regulating voltage-gated Ca²⁺ or K channels in pituitary somatotrophs. *Immunol Cell Biol* 78: 356-368.
11. Zeitler P, Siriwardana G 2000 Stimulation of mitogenic-activated protein kinase pathway in rat somatotrophs by growth hormone-releasing hormone. *Endocrine* 12: 257-264.
12. Pombo CM, Zalvide J, Gaylinn BD, Dieguez C 2000 Growth hormone-releasing hormone stimulates mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 141: 2113-2119.
13. 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.
14. 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.

15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.

21. 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.
22. Guarcello V, Weigent DA, Blalock JE. 1991 Growth hormone-releasing hormone receptors on thymocytes, and splenocytes from rats. *Cell Immunol* 136: 291-302.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.

28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. Nogami H, Matsubara M, Harigaka T, Yatayama 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.
32. Miller TL, Mayo KE 1997 Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 138: 2458-2465.
33. Petersenn S, Schulte HM 2000 Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. *Vitam Horm* 59: 35-69.
34. Tannenbaum GS 1981 Growth hormone secretory dynamics in streptozotocin diabetes: evidence of a role for endogenous circulating somatostatin. *Endocrinology* 108: 76-82.

35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.

41. Diz 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Flyvbjerg A, Bornfeldt KE, Marshall SM, Arnqvist HJ, Orskov H 1990 Kidney IGF-I mRNA in initial renal hypertrophy in experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 33: 334-338.
46. 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.

47. 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.
48. 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.
49. Liu K, Paterson AJ, Konrad RJ, Parlow AF, Jimi S, Roh M, Chin E Jr, Kudlow JE. 2002 Streptozotocin, an O-GlcNAcase inhibitor, blunts insulin and growth hormone secretion. *Mol Cell Endocrinol* 194: 135-146.
50. Veyrat-Durebex C, Pomerleau L, Langlois D, Gaudreau P 2005 Internalization and trafficking of the human and rat growth hormone-releasing hormone receptor. *J Cell Physiol* 203: 335-344.
51. Pap EH, Drummen GP, Winter VJ, Kooij TW, Op den Kamp JA, Hage WJ, Post JA 1999 Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY(581/591). *FEBS Lett* 453: 278-282.
52. Pfaffl MW 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: E45.
53. 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.
54. Laemmli UK 1970 Cleavage structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

55. Neghishi T, Chik CL, Ho AK 1999 Ceramide enhances growth hormone (GH)-releasing hormone-stimulated cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation but inhibits GH release in rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 140: 5691-5697.
56. Thériault K, Pomerleau L, Gaudreau P 2005 Étude de dimérisation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance. Abstract: 6^{ème} Congrès annuel des stagiaires de recherche en santé de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, January 22.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. 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.

61. Renier G, Serri O 1991 Effects of acute and prolonged glucose excess on growth hormone release by cultured rat anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 54: 521-525.
62. Park SH, Han HJ 2002 The mechanism of angiotensin II binding downregulation by high glucose in primary renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F228-F237.

TABLE 1. Body weight, kidney wet weight, food and water intakes and biochemical parameters of 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 ¹²⁵I-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	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	10±1	74±6 ^{a,c}	11±2	>70 ^{a,c}	11±2	>100 ^{a,c}
	Sacrifice	10±1	74±6 ^{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

Fig. 1 Levels of GHRH-R mRNA transcripts in the anterior pituitary of control (C) and STZ-diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration.

Samples of 12 μ g total RNA from each rat pituitary were analyzed by Northern blotting. A: Autoradiographic representation of GHRH-R mRNA transcripts and GAPDH mRNA levels from one control and one diabetic rat, 2, 21 and 60 days post-STZ administration. B, C and D: Dia GHRH-R mRNA normalized levels were expressed in percentage of relative density compared to that of matched control group, which was established at 100%. Results represent the mean \pm SEM of one experiment performed in singulate, using 8 controls and 8 STZ-rats. GHRH-R mRNA levels were normalized in each lane with GAPDH. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 when compared with respective GHRH-R mRNA control level.

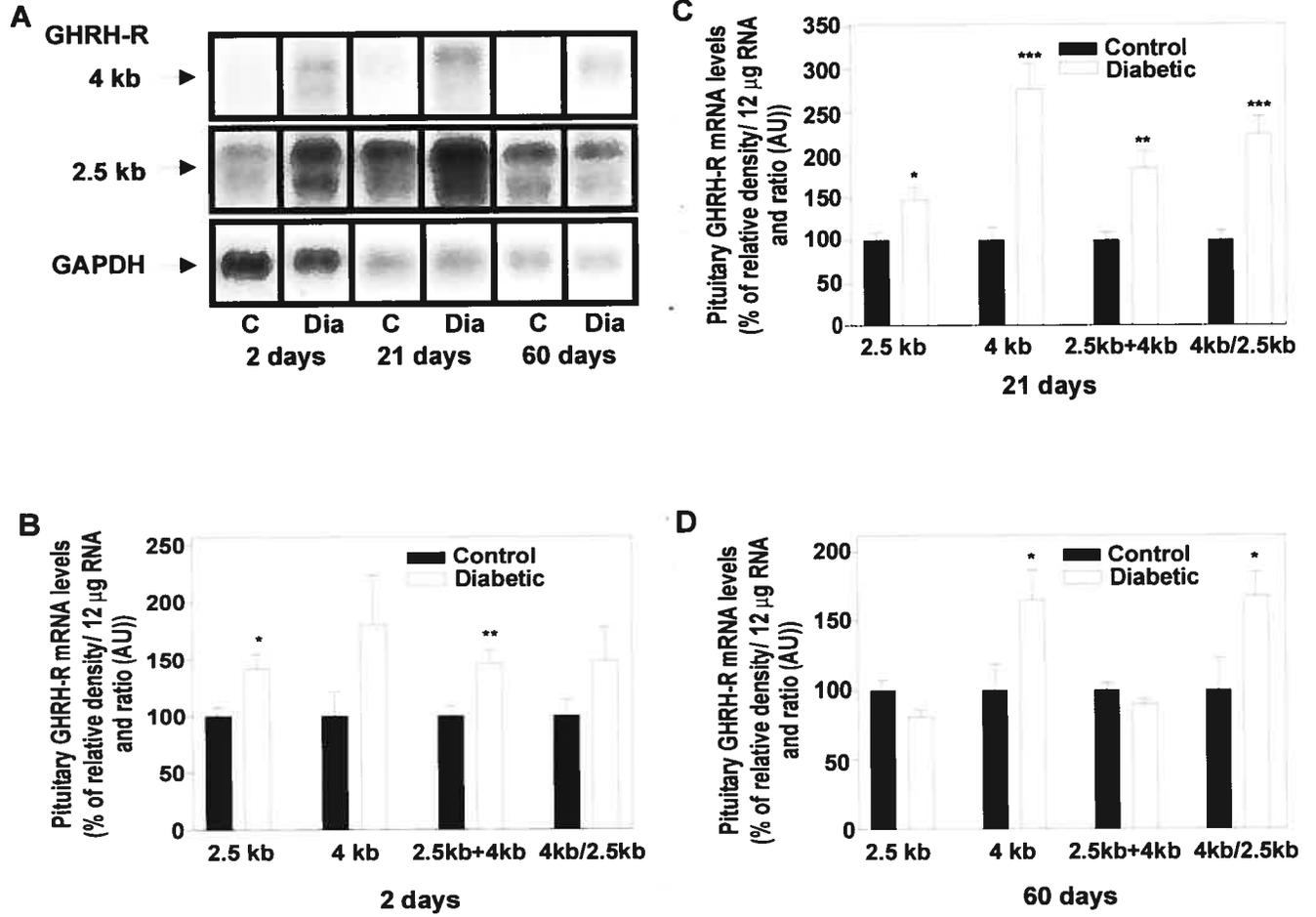
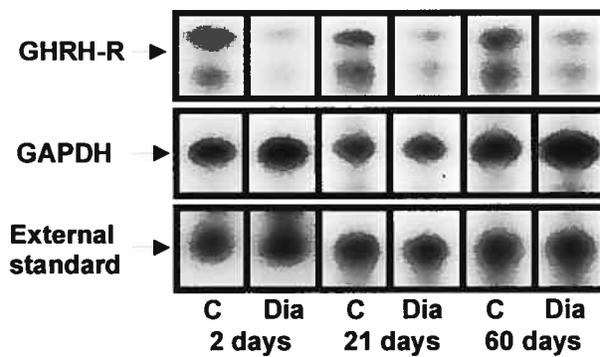


Fig. 2 Levels of GHRH-R mRNA protected fragments in the renal medulla of control (C) and diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration.

Samples of 20 μ g total RNA from each rat medulla were analyzed by RPA. A: Autoradiographic representation of GHRH-R mRNA, GAPDH and RPR-64 Msc I RNA external standard (40 pg) signals from one control and one diabetic rat, 2, 21 and 60 days post-STZ administration. B: Dia GHRH-R mRNA normalized levels were expressed in percentage of relative density compared to that of matched control group, which was established at 100%. Results represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in triplicate, using 8 controls and 9 STZ-rats. GHRH-R mRNA levels were normalized in each lane with GAPDH and RPR-64 Msc I. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 when compared with respective GHRH-R mRNA control level.

A



B

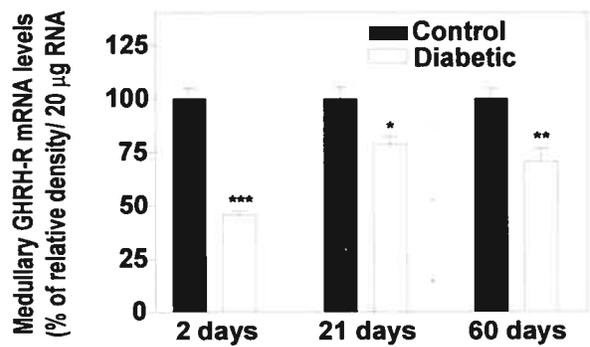


Fig. 3 Levels of ^{125}I -GHRH-GHRH-R complexes in anterior pituitary homogenates of control (C) and diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration.

Samples of 375 μg protein from each rat pituitary 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 one diabetic rat, 21 or 60 days post-STZ administration. T indicates total binding and NS, non-specific binding assessed in the presence of 1 μM rGHRH(1-29) NH_2 . B, C and D: Dia levels of ^{125}I -GHRH-labeled complexes were expressed in percentage of relative density compared to that of matched control group, which was established at 100%. Results represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in duplicate, using 2 controls and 3 STZ-rats per experiment. * P <0.05 when compared with respective GHRH-R control level.

Figure 3

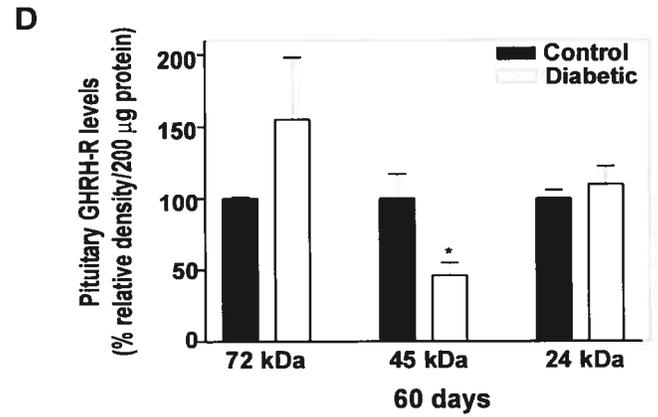
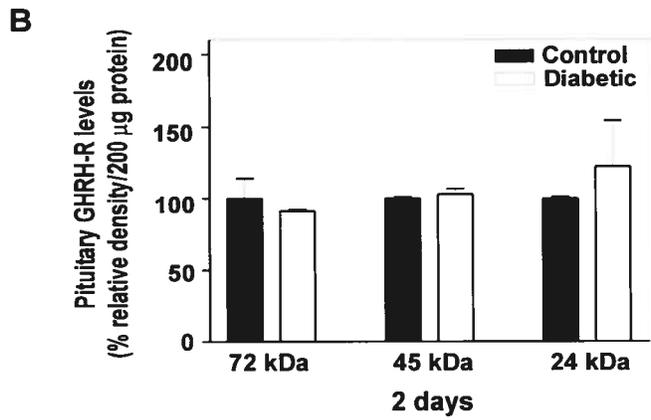
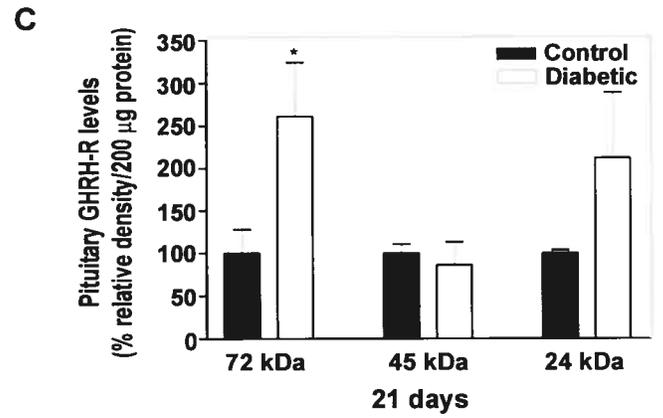
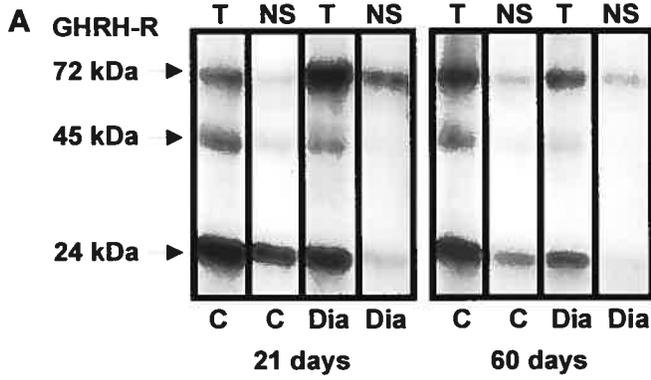


Fig. 4 Levels of ^{125}I -GHRH-GHRH-R complex levels in semi-purified thin limb Henle's loop cells of control (C) and diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration.

Samples of 250 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. T indicates total binding and NS, non-specific binding in the presence of 1 μM rGHRH(1-29) NH_2 . B, C and D: In the medulla from STZ-rats, levels of ^{125}I -GHRH-labeled complexes were expressed in percentage of relative density compared to that of matched control group, which was established at 100%. Results represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in duplicate, using 2 controls and 3 STZ-rats per experiment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ when compared with respective GHRH-R control level.

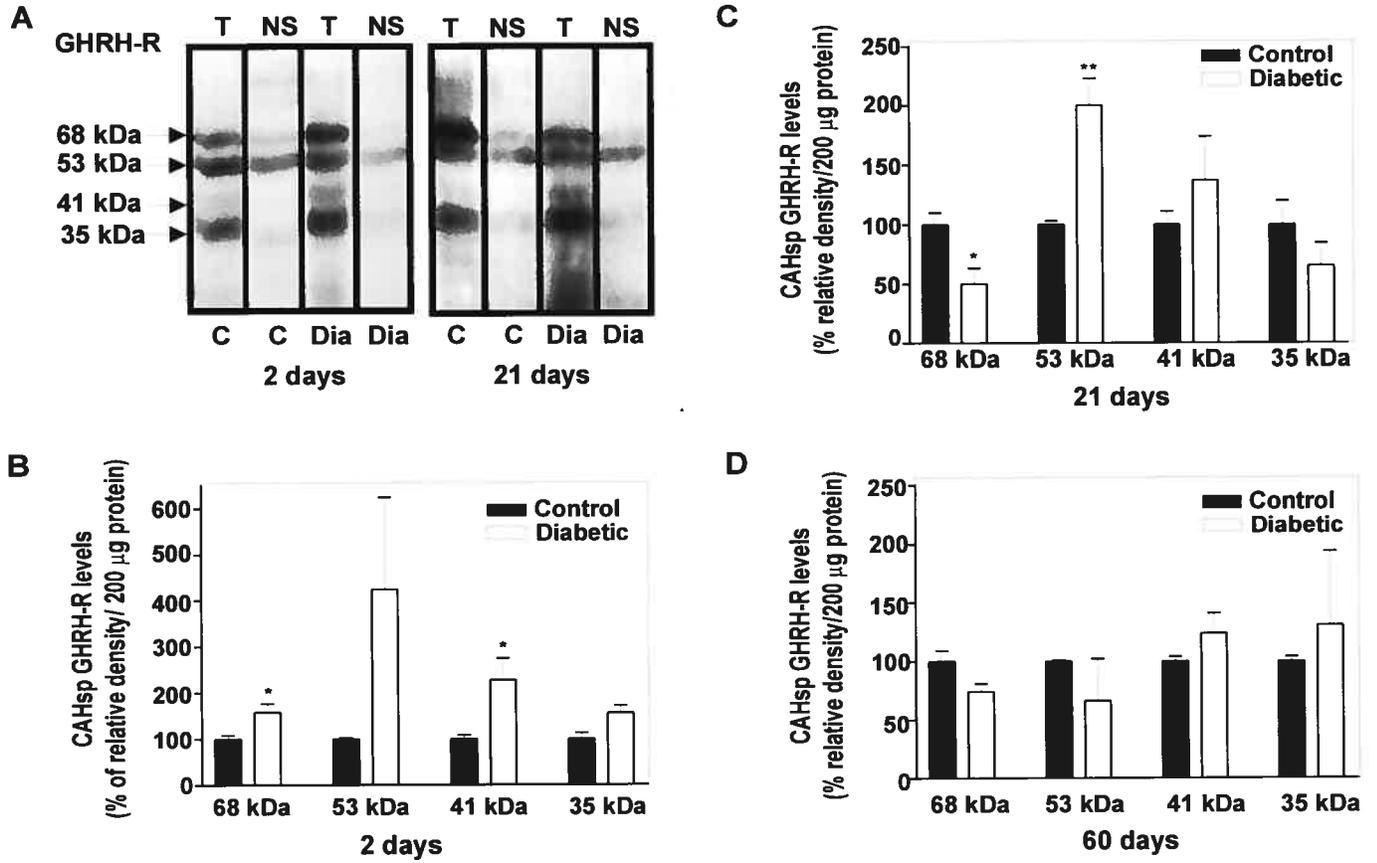


Fig 5. Effect of deglycosylation on the level of ^{125}I -GHRH-GHRH-R complexes in anterior pituitary homogenates and semi-purified thin limb Henle's loop cells.

Deglycosylation, cross-linking and SDS-PAGE were performed as described in Methods and Figs. 3 and 4. Autoradiographic representation of ^{125}I -GHRH-labeled complexes (total binding) from 2-month-old rat anterior pituitary (Pit) and thin limb Henle's loop (tHL), following incubation in absence (-) or presence (+) of deglycosylation enzymes. Results represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments performed in duplicate.

Figure 5

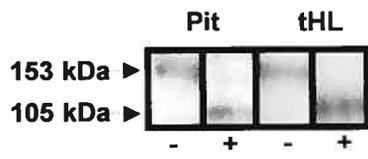


Fig 6. Effect of radioligand concentration on the level of anterior pituitary ^{125}I -GHRH-GHRH-R complexes.

Cross-linking and SDS-PAGE were performed as described in Methods and Fig. 3.

A: A: Densities of ^{125}I -GHRH-labeled complexes expressed per 200 μg total protein in percentage of relative density to that obtained for the 48-kDa band. B: Autoradiographic representation of ^{125}I -GHRH-labeled complexes from 2-month-old rat pituitary. T indicates total binding and NS, non-specific binding in the presence of 1 μM rGHRH(1-29) NH_2 . Results represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments performed in duplicate (inter-assay apparent molecular weights variation <6%). * P <0.05, ** P <0.01 for the 69- and 25-kDa band respectively, when homogenates were incubated with 500 pM radioligand compared to 100 pM.

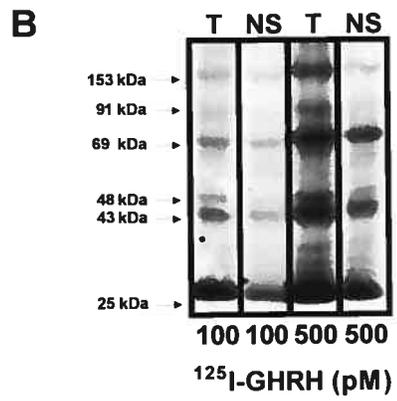
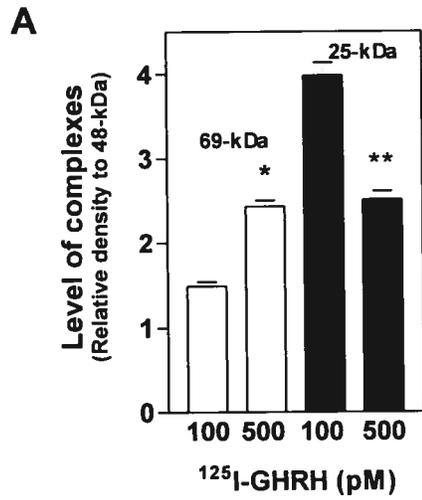
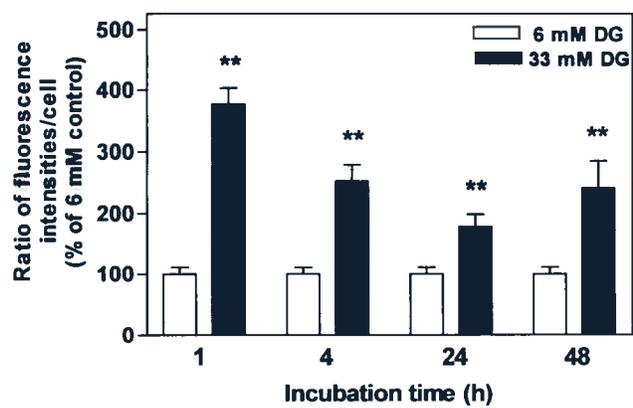


Fig 7. Generation of lipoperoxidation by D-glucose in anterior pituitary cultured cells.

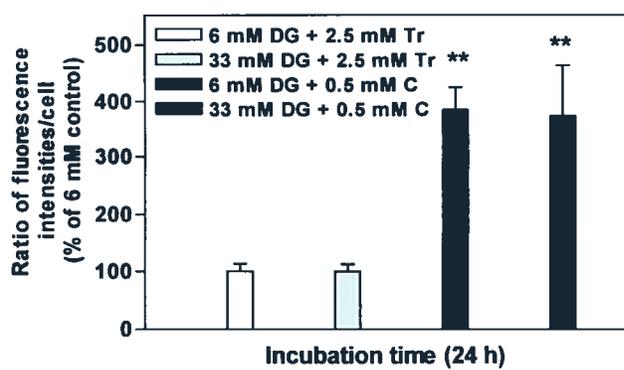
Levels of lipoperoxidation were detected by fluorescence imaging, using C11-BODIPY 581/591. A: Cells were cultured for 16 h in 6 mM D-glucose and subsequently for 1, 4, 24 and 48 h in 6 or 33 mM D-glucose. B: Cells were cultured for 16 h in 6 mM D-glucose and subsequently for 24 h in 6 mM D-glucose + 2.5 mM Trolox (Tr) or 33 mM D-glucose + 2.5 mM Tr, or in 6 mM D-glucose + 0.5 mM cumene hydroperoxide (C) or 33 mM D-glucose + 0.5 mM C. C, top panel: Overlay of green/red fluorescence in anterior pituitary cells cultured 1 (a), 4 (c), 24 (e) and 48 h (g) in 6 or 1 (b), 4 (d), 24 (f) and 48 h (h) in 33 mM D-glucose. C, bottom panel: Overlay of green/red fluorescence in anterior pituitary cells cultured 24 h in 33 mM D-glucose + 2.5 mM Tr (b) or in 33 mM D-glucose + 0.5 mM C (d) compared with 6 mM D-glucose (a, c). Results (A and B) represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in duplicate, for each condition (\approx 200 individual cells). $**P < 0.01$ when compared with respective 6 mM D-glucose control level (A) or 6 mM D-glucose + 2.5 mM Tr level (B). Scale bar: 10 μ m.

Figure 7

A



B



C

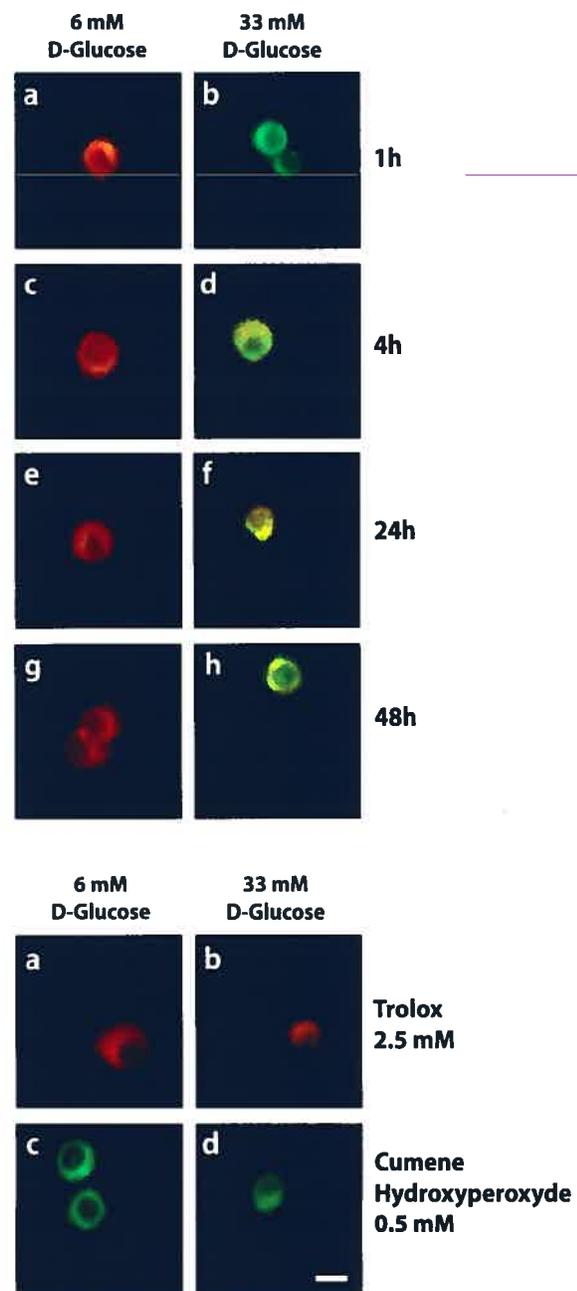


Fig. 8 Levels of GHRH-R mRNA in anterior pituitary cultured cells exposed to high D-glucose concentrations for various periods of time.

A 1/150 (GHRH-R) and 1/300 (GAPDH) dilution of each RT reactions were analyzed by real-time PCR. GHRH-R mRNA normalized levels in 33 mM D-glucose were expressed in percentage of relative density compared to that of matched 6 mM D-glucose control, which was established at 100%. Results represent the mean \pm SEM of 3 to 4 experiments performed in duplicate. GHRH-R mRNA levels were normalized with GAPDH. **** $P < 0.01$** , when compared with respective GHRH-R mRNA control level.

Figure 8

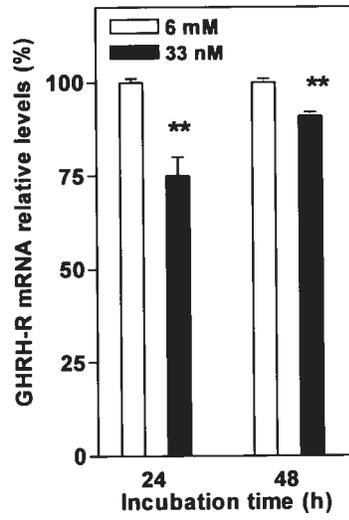
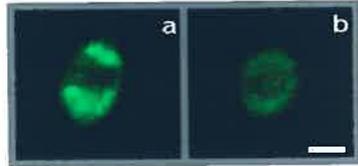


Fig 9. Levels of Fluo-GHRH in rat anterior pituitary cultured cells exposed to high D-glucose concentrations.

Total Fluo-GHRH intensity was examined in cultured cells exposed to 6 or 33 mM D-glucose for 16-24 h. A: Imaging of cells cultured for 24 h in 6 (A, panel a) or 33 mM D-glucose (A, b) was performed following incubation at 4°C for 40 min in the presence of 10 nM Fluo-GHRH, washing and warming at 37°C for 90 min (A, panel a) or following incubation at 4°C for 40 min in the presence of 10 nM Fluo-GHRH and washing (A, panel b). B: Total fluorescence intensity following incubation at 4 or 37°C the presence of Fluo-GHRH. Results represent the mean \pm SEM of 3-6 experiments performed in duplicate for each condition (\approx 350 individual cells). *P <0.001 when compared with 37°C-90 min. Scale bar: 10 μ m.

A



B

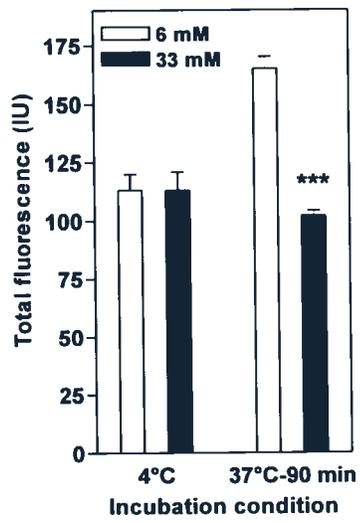
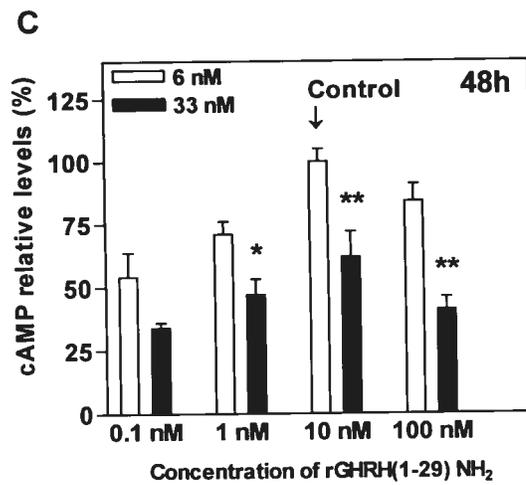
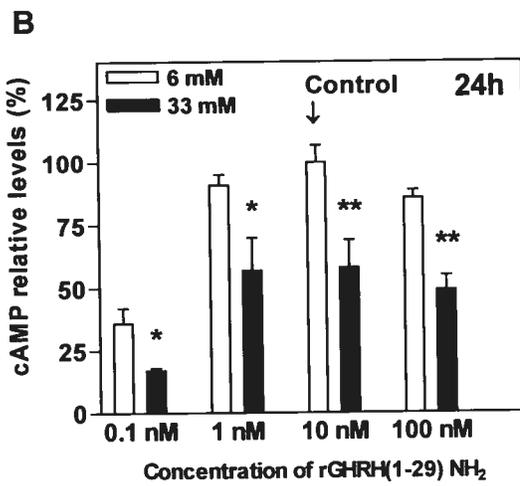
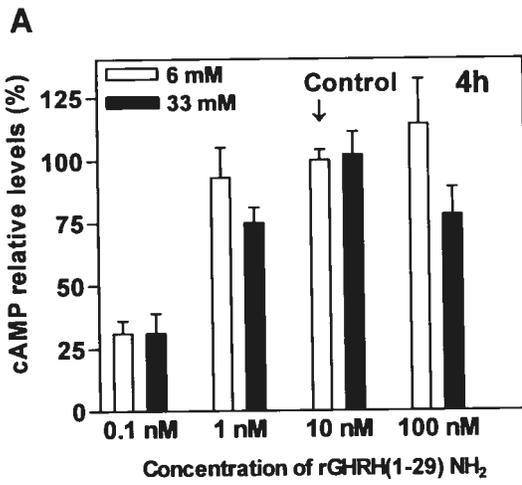


Fig 10. Levels of GHRH-induced cAMP in rat anterior pituitary cultured cells exposed to high D-glucose concentrations.

Total cAMP immunoreactive levels were measured in cultured cells exposed to 6 or 33 mM D-glucose for A: 4 h, B: 24 h and C: 48 h. Net GHRH-induced cAMP levels (minus cAMP basal level) were expressed in percentage of relative levels compared to that obtained in the presence of 10 nM rGHRH, for each cultured period. Results represent the mean \pm SEM of 4-5 experiments performed in duplicate. *P <0.05, **P <0.01, when compared with respective control level.



3.2 Annexe 1

Résultats non-inclus dans le manuscrit 3.1

Effet des différentes concentrations de glucose sur l'apoptose, la nécrose ainsi que la lipoperoxydation membranaire des cellules hypophysaires, de rats normaux, mises en culture.

Le pourcentage de cellules de l'hypophyse antérieure marquées pour l'apoptose, après 16 à 24 h de mise en culture était de 13 ± 1 et 7 ± 1 pour les cellules dans du 6 mM et 12 mM, respectivement et pour la nécrose de 12 ± 1 and 7 ± 1 . Pour une période de culture de 48 h, les taux de cellules apoptotiques étaient de 5 ± 3 and 6 ± 2 pour les cellules dans du 6 mM et 12 mM, respectivement et les taux de cellules nécrotiques étaient de 6 ± 1 and 7 ± 2 . Aucune variation statistique significative n'est remarquée lorsque les cellules sont cultivées en présence de 6 ou 33 mM de D-glucose.

La cinétique de lipoperoxydation membranaire des cellules de l'hypophyse antérieure fut examinée après 1-, 4-, 24- et 48- h de mise en culture dans du 6 et 12mM de D-glucose. Le ratio d'intensités de la fluorescence par cellule fut maximal après 1h d'incubation et 3 fois supérieur à 12 mM de D-glucose en comparaison aux cellules cultivées dans le 6mM de D-glucose ($P < 0.05$). Il demeure augmenté de 2.1, 2.7 et 1.8 fois lorsque les cellules sont incubées dans du 12 mM de D-glucose pendant 4, 24 et 48 h ($P < 0.05-0.01$), respectivement. **(Figure A)**

Effet des différentes concentrations de glucose sur les niveaux d'ARNm du GHRH-R des cellules hypophysaires, de rats normaux, mises en culture.

Les niveaux relatifs d'ARNm du GHRH-R, normalisés avec GAPDH, ne sont pas modifiés après une incubation de 24 h en présence de 12 mM de D-glucose, ils sont cependant diminués de l'ordre de 1,6 fois ($P < 0.05$) après 48 h d'incubation en présence de 12 mM de D-glucose. (**Figure B**)

Effet des différentes concentrations de glucose sur les niveaux d'internalisation du Fluo-GHRH dans les cellules hypophysaires, de rats normaux, mises en culture.

À la suite d'une incubation à 4°C avec le Fluo-GHRH, un très faible niveau de fluorescence fut observé à la surface des cellules incubées en présence de 6 ou 12 mM de D-glucose. Lorsque les cellules hypophysaires sont incubées à 37°C pendant 90 min, une fluorescence ponctuelle apparaît avec des niveaux de fluorescence modérés à élevés, dû à l'internalisation et à la concentration du Fluo-GHRH dans les organelles (**Figure C**). Dans les cellules hypophysaires incubées 16 ou 24 h en présence de 6mM de D-glucose, ces changements sont associés à une élévation de l'ordre de 1.3 fois ($P < 0.01$) des niveaux de fluorescence totale, alors qu'aucune augmentation significative de la fluorescence n'est observée dans les cellules cultivées avec 12 mM de D-glucose. Dans les cellules cultivées en présence de 12 mM de L-glucose, les niveaux de fluorescence totale étaient

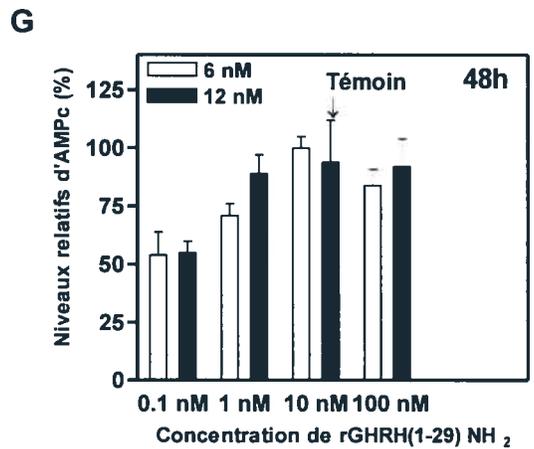
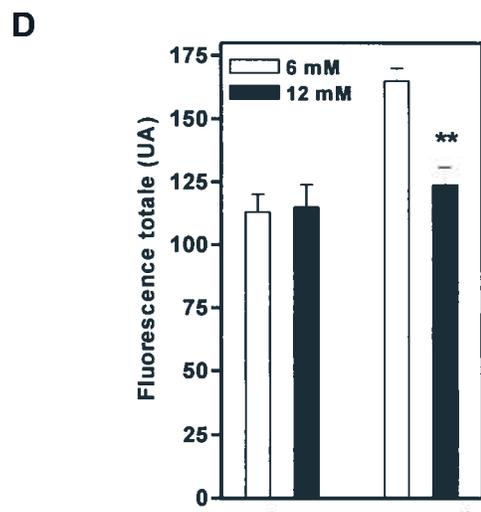
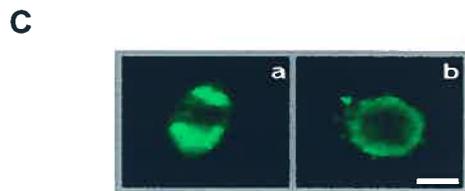
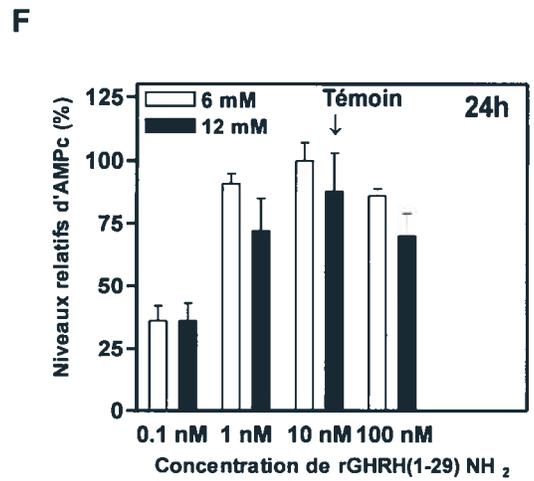
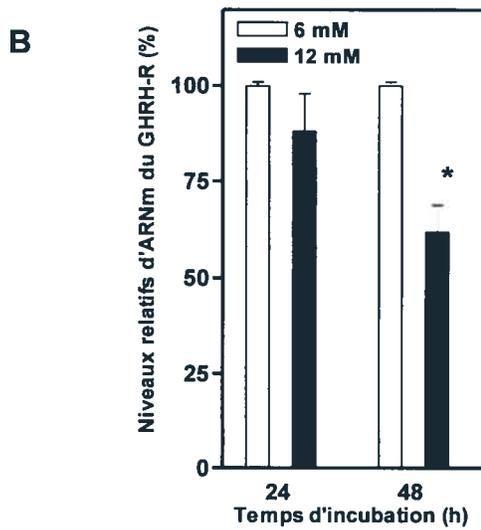
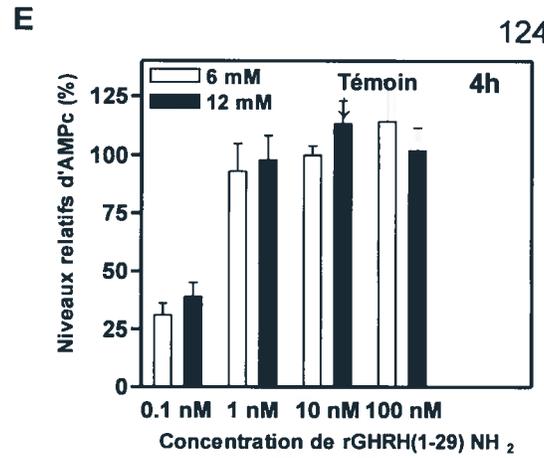
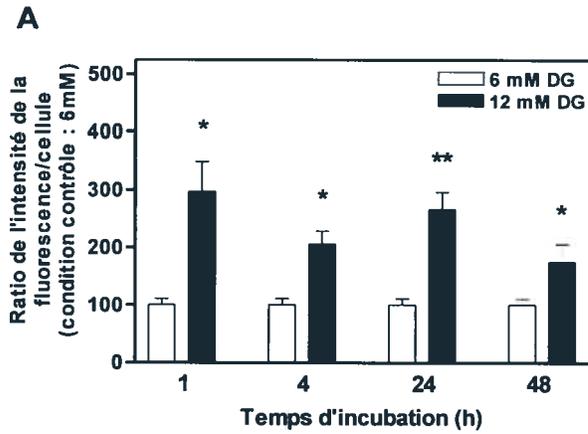
similaires à ceux retrouvés dans les cellules cultivées dans 6 mM de D-glucose
(Figure D)

Effet des différentes concentrations de glucose sur la production d'AMPc induite par une stimulation au GHRH dans les cellules hypophysaires, de rats normaux, mises en culture.

Les niveaux de production d'AMPc après stimulation au rGHRH(129)NH₂ ainsi que la production d'AMPc de base et stimulée par la forskoline (résultats non montrés), ne furent pas affectés après une période de mise en culture de 4-, 24- et 48-h en présence de 12mM de D-glucose en comparaison avec les niveaux retrouvés à 6 mM de D-glucose. **(Figures E, F et G)**

Annexe 1

124



Titre de l'article: Effects of age and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus.

Auteurs: Julie Bédard, Karine Bédard, Guylaine Ferland, Tamas Fulop, Danielle Jacques, Abdelouahed Khalil, Christelle Veyrat-Durebex, Richard Wagner et Pierrette Gaudreau.

Participation: La colonie de rats âgés ayant servi à cette étude faisait partie de l'infrastructure *Colonies de rats âgés* du Réseau Québécois de Recherche sur le Vieillissement (RQRV), dont Guylaine Ferland et Pierrette Gaudreau sont responsables. De plus, l'axe de recherche *Nutrition et vieillissement réussi* du RQRV a soutenu financièrement une partie de cette étude puisque plusieurs membres de cet axe, soit G Ferland, T Fulop, D Jacques, A Khalil, C Veyrat-Durebex, R Wagner et P Gaudreau, sont impliqués dans des projets de recherche à l'aide de ce modèle animal de vieillissement réussi, dans le but de mieux comprendre les processus biologiques qui régissent le vieillissement chez l'homme. Le prélèvement des tissus utilisés dans cette étude a été effectué par C Veyrat-Durebex. Les extractions d'ARN ont été réalisées par J Bédard. La stratégie expérimentale utilisée a été élaborée par J Bédard, K Bédard et P Gaudreau, en collaboration avec le personnel scientifique de Génome Québec. L'analyse préliminaire des résultats a été effectuée par J Bédard et K Bédard. L'analyse des résultats et la classification des gènes reliés au stress oxydatif ont été faite par K Bédard. La classification finale des gènes a été effectuée par J Bédard. L'ensemble de l'étude a été supervisé par P Gaudreau. Le manuscrit a été rédigé par K Bédard, J Bédard et P Gaudreau, en collaboration avec les autres co-auteurs.


Julie Bédard


Guylaine Ferland

Tamas Fulop

Danielle Jacques

Abdelouahed Khalil

Christelle Veyrat-Durebex

Richard Wagner



Pierrette Gaudreau

ACCORD DES CO-AUTEURS

A) Déclaration des co-auteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Karine Bédard
M.Sc. Sciences Biomédicales

2. Description de l'article

Bédard J*, **Bédard K***, Ferland G, Fulop T, Jacques D, Khalil A, Veyrat-Durebex C, Wagner R, Gaudreau P. Effects of age and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus. Neurobiol Aging, *: contribution égale à titre de premier auteur.

3. Déclaration de tous les co-auteurs autres que l'étudiant

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise **Karine Bédard** à inclure cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre "Glucotoxicité cellulaire comme modèle de vieillissement du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance"



Julie Bédard



Guylaine Ferland

Tamas Fulop

Danielle Jacques

Abdelouahed Khalil

Christelle Veyrat-Durebex

Richard Wagner



Pierrette Gaudreau

Effects of aging and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus

Julie Bédard^{a*}, Karine Bédard^{a*}, Guylaine Ferland^b, Tamas Fulop^c, Danielle Jacques^c, Abdelouahed Khalil^c, Christelle Veyrat-Durebex^a, Richard Wagner^c et Pierrette Gaudreau^a.

^aLaboratory of Neuroendocrinology of Aging, *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal* Research Center, Notre-Dame Hospital and Department of Medicine, University of Montreal, Montreal; ^bUniversity of Montreal Geriatric Institute Research Center, Montreal; ^cUniversity of Sherbrooke Geriatric Institute Research Center, Sherbrooke, Quebec, Canada

Correspondence and requests for reprints should be addressed to:

Dr Pierrette Gaudreau, Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal*, Notre-Dame Hospital, Room M-5226, 1560 East, Sherbrooke Street, Montreal, Quebec, Canada H2L 4M1.

Tel: (514) 890-8000 extension 27159

Fax: (514) 412-7661

e-mail: [REDACTED]

Part of a full article to be submitted: Neurobiology of aging, February 2007

Running title: Regulation of gene expression by age and diet

Key words: Gene array, somatotroph axis, oxidative stress

*: Equal contribution as first author

¹ CVD present address: Laboratory of Metabolism, Department of Internal Medicine and Department of Cell Physiology and Metabolism, Faculty of Medicine, University of Geneva, 1, Geneva, Switzerland

ABSTRACT

Long-term, moderate caloric restriction (LTMCR) is a powerful intervention to prevent or delay age-related diseases and to maintain physiological functions. In aged rats, CR is associated with the maintenance of a youthful level of functional pituitary growth hormone-releasing hormone receptors (GHRH-R). To assess the effects of long-term dietary interventions on the anterior pituitary (Pit) and hypothalamus (Hyp), gene expression profiling (cDNA microarray) was performed. Male rats were submitted to CR or fed *ad libitum* from 8 to 20 months of age. Total RNA was analyzed with the GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array from Affymetrix. The results indicate that GHRH-R mRNA levels decreased with aging and increase with CR in the Pit while they are not altered in the Hyp. Growth hormone secretagogue receptor mRNA levels were not modified by CR or aging. Hyp preproGHRH mRNA levels declined with aging but were not altered by CR. Pit genes, coding for enzymes involved in the control of oxidative stress, such as cytochrome c oxidase, glutathione peroxidase 2 and 4, and glutathione S-transferase, were regulated by aging and CR. This pattern was not seen in the Hyp. Altogether, these results may provide new avenues to study somatopause in conjunction with oxidative stress in the course of aging and help to design new dietary interventions.

INTRODUCTION

Although multiple factors contribute to successful aging, nutrition is considered as one of the most potent regulators. Long-term moderate (40%) caloric restriction (LTMCR) without malnutrition, is recognized as the most powerful intervention to prevent or delay age-related deterioration and diseases, maintains many physiological functions at more youthful levels, and consequently to extend both mean and maximum life span (1-3).

Evidence that caloric restriction (CR) retards aging and extends median and maximal life span was first presented in the 1930s (4). Since then, similar observations have been made in a variety of species including rats, mice, fish, flies, worms, and yeast (1-3, 5, 6). Although not yet definitive, results from CR studies in monkeys also suggest that the mortality rate in calorie-restricted animals will be lower than that of controls (7-10). Mechanisms by which CR is operating are likely multiple and encompasses molecular (gene mutations, telomere shortening), cellular (oxidative stress) and systemic (neuroendocrine and immune systems) theories of aging as it delays a wide range of diseases (kidney disease, a variety of tumors, autoimmune disease, and diabetes (11)). For example, CR monkeys have lower body temperatures and insulin concentrations than controls (7-10), and both of those variables are considered as biomarkers of longevity in rodents (1-3,11-13).

In long-term CR mice, gene expression profiling in the skeletal muscle (*gastrocnemius* muscle, 14), total brain (15), heart (16) and liver (17), with the use of DNA microarrays, has revealed that aging is associated with several alterations in gene expression of these tissues and that CR prevents many of them. Transcriptional patterns suggest that CR may delay aging by inducing a metabolic shift toward increased protein turnover and decreased macromolecular damage (18).

Several of these genes are also dysregulated during aging in humans (19). Skeletal muscle gene expression in aged primates has been compared with that in young animals (20). Aging selectively up-regulated transcripts involved in inflammation and oxidative stress and down-regulated genes involved in mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation. CR up-regulated cytoskeletal protein-encoding genes and decreased the expression of genes involved in mitochondrial bioenergetics (20). Other small-scale gene array studies (1183 genes) have revealed a reduction in pituitary growth hormone (GH) mRNA expression of *ad libitum*-fed aged rats compared to young rats (21, 22). In addition, DNA microarrays, used to analyze age- and GH-induced changes in gene expression patterns in male rat liver, adipose tissue and skeletal muscle, showed that several differentially expressed genes encoded proteins involved in fuel metabolism (23). Old rats were shown to have an induced expression of genes involved in hepatic glucose oxidation and lipid synthesis, whereas these genes were reduced in adipose tissue. Growth hormone treatment induced the expression of genes for lipid oxidation in liver and for glucose oxidation in skeletal

muscle. In adipose tissue, GH reduced the expression of genes involved in lipogenesis even further. Changes in transcript levels were reflected in serum in terms of altered lipid profiles. Serum levels of triglycerides, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, and total cholesterol were higher in the old animals than in the young ones and normalized by the GH treatment (23).

Finally, the consumption of plant-based foods, particularly soy, which is rich in isoflavones and their derivatives, may also promote successful aging (24) and exert additive or synergetic effects with CR. The consumption of soy has been reported to have beneficial cardiovascular effects including improved lipid profiles and reduced cholesterol in both human (25) and non-human primate studies (26). In addition, dietary soy was shown to influence cell growth and prevent bone loss. These biological effects were related to effects of soy phytochemicals on the regulation of expression of 33 genes in the liver of young female obese Zucker rats (*fa/fa*) when compared to a casein diet (27). Presently, no data exist on the effect of long-term soy diet on gene expression profiling in aging rodents.

Based on our results (28, 29) and literature evidence, it is hypothesized that long-term combined effects of even mild glucotoxicity and lipotoxicity, such as in aging, may be responsible for a number of molecular and cellular events leading to a deterioration of tissue and organ functionality, related among others to systems controlling somatotroph function and oxidative stress. Specific gene expression profiles, associated with the aging process of individual tissues and organs, will be

changed by CR and/or by the quality of dietary protein to prevent or delay the establishment of aging processes.

Therefore, the objective of the present study was to perform a cDNA microarray analysis in rat anterior pituitary and hypothalamus to identify the effects of aging on gene expression and regulation by LTMCR and/or the source and quality of dietary protein.

METHODS

Animals

Two-month-old male SD rats (Charles River Canada, St-Constant, QC) were housed individually in wire-bottom cages, in controlled temperature (22°C), humidity and lighting (12-hour light-dark cycle; lights on at 07:00 h, ambient light intensity of 45 Lux) animal facilities. The rats were fed chow diet containing 20% casein or soy, 20% sucrose, 29.5% corn starch, 14% maltodextrine, 5.5% corn oil, 5% cellulose, 3.5% AIN-93G vitamin mix, 0.3% methionine, 0.3% choline bitartrate and 0.001% tertiary butylhydroquinone (Harland, Teklad, Madison, WI). At 8 months, the rats were randomized in 2 groups: *ad libitum*-fed, and 40% LTMCR. Implementation of CR at this age allows to avoid interference with the period of rapid growth (28). Rats were submitted to a 20% CR of *ad-libitum* feeding for two weeks and to 40% CR thereafter. The regimen provided comparable amounts of mineral and vitamins when consumed at 60% of *ad libitum* diet. All animals had free access to water. Body weight (BW) and food intake were recorded every two weeks. At 20 months of age, rats were sacrificed along with 2-month-old *ad libitum* controls, between 08:30 and 10:30 h, by complete blood withdrawal *via* the abdominal aorta under pentobarbital anesthesia (5 mg/100g BW). Macroscopic evaluation indicated the absence of major pathology or tumor. Anterior pituitaries and hypothalami were dissected rapidly, snap-frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C until total RNA extraction. The animal protocol was approved by the Animal

Care Committee of the University of Montreal, in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Total RNA extraction

Total RNA of 4 rat anterior pituitaries and hypothalami from each group was isolated with TRIzol and washed with 75% ethanol. The integrity and concentration of each sample were assessed (260/280 nm and 28S/18S ribosomal RNA ratio (\geq .9 retained)).

Measurements of specific mRNA levels

Regulation of gene expression was analyzed in the anterior pituitary and hypothalamus of 4 rats per group, using the Affymetrix™ new GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array which contains over 31,000 probe sets, analyzing 28,000 rat genes. GeneChip analysis was performed by the McGill University and Genome Quebec Innovation Center (Montreal).

Affymetrix data reduction and analysis

Data analysis was performed with the RMA (Robust Multi-array Average) software. A 1.3-fold change was considered significant for some genes of interest (Tables 1 and 2). Otherwise, a cut-off of 1.5-fold change was used. Effects of age were studied by comparing 20- to 2-month-old rats fed *ad libitum* to casein, as the source of dietary protein (20CA vs 2CA). Effects of LTMCR were studied by comparing 20-month-old rats fed *ad libitum* to 20-month-old calorie-restricted rats

(20CA vs 20CR, and 20-month-old calorie-restricted rats to 2-month-old rats fed *ad libitum* (20CR vs 2CA). Effects of dietary protein source were studied by comparing 20-month-old rats fed *ad libitum* to casein with those fed to soy (20CA vs 20SA).

RESULTS

Body weight

The general health condition of restricted rats was very good as previously reported (28). At sacrifice, the BW of rats used in the present study was 472 ± 14 , 930 ± 38 , 540 ± 22 , 900 ± 46 , and 578 ± 25 g for 2-month-old *ad libitum* casein-fed (2CA), 20-month-old *ad libitum* casein-fed (20CA), 20-month-old calorie-restricted casein-fed (20CR), 20-month-old *ad libitum* soy-fed (20SA), and 20-month-old calorie-restricted soy-fed (20SR) rats, respectively.

Gene regulation in the anterior pituitary

As shown in Table 1, growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor (GHRH-R) mRNA levels declined 1.3 times with age and increased 1.8 times with LTMCR. Dietary protein substitution (casein for soy) had no effect. Those of growth hormone secretagogue receptor (GHS-R or ghrelin receptor) did not vary in any of the condition studied. Somatostatin (SRIF) type 2 receptor mRNA levels decreased 1.6 to 2.8 times with age but were not regulated by LTMCR or dietary protein. IGF-I mRNA levels rose with age but were regulated in a complex fashion when effects of CR and dietary protein source were combined. IGF-binding protein-3 mRNA levels increased with age and were normalized by LTMCR.

mRNA levels of c-fos increased 1.8 times with age and were normalized by CR and those of the NF-kappa-B inhibitor increased with age but were not

normalized by CR. Members of the cytochrome oxidase system decreased with age and were not affected by CR. mRNA levels of glutathione peroxidases 2 and 4 increased with age and were partially and completely normalized by LTMCR, respectively. Those of glutathione S-transferase alpha 1 and hemeoxygenase-1 increased (1.8 and 1.4 times) with CR while glutathione S-transferase omega 1 was negatively regulated by LTMCR. The apoptotic protease activating factor 1 declined with age and was normalized by LTMCR.

Gene regulation in the hypothalamus

As shown in Table 2, mRNA levels of the hypothalamic GHRH-R were not regulated by age or CR. Those of preproGHRH and IGF-BP3 decreased with age and were normalized by LTMCR while those of Bcl2-like 1 decreased in casein-fed calorie-restricted rats compared to soy-fed calorie-restricted rats.

DISCUSSION

In the anterior pituitary of aged rats fed *ad libitum*, GHRH-R mRNA levels were decreased but LTMCR rejuvenated them. The effect was rather specific to this plasma membrane receptor regulating growth hormone secretion, since no influence of CR was observed for the SRIF and ghrelin receptors. These results support previous data showing the beneficial effects of CR on the GHRH-R (28-30).

While serum total IGF-1 levels are reported to be decreased in aged rats (28), in the present study pituitary IGF-1 mRNA levels and IGF-1 binding protein 3 (IGFbp3) were increased and CR increased and rejuvenated them, respectively. This is the first report on the presence of the IGF-1 gene in the anterior pituitary, while that of IGFbp3 gene has been shown in ovine lactotrophs (31). Although IGF-1 may inhibit GHRH-R expression in rat anterior pituitary (32), it would be premature on the basis of our observation to propose an ultra-short loop control mechanism for IGF-1 in the rat anterior pituitary. The presence of IGF-1 as well as IGFbp3 mRNA will have to be confirmed by real time RT-PCR. In the hypothalamus of aged rats, preproGHRH and IGFbp3 mRNA levels were decreased and increased, respectively and LTMCR reverted these effects. The present results differ from those of Girard *et al.* (28) showing no change in hypothalamic immunoreactive content of 18-month-old rats fed *ad libitum* or submitted to a LTMCR. Additional data will be needed to assess the dynamics of

GHRH changes both at the gene and protein level in aged rats, fed *ad libitum* or submitted to a LTMCR.

The present study also revealed beneficial effects of LTMCR on some proteins directly or indirectly involved in enzymes regulating oxidative stress balance. In the anterior pituitary of aged rats fed *ad libitum*, NF κ B inhibitor alpha (Nfkbia) mRNA levels increased but were not affected by LTMCR. Those of c-fos were also increased in aged rats fed *ad libitum* but were normalized by LTMCR. This could explain, at least in part, the very low incidence of tumors in calorie-restricted aged rats. Whether or not rejuvenation of c-fos levels by CR is modulated by oxidative stress level in the anterior pituitary remains to be demonstrated. Glutathione peroxidase 2 (GPx2) mRNA levels were drastically increased in aged rats fed *ad libitum* and LTMCR reduced this effect. The main function of GPx2 is to eliminate hydroperoxydes by conjugating them to glutathione, thus a down-regulation by LTMCR suggest substantial lower levels of endogenous peroxides. Glutathione-s-transferase alpha 1 (GSTa1) and heme oxygenase 1 (Hmox1) mRNA levels were increased by LTMCR, suggesting that CR protect from peroxidation (33) occurring during aging and may compensate for a decrease in others enzyme mRNA levels, such as cytochrome C oxidases (6a2 and 8h). In the hypothalamus, LRMLD had less impact on genes involved in the control of oxidative stress, as no significant differential expression was observed except for heme oxygenase1. However a diet rich in plant protein such as soy in

combination with LTMCR may exert a synergetic beneficial effect, since heme oxygenase1 (Hmox1) and *Bcl2-like 1* (Bcl2l1) were increased by this combination.

Altogether, important changes in mRNA levels were observed in anterior pituitary with aging and LTMCR, while the source of dietary protein had a low impact. It suggests that the anterior pituitary GHRH-R and enzymes involved in the regulation of cellular oxidative stress in this tissue could represent valuable markers of successful aging. However, they will have to be validated by other quantification techniques such as real time RT-PCR. Moreover, levels of functional protein will have to be determined to confirm their role in a scheme where oxidative stress cause by gluco (34) and lipotoxicity (35) would be responsible for the loss of somatotroph sensitivity in the course of aging.

REFERENCES

1. Barger JL, Walford RL, Weindruch R 2003 The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era. *Exp Gerontol* 38: 1343-1351.
2. Das M, Gabriely I, Barzilai N 2004 Caloric restriction, body fat and ageing in experimental models. *Obes Rev* 5: 13-19.
3. Leonie K Heilbronn and Eric Ravussin 2003 Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 78: 361-9. Review.
4. McCay CM, Crowel MF, Maynard LA 1935 The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate body size. *J Nutr* 10:63-79.
5. Barrows CH, Kokkonen GC 1982 Dietary restriction and life extension, Biological mechanisms. In: Moment GB, ed. *Nutritional approaches to aging research*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc, pp 219-243.
6. Weindruch R, Walford RL 1998 *The retardation of aging and disease by dietary restriction*. Springfield, IL: Charles C Thomas Publisher.
7. Roth GS, Lane MA, Ingram DK, Roth GS, Lane MA, Ingram DK, Mattison JA, Elahi D, Tobin JD, Muller D, Metter EJ 2002 Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans. *Science* 297: 811.
8. Kemnitz JW, Weindruch R, Roecker EB, Crawford K, Kaufman PL, Ershler WB 1993 Dietary restriction of adult male rhesus monkeys: design,

methodology, and preliminary findings from the first year of study. *J Gerontol* 48: B17-26.

9. Bodkin NL, Ortmeyer HK, Hansen BC 1995 Long-term dietary restriction in older-aged rhesus monkeys: effects on insulin resistance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50: B142-147.
10. Lane MA, Black A, Ingram DK, Roth GS 1998 Calorie restriction in non-human primates: implications for age-related disease risk. *J Anti-Aging Med* 1:315-326.
11. Koubova J, Guarente L 2003 How does calorie restriction work? *Genes Dev* 17: 313-321.
12. Parr T 1997 Insulin exposure and aging theory. *Gerontology* 43: 182-200.
13. Tatar M, Bartke A, Antebi A 2003 The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299: 1346-1351.
14. Weindruch R, Kayo T, Lee CK, Prolla TA 2001 Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. *J Nutr* 131: 918S-923S.
15. Lee CK, Weindruch R, Prolla TA 2000 Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet* 25: 294-297.
16. Lee C-K, Allison DB, Brand J, Weindruch R, Prolla TA 2002 Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14988-14993.

17. Dhahbi JM, Kim H-J, Mote PL, Beaver R, Spindler SR 2004 Temporal linkage between the phenotypic and genomic response to caloric restriction. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5524-5529.
18. Weindruch R, Kayo T, Lee CK, Prolla TA 2002 Gene expression profiling of aging using DNA microarrays. *Mech Ageing Dev* 123: 177-193.
19. Welle S, Brooks A, Thornton CA 2001 Senescence-related changes in gene expression in muscle: similarities and differences between mice and men. *Physiol Genomics* 5: 67-73.
20. Kayo T, Allison DB, Weindruch R, Prolla TA 2001 Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5093-5098.
21. Kappeler L, Gourdji D, Zizzari P, Bluet-Pajot M-T, Epelbaum J 2003 Age-Associated Changes in Hypothalamic and Pituitary Neuroendocrine Gene Expression in the Rat. *J Neuroendocrinol* 15: 592-601.
22. Goidin D, Kappeler L, Perrot J, Epelbaum J, Gourdji D 2000 Differential pituitary gene expression profiles associated- to aging and spontaneous tumors as revealed by rat cDNA expression array. *Endocrinology* 141: 4805-4808.
23. Tollet-Egnell P, Parini P, Stahlberg N, Lonnstedt I, Lee NH, Rudling M, Flores-Morales A, Norstedt G 2004 Growth hormone-mediated alteration of fuel metabolism in the aged rat as determined from transcript profiles. *Physiol Genomics* 16: 261-267.

24. Blum SC, Heaton SN, Bowman BM, Hegsted M, Miller SC 2003 Dietary soy protein maintains some indices of bone mineral density and bone formation in aged ovariectomized rats. *J Nutr* 133: 1244-1249.
25. Bakhit RM, Klein BP, Essex-Sorlie D, Ham JO, Erdman JW Jr, Potter SM 1994 Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. *J Nutr* 124: 213-222.
26. Greaves K A, Parks JS, Williams JK 1999 Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Nutr* 129:1585-1592.
27. Iqbal MJ, Yaegashi S, Ahsan R, Lightfoot DA, Banz WJ 2002 Differentially abundant mRNAs in rat liver in response to diets containing soy protein isolate. *Physiol Genomics* 11: 219-226.
28. Girard N, Ferland G, Boulanger L, Gaudreau P 1998 Long-term calorie restriction protects rat pituitary growth hormone-releasing hormone factor receptor binding sites from age-related alterations. *Neuroendocrinology* 68: 21-29.
29. 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-IX.
30. Shimokawa I, Yanagihara K, Higami Y, Okimoto T, Tomita M, Ikeda T, Lee S 2000 Effects of aging and dietary restriction on mRNA levels of receptors

for growth hormone-releasing hormone and somatostatin in the rat pituitary. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55: B274-279.

31. Adam CL, Gadd TS, Findlay PA, Wathes DC 2000 IGF-I stimulation of luteinizing hormone secretion, IGF-binding proteins (IGFBPs) and expression of mRNAs for IGFs, IGF receptors and IGFBPs in the ovine pituitary gland. *J Endocrinol* 166: 247-254.
32. 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. *Neurosci Lett* 276: 87-90.
33. Raza H, Robin MA, Fang JK, Avadhani NG 2002 Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J.* 366(Pt 1):45-55.
34. Mooradian AD, Thurman JE. Glucotoxicity: potential mechanisms 1999 *Clin Geriatr Med* 15: 255.
35. Unger RH 2003 The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol* 65: 333-347.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by the Institute of Aging of the Canadian Institutes of Health Research, the Quebec Network of Research on Aging, Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

KB holds a studentship from *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal* Research Center.

PG is the recipient of a Chercheur-boursier national scholarship from the FRSQ.

Table 1: GENE REGULATION IN ANTERIOR PITUITARY

SOMATOTROPH AXIS										
GeneBank category	GENE ID	20CA-2CA	20CR-2CA	20CA-20CR	20SA-20SR	20CA-20SA	20CR-20SR	20CA-20SA	20CR-20SR	Function
	Ghrhr	-1,35	1,31	-1,77	-1,57	-1,12	1,01			GHRH receptor (GPCR): mediation of GHRH actions, such as stimulation of growth hormone (GH) synthesis and secretion and somatotroph proliferation
	IGF-1	1,76	2,44	-1,39	1,79	-1,96	1,27			Insulin-like growth factor-1: activation of cell proliferation at mediation of several GH growth-promoting effects and role in apoptosis
	Igfbp3	2,69	1,35	2,00	-1,03	2,09	1,02			IGF-binding protein-3: regulation of IGF-I levels and role in apoptosis
	Igfbp3	2,92	1,24	2,36	1,12	2,11	1,01			IGF-binding protein-3: regulation of IGF-I levels and role in apoptosis
	Ssir2	-2,78	-2,50	-1,11	-1,24	1,03	-1,08			Somatostatin receptor subtype 2 (GPCR): mediation of SRIF actions, such as inhibition of GH synthesis and secretion
	Ssir2	-1,62	-1,63	1,00	-1,06	-1,07	-1,13			Somatostatin receptor subtype 2 (GPCR): mediation of SRIF actions, such as inhibition of GH synthesis and secretion
OXIDATIVE STRESS										
GeneBank category										
Transcription factors										
	c-fos	1,77	1,19	1,48	1,10	1,10	-1,49			C-fos: role in cell proliferation and differentiation
	Nfkbia	1,53	1,44	1,06	-1,19	1,06	1,19			NF-kappa B inhibitor: roles in cell adhesion regulation, immune and inflammatory responses, apoptosis, cell proliferation and differentiation
Enzymes										
	Cox6a2	-1,87	-1,95	1,04	1,10	-1,05	1,01			Cytochrome c oxidase subunit VI a polypeptide 2: Role in the respiratory chain
	Cox8h	-1,69	-2,02	1,20	1,21	-1,05	-1,05			Cytochrome c oxidase subunit VIII-H: cytochrome C oxidase activity, mitochondrial electron transport chain
	Gpx2	3,02	1,61	1,87	1,68	1,23	1,11			Glutathione peroxidase 2: protective role against organic hydroperoxide toxicity
	Gpx4	1,39	1,16	1,20	1,23	1,16	1,19			Glutathione peroxidase 4: protective role against hydrogen peroxides, organics peroxides and lipid hydroperoxides
	Gsta1	-1,26	-1,34	1,07	-1,17	-1,18	-1,06			Glutathione S-transferase alpha 1: glutathione S-transferase activity, role in oxidoreduction
	Gsta1	-1,02	1,76	-1,80	-1,49	-1,09	1,11			Glutathione S-transferase alpha 1: glutathione S-transferase activity, role in oxidoreduction
	Hmox1	1,12	1,41	-1,26	1,07	-1,09	1,25			Heme oxygenase-1: anti-oxidant, anti-inflammatory and cytoprotective functions
APOPTOSIS										
	Apaf1	-1,47	-1,29	-1,14	-1,03	1,02	1,12			Apoptotic protease activating factor 1: activation of caspase 9 and apoptosis

Table 2: GENE REGULATION IN HYPOTHALAMUS

HYPOTHALAMUS										
SOMATOTROPH AXIS										
GeneBank category	GENE ID	20CA-2CA	20CR-2CA	20CA-20CR	20SA-20SR	20CA-20SA	20CR-20SR	20CA-20SA	20CR-20SR	Function
	NM_031577	-1,53	-1,24	-1,23	-1,29	-1,30	-1,37			GHRH: stimulation of growth hormone synthesis and secretion and somatotroph proliferation
	AI713966	1,51	1,22	1,24	1,60	1,10	1,42			IGF-binding protein-3: regulation of IGF-I levels and role in apoptosis
	NM_012588	1,49	1,27	1,17	1,46	1,03	1,29			IGF-binding protein-3: regulation of IGF-I levels and role in apoptosis
OXIDATIVE STRESS										
GeneBank category	GENE ID	20CA-2CA	20CR-2CA	20CA-20CR	20SA-20SR	20CA-20SA	20CR-20SR	20CA-20SA	20CR-20SR	Function
Transcription factors										
	AW672589	1,01	1,06	-1,05	1,35	-1,11	1,29			NF-kappa B inhibitor: roles in cell adhesion regulation, immune and inflammatory responses, apoptosis, cell proliferation and differentiation
Enzymes										
	NM_012580	1,08	1,37	-1,27	1,29	1,00	1,64			Heme oxygenase-1: anti-oxidant, anti-inflammatory and cytoprotective functions
	NM_031509	1,20	1,23	-1,02	1,28	-1,05	1,24			Glutathione S-transferase alpha 1: glutathione S-transferase activity, role in oxidoreduction
APOPTOSIS										
	AF279286	1,15	1,08	1,06	-1,17	-1,19	-1,48			Bcl2-like 1: regulation of apoptosis

4. DISCUSSION

Le dernier recensement effectué en 2001 rapporte que 13% de la population canadienne et 13.3% de la population québécoise sont âgés de plus de 65 ans (<http://www12.statcan.ca/francais/census01/products/highlight/AgeSex/HighlightsTables.cfm>). Ce pourcentage augmentera à 24.4 % en 2026, et à 30% en 2051 (http://www.stat.gouv.qc.ca/publications/demograp/pdf/tendance_2001_2051.pdf). La situation s'avère similaire pour le diabète de type 2 qui représente 90% de tous les cas de diabète. En 2000, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estimait à 177 millions, le nombre de personnes souffrant de diabète, soit 1,8 millions au Canada. Les projections de l'OMS indiquent qu'en 2025, ce nombre augmentera à 300 millions (http://www.diabetes.ca/Section_About/prevalence.asp). Le Canada n'échappera pas à cette tendance, ce qui laisse présager une augmentation importante de diabétiques de type 2 au cours des prochaines années.

Chez les mammifères incluant l'homme, la fonction somatotrope est perturbée au cours du vieillissement (Aribat et coll., 1991 ; D'Costa et coll., 1993 ; Girard et coll., 1999) et dans le diabète (Tannenbaum et coll., 1981b; Olchovsky et coll., 1996). Compte tenu de la contribution importante de cet axe neuroendocrinien au bon fonctionnement de l'organisme, entre autres dans le maintien de la masse musculaire et la prévention de l'augmentation de la masse adipeuse (Andreasen et coll., 1996), les mécanismes participant à la perte de fonctionnalité des cellules somatotropes et celle de leur sensibilité au GHRH doivent être étudiés.

Une hyperglycémie, conduisant à la glucotoxicité, caractérise ces deux états, d'où l'hypothèse d'un effet direct de la glucotoxicité sur le récepteur hypophysaire du GHRH, résultant en une perte de sensibilité des cellules somatotropes au GHRH. Nos résultats préliminaires, dans les cellules BHK (baby hamster kidney) transfectées avec le hGHRH-R, suggéraient d'ailleurs un effet régulateur stéréospécifique, en présence de concentrations de D-glucose de 12 et 33 mM (Farrajota, 2003).

L'utilisation d'un environnement natif, soit les cellules de l'hypophyse antérieure de rats jeunes en culture primaire, devenait donc nécessaire afin d'identifier et de quantifier les effets de la glucotoxicité sur ce récepteur faisant partie de la famille des GPCRs. Le projet avait donc comme objectif principal : 1) l'étude des effets de concentrations supra-physiologiques de D-glucose, sur les niveaux d'ARNm du GHRH-R, en utilisant une approche de quantification relative par RT-PCR en temps réel; 2) l'évaluation de l'implication du stress oxydatif à ce processus en mesurant de façon quantitative la LPO membranaire, et 3) l'étude des effets de la glucotoxicité sur la fonctionnalité du GHRH-R, en évaluant le niveau d'internalisation du Fluo-GHRH et celui de production d'AMPc basale et stimulée par le GHRH, le principal second messenger utilisé par ce récepteur pour stimuler la sécrétion de GH.

Une étude de régulation génique a également été menée, dans des hypophyses antérieures et des hypothalamus de rats jeunes et âgés, nourris *ad libitum*, et de rats âgés, soumis à une restriction calorique modérée de longue durée, avec la caséine ou le soja comme source de protéine. Elle avait pour but : 1) d'identifier les modulations des gènes impliqués dans la fonction somatotrope hypothalamo-hypophysaire avec le vieillissement et ceux des effets bénéfiques de la RCMLD, incluant une contribution des systèmes de défenses contre le stress oxydatif, et 2) de fournir des éléments d'identification des mécanismes qui contribuent au vieillissement réussi.

4.1 Niveaux d'ARNm du GHRH-R dans les cellules hypophysaires en situation de glucotoxicité et présence de stress oxydatif

Chez le rat âgé ainsi que chez le rat diabétique, la régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R est respectivement associée à une hyperglycémie modérée et sévère (Gaudreau et coll., soumis 2006 ; Article 3.1). De plus, Renier et Serri (1991) ont mis en évidence qu'une exposition de 72 h à une concentration élevée de glucose (22 mM) réduisait significativement la sécrétion de GH stimulée par le GHRH, dans les cultures primaires de cellules hypophysaires de rats jeunes. Dans

les cellules d'hypophyses antérieures de rats âgés de 18 mois, le niveau de transcrit de 2,5 kb, correspondant au GHRH-R fonctionnel, diminue, et celui de 4,0 kb, correspondant possiblement à une forme non traduite de GHRH-R, augmente (Gaudreau et coll., 1999b). De plus, dans l'hypophyse antérieure de rats diabétiques de type 1, une régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R fonctionnel survient, en fonction de la durée et de la sévérité du diabète (Article 3.1). Ces résultats suggèrent que la glucotoxicité cellulaire, une caractéristique métabolique commune à ces deux états, pourrait jouer un rôle direct au niveau du GHRH-R, au cours du vieillissement et durant l'évolution du diabète de type 1.

Il a été mis en évidence que les niveaux d'ARNm du GHRH-R sont modulés dans les cellules hypophysaires en culture, en fonction de la concentration de D-glucose dans le milieu ainsi que de la durée d'exposition à cet agent. Une diminution significative de 1,3 fois des niveaux d'ARNm du GHRH-R a été observée, suite à une incubation de 24 h en présence de 33 mM de D-glucose, comparativement à une incubation en présence de 6 mM de D-glucose. Durant cette période, aucun effet n'est observé en présence de 12 mM de D-glucose. Les niveaux d'ARNm du GHRH-R sont régulés différemment après une exposition de 48 h au D-glucose. Une diminution de 1,6 fois des niveaux d'ARNm du GHRH-R est provoquée par une concentration de 12 mM de D-glucose, alors que la diminution devient marginale dans les cellules exposées à 33 mM de D-glucose. Ces résultats sont en accord avec ceux de Park (2002), montrant qu'une exposition de 48 h à une concentration élevée de glucose (25 mM) entraîne, dans des cellules de tubule proximal de rein de lapin en culture primaire, une diminution significative des niveaux d'ARNm du récepteur de l'angiotensine II (AT_1 -R), lequel est un autre membre de la famille des GPCRs.

Ce changement dans la dynamique temporelle de régulation à la baisse des niveaux d'ARNm du GHRH-R ne peut s'expliquer par un niveau différentiel d'apoptose ou de nécrose, puisqu'il était faible et non significativement différent dans toutes les conditions expérimentales utilisées. Les mécanismes d'action de la glucotoxicité, découlant d'une hyperglycémie, peuvent être multiples. Plusieurs

travaux ont proposé une association entre la glucotoxicité cellulaire et l'augmentation de stress oxydatif. Une étude récente dans les cellules de tubule proximal de rein de lapin, portant sur la régulation de l'expression du récepteur de l'AT₁ par la glucotoxicité, a mis en évidence l'implication du stress oxydatif (Park et coll., 2002). Les niveaux d'ARNm du GHRH-R étant régulés de manière similaire à ceux de l'AT₁-R, dans une situation de glucotoxicité, la présence de stress oxydatif a été proposée comme mécanisme potentiel. Les niveaux de LPO membranaire ont été évalués dans les cellules hypophysaires en culture, en fonction de la concentration de D-glucose et du temps d'exposition. Une augmentation maximale de LPO (3,8 fois) a été obtenue après une heure d'exposition en présence de 33 mM de D-glucose, indiquant une génération rapide de ROS, similaire à celle produite en présence de peroxyde de cumène (0,5 mM). Le niveau de LPO était plus faible, mais demeurait significativement élevé (1,8-2,5 fois), suite à une exposition de 4, 24 et 48 h à une concentration de 33 mM de D-glucose. Ces résultats concordent avec ceux rapportée par Whiteside et Dlugosz (2003) dans les cellules mésangiales rénales de rat, exposées une heure à 30 mM de D-glucose. Dans la même étude, les auteurs rapportent une légère diminution de ROS mesurés après 24 et 48 h d'exposition en comparaison à 1h (Whiteside et Dlugosz, 2003). La diminution de LPO pourrait s'expliquer par une augmentation de la réponse cellulaire antioxydante, en fonction du temps, réagissant à la forte augmentation de ROS. Pour confirmer cette hypothèse, les concentrations et les activités des enzymes à propriétés antioxydantes (GPX, CAT, Cu/Zn-SOD et Mn-SOD) devront être étudiés dans notre modèle cellulaire. L'augmentation maximale de LPO obtenue suite à une heure d'exposition en présence de 12 mM de D-glucose était de 3 fois. Subséquemment, le niveau de LPO est demeuré augmenté de façon similaire à celui des cellules hypophysaires exposées à 33 mM de D-glucose, soit 2,1 fois à 4 h, 2,7 fois à 24 h et 1,8 fois à 48 h. Aucune corrélation n'a été obtenue entre le niveau de LPO et la concentration ou la durée d'exposition des cellules hypophysaires au D-glucose. Toutefois, il est possible de suggérer qu'une régulation différentielle des niveaux d'ARNm du GHRH-R se produise selon la sévérité de la glucotoxicité. Fait intéressant, l'addition au milieu de culture de 2,5

mM de Trolox, un analogue hydrosoluble de la vitamine E, protège complètement les cellules hypophysaires du stress oxydatif causé par la glucotoxicité. Considérant que la vitamine E est un antioxydant puissant, il sera important d'évaluer l'effet protecteur du Trolox sur le maintien des niveaux d'ARNm du GHRH-R, en situation de glucotoxicité.

Dans les cultures primaires de cellules de tubule proximal de lapin exposées à une concentration élevée en D-glucose, Park et Han (2002) ont mis en évidence un mécanisme de régulation à la baisse des niveaux d'ARNm de l'AT₁-R, impliquant le stress oxydatif, menant à l'activation directe ou indirecte des PKC et à l'augmentation des taux de TGF- β 1, un médiateur de l'inflammation. Un mécanisme similaire a été décrit dans les cellules mésangiales. Ce mécanisme permettrait une activation directe par les ROS et impliquerait des changements de l'état redox des groupements sulfhydryls des régions riches en cystéines des PKC, ce qui pourrait les rendre plus sensible à une activation par le DAG (Whiteside et Dlugosz, 2002). De plus, l'activation de la voie des polyols suite à une entrée importante de D-glucose dans la cellule, augmenterait le DAG nouvellement synthétisé, ce qui activerait les PKC (Whiteside et Dlugosz, 2002). Dans les cellules mésangiales, l'inhibition de l'aldose réductase préviendrait l'accumulation de DAG observée dans les premières 24 h d'exposition à une concentration élevée de glucose et préviendrait la translocation de la PKC- δ - ϵ causée par une exposition de 48 h à une concentration élevée de glucose. Suite à l'activation des PKC, la voie des MAPK est stimulée, particulièrement ERK1/2, nécessaire à la croissance des cellules mésangiales, à l'augmentation de facteurs de croissance et de protéines de la matrice extracellulaire (Whiteside et Dlugosz, 2002). La participation de la voie des polyols, des PKC, des MAPK et du TGF- β dans la régulation de l'expression du GHRH-R, suite à un état de glucotoxicité, n'a pas encore été étudiée, mais représente une piste importante. L'expression du TGF- β a d'ailleurs été rapportée dans les cellules d'hypophyse antérieure de rat (Pastorcic et coll., 1997) mais le rôle potentiel de ce facteur dans la régulation du GHRH-R n'a pas encore été étudié.

D'après les résultats obtenus, il est difficile d'établir un parallèle entre état de glucotoxicité élevé *in vitro* (33 mM) dans les cellules hypophysaires en culture et la régulation des niveaux de transcrits d'ARNm du GHRH-R hypophysaire au cours de l'évolution du diabète de type 1. Chez les rats diabétiques, 2 jours post-STZ, la glycémie est déjà très élevée, toutefois aucune diminution des transcrits d'ARNm du GHRH-R n'est observée. Ainsi, les effets de la glucotoxicité seraient modulés *in vivo*, par d'autres substrats métaboliques, hormonaux et antioxydants qui sont absents dans un modèle *in vitro*, par exemple une augmentation de la sécrétion de GHRH hypothalamique au cours des premiers jours du diabète (Leidy et coll., 1995). La dynamique des effets obtenus *in vitro* est donc plutôt similaire à celle obtenue dans l'hypophyse de rats diabétiques 60 jours après l'induction du diabète mais suit le profil de régulation des niveaux d'ARNm dans la médulla rénale.

Par ailleurs, la dynamique de régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R obtenue *in vitro*, en présence de 12 mM de D-glucose est en accord avec celle des transcrits d'ARNm du GHRH-R observés au cours du vieillissement (Gaudreau et coll., 1999b; Gaudreau et coll., 2006). De plus, Shimokawa et coll. (2000) ont rapporté une diminution de 1,3 et 3,3 fois des niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire à l'âge de 16 et 24 mois, respectivement, en comparaison à ceux des rats de 6 mois. Ces résultats suggèrent donc un lien entre la glycémie des rats de 18 mois (≈ 12 mM) et la régulation de l'expression du GHRH-R. Ainsi une glucotoxicité modérée mais de longue durée, mimant les effets de l'augmentation progressive de la glycémie au cours du vieillissement, pourrait affecter directement l'expression du GHRH-R.

4.2 Effets de la glucotoxicité sur la fonctionnalité du GHRH-R

Tel que rapporté dans l'article 1 de ce mémoire, des modifications des niveaux de récepteurs fonctionnels (liaison au GHRH) ont été identifiées chez le rat diabétique de type 1, en plus de celle des niveaux d'ARNm du GHRH-R. Ainsi, une diminution des concentrations de complexe ligand-récepteur hypophysaire de 45

kDa (GHRH-R fonctionnel) a été mise en évidence, 60 jours après l'induction du diabète. Ceci coïncidant avec une diminution des transcrits d'ARNm de 2,5 kb. Dans les cellules d'anses de Henlé de la médulla rénale, la diminution des niveaux d'ARNm du GHRH serait plutôt compatible avec une augmentation de la traduction du GHRH-R, et une augmentation des niveaux d'ARNm entre 2 et 21 jours post-induction du diabète. En se basant sur ces résultats et ceux discutés précédemment, portant sur les niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire obtenus *in vitro* en situation de glucotoxicité, une étude des effets de la glucotoxicité sur la fonctionnalité du GHRH-R s'avérait nécessaire.

La fonctionnalité d'un GPCR comme le GHRH-R se caractérise en autres par sa capacité d'internalisation, suite à la liaison par son ligand (GHRH), et d'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire (production d'AMPC), menant à une réponse biologique (sécrétion de GH). L'internalisation constitue un mécanisme important dans l'activité et la régulation des GPCR. L'endocytose des complexes ligands-récepteurs présents à la surface de la membrane cytoplasmique est impliquée dans le phénomène de désensibilisation et resensibilisation du récepteur, ainsi que dans l'adressage intracellulaire menant au recyclage à la surface membranaire ou à la dégradation lysosomiale des récepteurs (Ferguson, 2001). Chez le rat LOU, un nouveau modèle de vieillissement réussi (Alliot et coll., 2002) une quantification de Fluo-GHRH internalisé dans les cellules d'hypophyses antérieures dispersées a permis de mettre en évidence des changements au cours du vieillissement. Dans l'hypophyse de rats âgés de 16-18 mois, deux types de marquage fluorescent ont été identifiés. Un faible niveau de fluorescence a été détecté à 37°C dans 73% des animaux, résultant de l'absence d'internalisation du complexe ligand-récepteur. Dans l'autre 27%, des niveaux de fluorescence étaient similaires à ceux retrouvés dans l'hypophyse de rats jeunes, indiquant un niveau de récepteurs fonctionnels optimal (Veyrat-Durebex et coll., 2005).

Afin de déterminer si le processus d'internalisation du GHRH-R est affecté par la glucotoxicité, une étude à l'aide du Fluo-GHRH a été effectuée dans les cellules hypophysaires en culture ayant été exposées à 6, 12 et 33 mM de D-

glucose durant 16-24 h. Un faible niveau de fluorescence était visible, suite à une incubation de 90 min à 37°C en présence de Fluo-GHRH, dans les cellules exposées à 12 ou 33 mM de D-glucose. Par contre, des niveaux de fluorescence modérés à élevés, et une augmentation de 1,3 à 1,6 fois de la fluorescence totale, étaient présents dans les cellules exposées à 6 mM de D-glucose, dû à l'internalisation et à la concentration du Fluo-GHRH dans les organelles (Veyrat-Durebex et coll., 2005). Ce faible niveau de fluorescence est compatible avec une diminution du nombre de GHRH-R fonctionnels ou avec une diminution d'affinité de liaison du GHRH, qui aurait pour effet une dissociation rapide du complexe Fluo-GHRH-GHRH-R, à la membrane cytoplasmique, à 37°C. La diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R observée après 24 h de culture en présence de 33 mM de D-glucose pourrait expliquer une diminution de Fluo-GHRH internalisé. Par contre, cette association ne peut être faite dans les cellules ayant été exposées à 12 mM de D-glucose. Donc, le faible niveau de Fluo-GHRH internalisé pourrait être compatible avec une modification de la structure même du GHRH-R. Nous pouvons spéculer que les ROS puissent entre autres, oxyder les groupements sulfhydryls des cystéines du GHRH-R et entraîner un changement de la conformation du récepteur qui permet une liaison à haute affinité du GHRH. Dans les hypophyses de rats âgés de 18 mois, une absence de sites de liaison à haute affinité du GHRH ainsi qu'une réduction du nombre total des sites de liaison ont été rapportées (Aribat et coll., 1991). Sachant qu'un état d'hyperglycémie de l'ordre de 12 mM est retrouvé chez les rats âgés, il peut être postulé que des modifications conformationnelles du GHRH-R résultant de la glucotoxicité, soient responsables de l'altération du processus d'internalisation du GHRH-R.

La voie adénylate cyclase-AMPC étant la principale voie utilisée par le système GHRHergique hypophysaire pour stimuler la sécrétion de GH, la quantification de la production d'AMPC stimulée par le GHRH a été retenue comme autre marqueur de la fonctionnalité du GHRH-R.

La présence d'une augmentation importante de LPO suite à une heure d'exposition au D-glucose, ainsi que les résultats obtenus avec le Fluo-GHRH, suggèrent que des effets délétères sur le GHRH-R puissent survenir tôt. La production d'AMPc basale et stimulée par le GHRH a donc été mesurée après 4, 24 et 48 h d'exposition à 12 ou 33 mM de D-glucose. Une exposition de 4, 24 h ou 48 h à 12 mM D-glucose n'a provoqué aucune modification de la réponse en AMPc. Ces résultats suggèrent qu'une faible fraction de GHRH-R fonctionnel serait suffisante pour l'obtention d'une production maximale de cAMP stimulée par le GHRH. Par contre, une diminution significative de production d'AMPc en réponse à 1, 10, et 100 nM de GHRH a été observée à 24 et 48 h d'incubation dans les cellules exposées à 33 mM de D-glucose. Parallèlement, l'utilisation de la forskoline (activateur direct de l'adénylate cyclase) dans chaque expérience a permis de confirmer que les effets observés étaient liés à des modifications du GHRH-R et non à une altération de la voie adénylate cyclase-AMPc. En présence d'une glucotoxicité sévère (33 mM), les effets délétères observés au niveau du GHRH-R et de son ARNm résultent en une diminution importante de production d'AMPc stimulée et vraisemblablement de GH. Par contre, en présence d'une glucotoxicité modérée, les effets ne semblent pas suffisants, dans la fenêtre temporelle étudiée pour obtenir une diminution significative d'AMPc. Ainsi, l'altération de la fonctionnalité du GHRH-R par une concentration élevée de D-glucose (33 mM) pourrait expliquer la diminution de la sécrétion de GH observée dans le diabète de type 1. Des études supplémentaires devront donc être réalisées afin de mettre en corrélation les changements de niveaux d'ARNm du GHRH-R, de Fluo-GHRH internalisé et de sécrétion de GH, en fonction de la sévérité et de la durée de la glucotoxicité, afin de préciser le rôle de la glucotoxicité modérée de longue durée, sur la perte de sensibilité au GHRH avec le vieillissement.

D'autres modifications du GHRH-R tels que l'oxydation du récepteur par les ROS pourraient être impliquées dans la perte de sensibilité au GHRH, identifiée dans les états de glucotoxicité. La LPO pourrait entraver le processus d'internalisation du GHRH-R, suite à une stimulation au GHRH, et l'efficacité de

signalisation, en favorisant la liaison de MDA au GHRH-R (Uchida et coll., 1997). Jusqu'à maintenant, aucune étude impliquant des GPCRs n'a été effectuée pour valider une telle hypothèse.

Des modifications menant à la formation d'AGEs du GHRH-R pourraient également contribuer au phénomène. L'étude menée dans les cellules hypophysaires et rénales de rats diabétiques ne permet pas de proposer qu'un tel mécanisme soit important, puisque les complexes ligand-récepteur de poids moléculaire élevé (≈ 150 kDa) ne sont pas augmentés avec le diabète. Il sera toutefois nécessaire de mesurer les niveaux d'immunoréactivité AGE/GHRH-R afin de tirer une conclusion définitive.

4.3 Effets du vieillissement et de la restriction calorique de longue durée sur la modulation de gènes impliqués dans la fonction somatotrope

La restriction calorique représente, à ce jour, la stratégie nutritionnelle la plus efficace pour prévenir ou retarder les pathologies reliées au vieillissement. Les mécanismes qui participent aux effets bénéfiques de la restriction calorique demeurent encore mal définis. Néanmoins, il a été mis en évidence que la RCMLD contribue au maintien de la fonctionnalité de l'axe somatotrope, amène une diminution du stress oxydatif ainsi qu'une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Heilbronn et Ravussin, 2003 ; Sohal et Weindruch, 1996). La présente étude a ciblé les effets de la RCMLD sur la régulation de l'expression des gènes de l'hypothalamus et de l'hypophyse antérieure.

Dans l'hypophyse, une diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R a été observée chez les rats âgés nourris *ad libitum*, comparativement à ceux des rats jeunes. De plus, leur régulation à la hausse suite à une RCMLD supporte les résultats provenant d'études précédentes (Gaudreau et coll., 1999a ; Gaudreau et coll, soumis 2006 ; Girard et coll., 1998 ; Shimokawa et coll., 2000). Le récepteur de la somatostatine 2 (Sstr2) est également diminué au cours du vieillissement mais n'est pas affecté par la RCMLD. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par

Shimokawa et coll. (2000) pour le Sstr2 et le Sstr5 dans l'hypophyse antérieure de rats de 16-24 mois. Aucune régulation des récepteurs des sécrétagogues de la GH (GHS-R) ou de la ghrelina n'est observée au cours du vieillissement ou par la restriction calorique. Ces résultats suggèrent que la restriction calorique est en mesure de protéger le GHRH-R des effets délétères du vieillissement et que cet effet n'est pas généralisé à tous les GPCRs de la cellule somatotrope.

Les concentrations sériques d'IGF-1 totale sont diminuées chez le rat âgé (Gaudreau et coll., 2006 ; Girard et coll., 1998), alors que les niveaux hypophysaires d'ARNm de l'IGF-1 et de sa protéine porteuse, IGFbp3, sont augmentés. La RCMLD augmente les niveaux d'ARNm de l'IGF-1 et diminue ceux d'IGFbp 3. Bien que l'IGFbp3 ait été détectée dans les lactotropes de mouton (Adam et coll., 2000), nos résultats montrent pour la première fois la présence de l'ARNm d'IGF-1 et d'IGFbp3 dans l'hypophyse antérieure de rat. Même si l'IGF-1 peut inhiber l'expression du GHRH-R dans l'hypophyse antérieure de rat (Sugihara et coll., 1999), il demeure prématuré de spéculer sur l'importance de notre observation. La présence d'ARNm de l'IGF-1 devra d'abord être confirmée par RT-PCR en temps réel. L'IGFbp3, la plus abondante protéine de liaison sérique pour l'IGF-1 (Koedam et coll., 1998), est augmentée de près de trois fois dans l'hypophyse de rats âgés nourris *ad libitum*. Une telle augmentation devra également être validée par RT-PCR en temps réel avant de suggérer un rôle pour cette protéine, chez le rat jeune et âgé.

Dans l'hypothalamus, l'expression du préproGHRH est diminuée et celle de l'IGFbp3 est augmentée significativement par le vieillissement tandis que la RCMLD les normalise. Cette régulation positive de l'ARNm du préproGHRH par la restriction calorique pourrait signifier une augmentation du GHRH hypothalamique et ainsi contribuer au rôle bénéfique de la restriction calorique dans le maintien de fonction somatotrope. Afin de vérifier si la régulation de l'ARNm du préproGHRH, au cours du vieillissement et par la restriction calorique, se traduit par une régulation des niveaux de protéines, la détermination des niveaux immunoréactifs de GHRH hypothalamique devra être effectuée. Comme une diminution de 1,4 fois des niveaux d'ARNm de préproGHRH hypothalamique a déjà été observée chez des

rats âgés de 18 mois en restriction calorique mais non chez ceux nourris *ad libitum* (Gaudreau et coll., soumis), une confirmation par RT-PCR en temps réel devra être effectuée en utilisant les amorces utilisées dans les deux études.

Les niveaux d'ARNm du GHRH-R ne sont pas modifiés de façon significative au cours du vieillissement et de la restriction calorique. La faible quantité de GHRH-R retrouvée dans l'hypothalamus en comparaison à l'hypophyse rend la quantification par RT-PCR plus difficile et pourrait expliquer cette absence de régulation. Une étude utilisant des noyaux hypothalamiques spécifiques, tel que le noyau arqué (Frohman et coll., 1989b), ventromédian et périventriculaire (Takahashi et coll., 1995) permettrait possiblement d'augmenter la concentration de GHRH-R et d'obtenir des résultats différents.

4.4 Effets du vieillissement et de la restriction calorique de longue durée sur la modulation de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif

L'accumulation de ROS, et des dommages cellulaires et moléculaires qu'elles causent, apparaît comme étant une voie importante dans le processus du vieillissement (Forster et coll., 2000). Plusieurs études ont rapporté les bénéfices de la restriction calorique pour diminuer la génération des ROS (Hagopian et coll., 2005), l'oxydation des protéines, la LPO (Lambert et coll., 2004) ainsi que les dommages à l'ADN (Lopez-Torres et coll., 2002), causés par le vieillissement. De plus, une étude réalisée chez des rats Fischer 344 a mis en évidence que la restriction calorique atténuait les effets du vieillissement en augmentant les niveaux d'ARNm de la SOD-CuZn, de la catalase et de la glutathion peroxydase ainsi que leur activité dans le foie (Rao et coll., 1990 ; Merry, 2000). Dans la présente étude de régulation génique, l'expression des enzymes impliquées dans le contrôle du stress oxydatif ont été analysés.

Dans l'hypophyse antérieure des rats âgés et nourris *ad-libitum*, une augmentation des niveaux d'ARNm de l'inhibiteur alpha du NF κ B (Nfkbia) est

remarquée. La protéine inhibitrice Nfkbia est associée au facteur de transcription NF κ B. Elle est phosphorylée dans les états de stress oxydatif et dégradée par le protéasome 26s, permettant la translocation nucléaire de NF κ B (Schoonbroodt et Piette, 2000). Le NF κ B est impliqué dans plusieurs types de réponses cellulaires dont l'apoptose, l'immunité, le cycle cellulaire, la réponse au stress oxydatif et les réactions inflammatoires (Gosselin et Abbadie, 2003). Une étude portant sur la régulation du NF κ B au cours du vieillissement décrit une forte augmentation de la liaison nucléaire du NF κ B dans le cœur et le foie de rats de 30 mois. Par ailleurs, une étude effectuée dans la glande surrénale de rats âgés de 24 mois a mis en évidence une diminution de la liaison nucléaire de NF κ B sans modification de la protéine Nfkbia. D'autres travaux dans les fibroblastes humains sénescents (WI-38) ont montré une diminution de l'activité de liaison nucléaire de NF κ B ainsi qu'une faible diminution de la protéine du Nfkbia (Helenius et coll., 1996). En se basant sur ces observations, l'augmentation des niveaux d'ARNm de Nfkbia dans l'hypophyse des rats âgés aurait pour effet d'augmenter la concentration de protéines inhibitrice et ainsi de provoquer une diminution de la translocation nucléaire de NF κ B. Une diminution de l'activation de NF κ B pourrait entraîner une diminution de prolifération cellulaire et de réponse au stress oxydatif participant aux dommages associés au vieillissement. De plus, un site de liaison pour NF κ B est présent dans la région promotrice du GHRH-R (Petersenn et coll., 1998), suggérant que cette augmentation de Nfkbia participe à une régulation à la baisse des niveaux de GHRH-R.

Le proto-oncogène c-fos est augmenté dans l'hypophyse des rats de 20 mois nourris *ad libitum* mais normalisé par la RCMLD. Ces résultats pourraient être associés à la plus faible incidence de tumeurs chez les rats âgés en restriction calorique (Yu, 1994), soit une diminution de 1,35 fois du nombre de tumeurs hypophysaires dans la colonie étudiée (9/38 chez les rats nourris *ad libitum* versus 6/34 chez les rats en restriction calorique). De plus, l'activation de c-fos par le H₂O₂ a été démontrée dans plusieurs types cellulaires telles que les cellules épithéliales pulmonaires de rat (Janssen et coll., 1997) et les chondrocytes de bœuf (Lo et Cruz, 1995). Considérant les propriétés antioxydantes de la restriction calorique, la

régulation à la baisse de c-fos chez les rats restreints pourrait suggérer que l'activation de c-fos au cours du vieillissement soit reliée à l'augmentation du stress oxydatif.

Le système glutathion, l'un des systèmes antioxydants les plus importants de l'organisme, est également modulé par la restriction calorique. En effet, dans l'hypophyse de rats âgés, une augmentation de l'ordre de trois fois l'expression de la glutathion peroxydase 2 (GPx2) est mise en évidence en comparaison aux rats de 2 mois. Ce niveau de GPx2 est diminué chez les rats âgés soumis à une restriction calorique modérée de longue durée. La fonction principale de la GPx2 étant l'élimination des hydroperoxydes par l'oxydation de la glutathion, sa régulation à la baisse par la restriction calorique pourrait s'expliquer par une diminution de la production des peroxydes endogènes. Les niveaux d'ARNm de la glutathion-s-transférase alpha 1 (GSTa1) sont augmentés avec la RCMLD. Sachant que la GSTa1 protège les lipides de la peroxydation en éliminant les peroxydes et ses produits dérivés (Raza et coll., 2002), cette hausse d'expression supporte un rôle dans le maintien des défenses antioxydantes de la restriction calorique. Les niveaux d'ARNm de deux sous-unités des cytochromes C oxydases (Cox6a2 et Cox8h) sont régulés à la baisse chez les rats âgés. Ces sous-unités participant à la formation de l'enzyme cytochrome c oxydase, et à la régulation de son activité réductrice de l'oxygène en H₂O, sont donc importantes dans la réponse au stress oxydatif. Leur diminution au cours du vieillissement pourrait expliquer la diminution des défenses antioxydantes, en particulier par la cytochrome oxydase, et donc l'augmentation de stress oxydatif. En effet, un blocage de l'activité de la cytochrome c oxydase, par la transfection d'oligonucléotides antisens dans des cellules endothéliales d'artère pulmonaire, a provoqué une augmentation du stress oxydatif et de dommages oxydatifs aux lipides et protéines similaires aux niveaux retrouvés dans des cellules sénescents du même type (Xin et coll., 2003). Une dernière enzyme antioxydante, l'hème oxygénase 1 (Hmox1) est augmentée dans l'hypophyse des rats en restriction calorique. L'hème oxygénase est responsable de la conversion de l'hème en biliverdine (Poss et Tonegawa, 1997) et a également été décrite dans l'hypophyse

antérieure de rat où elle jouerait un rôle dans la sécrétion de prolactine et de gonadotrophine (Alexandreau et Lawson, 2003). Son augmentation chez les rats en RCMLD supporterait l'hypothèse du pouvoir protecteur de cette stratégie nutritionnelle.

Dans l'hypothalamus, la RCMLD a peu d'impact sur les gènes impliqués dans le contrôle du stress oxydatif, car aucune expression différentielle significative n'est observée chez les rats restreints par rapport à ceux nourris *ad libitum*. Toutefois, un apport alimentaire en protéine de soya comparativement à la caséine régule à la hausse les niveaux d'ARNm de l'hème oxygénase1 (Hmox1) et de la *Bcl2-like 1* (Bcl2l1) chez les rats en RCMLD. L'hème oxygénase est reconnue pour son rôle antioxydant (Poss et Tonegawa, 1997) et le Bcl2l1 est une protéine anti-apoptotique appartenant à la famille Bcl2 (Kim, 2005). Ces résultats renforcent les données de la littérature qui attribuent au soja des propriétés antioxydant (Vega-López, 2005). Comme ces effets ne sont pas retrouvés chez les rats âgés nourris à satiété, la nécessité d'une synergie entre une alimentation riche en protéine de soya et la restriction calorique semble nécessaire pour obtenir un effet bénéfique.

Bien que cette étude de régulation génique nous ait fourni plusieurs cibles intéressantes, une validation par RT-PCR en temps réel sera nécessaire afin de confirmer ces régulations. De plus, la présence d'une régulation de l'ARNm ne se traduit pas toujours en une régulation des niveaux de la protéine, ces derniers devront donc être quantifiés avant de proposer une implication de ces cibles dans le vieillissement réussi.

**5. CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES**

La présente étude a permis de caractériser et de quantifier les effets directs de la glucotoxicité sur la régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R et sur la perte de fonctionnalité du récepteur (internalisation du Fluo-GHRH, production de d'AMPC stimulée par le GHRH), dans un modèle *in vitro* de cellules d'hypophyse antérieure de rat. Elle a également permis de vérifier l'hypothèse selon laquelle une glucotoxicité cellulaire puisse constituer un mécanisme commun, exerçant un rôle important dans la perte de sensibilité des somatotropes au GHRH, au cours du diabète de type 1 et du vieillissement. De plus, la quantification de la LPO *in situ* a permis d'associer une augmentation significative de stress oxydatif à la glucotoxicité dans ce modèle cellulaire, ce qui pourrait contribuer aux effets observés sur le GHRH-R.

Afin de préciser l'origine des modifications de niveaux d'ARNm du GHRH-R en situation de glucotoxicité, des expériences devront être effectuées en présence et en absence d'actinomycine D, un bloqueur de la transcription, afin de déterminer si les changements sont d'origine transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Les résultats obtenus dans l'étude de l'internalisation du Fluo-GHRH suggèrent une modification des paramètres de liaison du GHRH suite à une exposition à 12 ou 33 mM de D-glucose. Des essais de liaison avec le [^{125}I -Tyr 10]hGHRH(1-44)NH $_2$ permettraient donc de déterminer l'affinité de liaison (Kd) du GHRH et la concentration de GHRH-R (Bmax). Une approche alternative serait l'utilisation du Fluo-GHRH et d'une quantification par FACS (*Fluorescence activated cell sorting*), tel que réalisé avec la Fluo-neurotensine (Faure et coll., 1994). La production réduite d'AMPC stimulée par le GHRH, suite à une exposition à 33 mM de D-glucose, suggère une diminution de la capacité du GHRH-R à stimuler la sécrétion de GH. Il sera donc important de quantifier la sécrétion de GH dans ces conditions, afin de supporter cette hypothèse. De plus, l'évaluation des changements de sensibilité au GHRH des autres voies de signalisation impliquées dans la synthèse et la sécrétion de GH, de même que la prolifération des somatotropes (PKC, MAKP (ERK1/2)) devront être effectués afin de déterminer si les altérations du GHRH-R les affectent différemment de celle de l'adénylate

cyclase. Finalement, des périodes d'exposition plus longues que 48 h devront être évaluées afin d'établir les conditions d'altérations de la réponse au GHRH dans un état de glucotoxicité modérée, soit 12 mM de D-glucose.

En ce qui concerne les mécanismes cellulaires et moléculaires qui pourraient être impliqués dans les dommages au GHRH-R en situation de glucotoxicité, les effecteurs cellulaires tels que la PKC, le TGF- β et le NF- κ B devront être étudiés. Si des changements sont observés en situation de glucotoxicité, des expériences à l'aide d'inhibiteurs spécifiques, d'anticorps neutralisants ou d'ARN interférant (siRNA) pourraient être utilisés pour préciser leur rôle.

Par ailleurs, l'étude de régulation génique a démontré la capacité de la restriction calorique à maintenir ou améliorer les niveaux d'ARNm de molécules clés de la fonction somatotrope au cours du vieillissement, particulièrement le GHRH-R hypophysaire et le GHRH hypothalamique. La restriction calorique exerce également des effets protecteurs en augmentant des niveaux d'ARNm de gènes d'enzymes impliqués dans le contrôle du stress oxydatif, tels que Gsta1 dans l'hypophyse et l'Hmox dans l'hypothalamus et en diminuant des niveaux d'ARNm de proto-oncogènes tel que c-fos dans l'hypophyse. Le rôle de la restriction calorique dans la lutte contre les dommages oxydatifs ainsi que le maintien des niveaux d'ARNm du GHRH-R renforcent notre hypothèse selon laquelle les altérations du GHRH-R, au cours du vieillissement et du diabète de type 1, seraient causées par la glucotoxicité avec la participation du stress oxydatif.

Considérant ces effets bénéfiques de la restriction calorique sur les niveaux d'ARNm du GHRH-R au cours du vieillissement, l'utilisation de stratégies nutritionnelles alternatives sera à considérer pour protéger le GHRH-R ou retarder l'apparition d'effets délétères sur le GHRH-R. En effet, plusieurs études ont montré les bienfaits d'une alimentation riche en antioxydants, provenant principalement de

fruits et légumes, par l'augmentation des défenses antioxydantes, la diminution de la production de ROS et des dommages cellulaires. Afin de démontrer l'implication du stress oxydatif dans la perte de sensibilité au GHRH, suite à des altérations réceptorielles, une série d'expériences similaires à celle décrites dans la présente étude devra être réalisée en présence de Trolox, un analogue de la vitamine E qui prévient efficacement la LPO dans ce modèle cellulaire. La vitamine E aurait également la propriété de prévenir la formation d'AGEs en présence de concentrations élevées de glucose (30 mM) dans les cellules cardiaques de bœuf (Giardino et coll., 1996), caractéristique qui pourrait s'avérer intéressante si les altérations du GHRH-R proviennent d'une modification en AGEs.

Si toutefois l'utilisation de la vitamine E ne produit pas les effets escomptés pour la réduction du stress oxydatif et des effets délétères du GHRH-R, d'autres vitamines antioxydantes pourront être évaluées seule ou en combinaison avec la vitamine E. Parmi les candidats, la vitamine C, dont la participation à la régénération de la vitamine E (Rahimi et coll., 2005) serait une propriété importante à considérer pour une combinaison vitamine E-vitamine C. De plus, la vitamine C réduit l'oxydation des protéines en protégeant leurs groupements thiol (Tahimi et coll., 2005). Cet effet protecteur pourrait s'avérer important pour contrer les modifications du GHRH-R si elles surviennent par oxydation directe.

Par la suite, la capacité de molécules à fortes propriétés antioxydantes telles que la vitamine C, la vitamine E ou la taurine, pourraient être évaluées *in vivo* dans un modèle de rat vieillissant et comparé avec la RCMLD. Finalement, l'utilisation de phytonutriments ayant des propriétés antioxydantes reconnues tel que le lycopène, le resvératrol ou la curcumine pourraient également être utilisées *in vivo* chez ces rongeurs, afin d'évaluer les bienfaits d'une alimentation riche en antioxydants sur le maintien des niveaux de GHRH-R fonctionnels.

6. 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.

Abribat T, Deslauriers N, Brazeau P, Gaudreau P (1991) Alterations of pituitary growth hormone-releasing factor binding sites in aging rats. *Endocrinology* 128(1):633-5.

Adam CL, Gadd TS, Findlay PA, Wathes DC (2000) IGF-I stimulation of luteinizing hormone secretion, IGF-binding proteins (IGFBPs) and expression of mRNAs for IGFs, IGF receptors and IGFBPs in the ovine pituitary gland. *J Endocrinol* 166:247-254.

Agarwal S, Rao AV (2000) Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ* 163(6):739-44.

Agarwal S, Rao AV (1998) Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipids* 33(10):981-4.

Aguila M.C (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.

Ahn T, Yun CH, Oh DB (2006) Tissue-specific effect of ascorbic acid supplementation on the expression of cytochrome P450 2E1 and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Toxicol Lett* 166(1):27-36.

Aleppo G, Moskal SF, De Grandis PA, Kineman RD, Frohman LA (1997) Homologous down-regulation of growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 138:1058-1065.

Alexandreaanu IC, Lawson DM (2003) Heme oxygenase in the rat anterior pituitary: immunohistochemical localization and possible role in gonadotropin and prolactin secretion. *Exp Biol Med (Maywood)* 228(1):64-9.

Alliot J, Boghossian S, Jourdan D, Veyrat-Durebex C, Pickering G, Meynial-Denis D, Gaumet N (2002) The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*,57: B312-320.

Anderson LL, Jeftinija S, Scanes CG (2004) Growth Hormone Secretion: Molecular and Cellular Mechanisms and In Vivo Approaches. *Experimental Biology and Medicine* 229: 291-302.

Anderson LL, Jeftinija S, Scanes CG, Stromer MH, Lee JS, Jeftinija K, Glavaski-Joksimovic A (2005) Physiology of ghrelin and related peptides. *Domestic Animal Endocrinology* 29: 111-144.

Andreasen T, Helmgard L, Gaudreau P, Andersen PH (1996) Growth hormone-releasing substances. In: Ranke MB, Christiansen JS (eds) *The complexity of endocrine systems*. Mannheim, 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.

Bagnato A, Moretti C, Ohnishi J, Frajese G, Catt KJ (1992) Expression of the growth hormone-releasing hormone gene and its peptide product in the rat ovary. *Endocrinology* 130:1097-1102.

Bakhit RM, Klein BP, Essex-Sorlie D, Ham JO, Erdman JW Jr, Potter SM (1994) Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. *J Nutr* 124: 213-222.

Barger JL, Walford RL, Weindruch R (2003) The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era. *Exp Gerontol* 38: 1343-1351.

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.

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.

Barrows CH, Kokkonen GC (1982) Dietary restriction and life extension, Biological mechanisms. In: Moment GB, ed. *Nutritional approaches to aging research*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc, pp 219-243.

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(11):1730-9.

Bengmark S (2006) Impact of nutrition on ageing and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9(1):2-7.

Bengtsson BA, Brummer RJ, Eden S, Rosen T, Sjostrom L (1992) Effects of growth hormone on fat mass and fat distribution. *Acta Paediatr Suppl.* 383 : 62-5; discussion 66.

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

Bilezikjian LM, Seifert H, Vale W (1986) Desensitization to growth hormone-releasing factor (GRF) is associated with down-regulation of GRF-binding sites. *Endocrinology*. 118(5):2045-52.

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, Mitchell RL, Vale W, Verma IM (1987) Growth hormone-releasing factor induces c-fos expression in cultured primary pituitary cells. *Mol Endocrinol* 1: 300-305.

Billestrup N, Swanson LW, Vale W (1986) Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6854-6857.

Blanc S, Schoeller D, Kemnitz J, Weindruch R, Colman R, Newton W, Wink K, Baum S, Ramsey J (2003) Energy expenditure of rhesus monkeys subjected to 11 years of dietary restriction. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(1):16-23.

Blum SC, Heaton SN, Bowman BM, Hegsted M, Miller SC (2003) Dietary soy protein maintains some indices of bone mineral density and bone formation in aged ovariectomized rats. *J Nutr* 133: 1244-1249.

Bodkin NL, Ortmeyer HK, Hansen BC (1995) Long-term dietary restriction in older-aged rhesus monkeys: effects on insulin resistance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50: B142-147.

Bohlen P, Brazeau P, Bloch B, Ling N, Gaillard R, Guillemin R (1983) Human hypothalamic growth hormone releasing factor (GRF): evidence for two forms identical to tumor derived GRF-44-NH₂ and GRF-40. *Biochem Biophys Res Commun.* 114 : 930-6.

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.

Bonnefont-Rousselot D (2002) Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 5(5):561-8.

Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J (2000) Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 26:163±176.

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.

Boujon CE, Bestetti GE, Abramo F, Locatelli V, Rossi GL (1995) The reduction of circulating growth hormone and prolactin in streptozocin-induced diabetic male rats is possibly caused by hypothalamic rather than pituitary changes. *J Endocrinol.* 145(1): 19-26.

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.

Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB, Guillemin R (1984) Growth hormone-releasing factor from ovine and caprine hypothalamus: isolation, sequence analysis and total synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 25(2):606-14.

Brindle PK, Montminy MR (1992) The CREB family of transcription activators. *Curr Opin Genet Dev* 2:199-204.

Brownlee M (2003) A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. *J Clin Invest.* 112(12):1788-90.

Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414(6865):813-20.

Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H (1993) Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(14):6434-8.

Bucala R, Model P, Cerami A (1984) Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(1):105-9.

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.

Castillo AI, Aranda A (1997) Differential Regulation of Pituitary-Specific Gene Expression by Insulin-Like Growth Factor 1 in Rat Pituitary GH4C1 and GH3 Cells *Endocrinology* 138,5442-5451.

Ceriello A (2000) Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 49:27-9.

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.

Chen C, Xu R, Clarke IJ, Ruan M, Loneragan K, Roh SG (2000) Diverse intracellular signaling systems used by growth hormone-releasing hormone in regulating voltage-gated Ca²⁺ or K channels in pituitary somatotropes. *Immunol Cell Biol* 78: 356-368.

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

Chowen JA, Frago LM, Argente J (2004) The regulation of GH secretion by sex steroids. *Eur J Endocrinol* 151 Suppl 3:U95-100.

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

Clarke J, Snelling J, Ioannides C, Flatt PR, Barnett CR (1996) Effect of vitamin C supplementation on hepatic cytochrome P450 mixed-function oxidase activity in streptozotocin-diabetic rats. *Toxicol Lett.* 89(3):249-56.

Cohen LE, Hashimoto Y, Zanger K, Wondisford F, Radovick S (1999) CREB-independent regulation by CBP is a novel mechanism of human growth hormone gene expression. *J Clin Invest.* 104(8):1123-30.

Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305(5682):390-2.

Coimbra S, Castro E, Rocha-Pereira P, Rebelo I, Rocha S, Santos-Silva A (2006) The effect of green tea in oxidative stress. *Clin Nutr* 25(5):790-6.

Corton JC, Anderson SP, Stauber A (2000) Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 40:491-518.

Corton JC, Brown-Borg HM (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 in caloric restriction and other models of longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 60(12):1494-509.

Cronin MJ, Summers ST, Sortino MA, Hewlett EL (1986) Protein kinase C enhances growth hormone releasing factor (1-40)-stimulated cyclic AMP levels in anterior pituitary. Actions of somatostatin and pertussis toxin. *J Biol Chem* 261:13932-13935.

Croteau DL, Bohr VA (1997) Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem.* 272(41):25409-12.

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

Das M, Gabriely I, Barzilai N (2004) Caloric restriction, body fat and ageing in experimental models. *Obes Rev* 5: 13-19.

Davies KJ (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 83(3-4):301-10.

D'Costa AP, Ingram RL, Lehnem JE, Sonntag WE (1993) The regulation and mechanisms of action of growth hormone and insulin-like growth factor 1 during aging. *J Reprod. Fert.* 46:87-98.

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

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 324 (Pt 1):1-18.

Deslauriers N, Gaudreau P, Abribat T, Renier G, Petitclerc D, Brazeau P (1991) Dynamics of growth hormone responsiveness to growth hormone releasing factor in aging rats: peripheral and central influences. *Neuroendocrinology* 53(5):439-46.

Devi A, Jolitha AB, Ishii N (2006) Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) and antioxidant defense in the brain of adult rats. *Med Sci Monit.* 12(4): BR124-9.

Dhahbi JM, Kim H-J, Mote PL, Beaver R, Spindler SR (2004) Temporal linkage between the phenotypic and genomic response to caloric restriction. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5524-5529.

Dhawan V, Jain S (2005) Garlic supplementation prevents oxidative DNA damage in essential hypertension. *Mol Cell Biochem* 275(1-2):85-94.

Diz 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.

Doré D (1994) La régulation métabolique de la glycémie. Dans : *Biochimie clinique*. Ste-Foy (Qc) : éditions Le Griffon d'argile, pp. 245.

Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 12222–12226.

Ehlers CL, Reed TK, Henriksen SJ (1986) Effects of corticotropin-releasing factor and growth hormone-releasing factor on sleep and activity in rats. *Neuroendocrinology*. 42 : 467-74.

Esch F, Bohlen P, Ling N, Brazeau P, Guillemin R (1983) Isolation and characterization of the bovine hypothalamic growth hormone releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 117(3):772-9.

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.

Fahey JW, Zhang Y, Talalay P (1997) Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(19):10367-72.

Fang YZ, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18(10):872-9.

Farrajota, K (2003) Glucotoxicité cellulaire comme modèle de vieillissement du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance. Rapport de stage en Biochimie, Université de Montréal.

Faure MP, Gaudreau P, Shaw I, Cashman NR, Beudet A (1994) Synthesis of a biologically active fluorescent probe for labeling neurotensin receptors. *J Histochem Cytochem* 42: 755-763.

Feifel D, Vaccarino FJ (1989) Feeding effects of growth hormone-releasing factor in rats are photoperiod sensitive. *Behav Neurosci*. 103 : 824-30.

Feng Z, Hu W, Chasin LA, Tang MS (2003) Effects of genomic context and chromatin structure on transcription-coupled and global genomic repair in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31(20):5897-906.

Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53(1):1-24.

Fischer-Nielsen A, Poulsen HE, Loft S (1992) 8-Hydroxydeoxyguanosine in vitro: effects of glutathione, ascorbate, and 5-aminosalicylic acid. *Free Radic Biol Med*. 13(2):121-6.

Fodor M, Oudejans CBM, Delemarre-van de Waal HA (2001) Absence of androgen receptor in the growth hormone-releasing hormone-containing neurons in the mediobasal hypothalamus of the adult male rat. *J Neuroendocrinol* 13:724–727.

Forster MJ, Sohal BH, Sohal RS (2000) Reversible effects of long-term caloric restriction on protein oxidative damage. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55(11):B522-9.

Fraser RA, Siminoski K, Harvey S (1991) Growth hormone receptor gene: novel expression in pituitary tissue. *J Endocrinol* 128(3):R9-11.

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.

Frohman LA, Szabo M (1981) Ectopic production of growth hormone-releasing factor by carcinoid and pancreatic islet tumors associated with acromegaly. *Prog Clin Biol Res* 74:259-271.

Frohman MA, Downs TR, Chomczynski P, Frohman LA (1989a) 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, Chomczynski P, Brar A, Kashio Y (1989b) Regulation of growth hormone-releasing hormone gene expression and biosynthesis. *Yale J Biol Med* 62(5):427-33.

Frohman, L.A. Downs, T.R. et Chomczynski, P (1992) Regulation of growth hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 13 : 344-405.

Frohman LA (1996) Cellular physiology of growth hormone-releasing hormone. In: *Growth hormone secretagogues*, BB Bercu and RF Walker Eds Springer-Verlag, New-York : 137-44.

Gardner, H.W (1989) Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biol. Med* 7 : 65–86.

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, Robinette K, Girard N (1999a) Récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance et axe somatotrope: effet du vieillissement et de la restriction calorique de longue durée chez le rat. *L'année gérontologique*. Paris: 53-62.

Gaudreau, P, Boulanger L, Morel G (1999b) Axe somatotrope et vieillissement: importance du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance. *Medecine Science* 15: VII-IX.

Gaudreau P, Robinette K, Robert A, Boisvert C, Ferland G. Nutritional regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor in the aging rat: contribution of central and peripheral factors. *J Neuroendocrinol* submitted 11/2006.

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

Giardino I, Edelstein D, Brownlee M (1996) BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J Clin Invest.* 97(6):1422-8.

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(6):2836-42.

Girard N, Ferland G, Boulanger L, Gaudreau P (1998) Long-term calorie restriction protects rat pituitary growth hormone-releasing hormone binding sites from age-related alterations. *Neuroendocrinology* 68(1):21-9.

Girotti AW (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 39(8):1529-42.

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 : 227-32.

Goidin D, Kappeler L, Perrot J, Epelbaum J, Gourdji D (2000) Differential pituitary gene expression profiles associated- to aging and spontaneous tumors as revealed by rat cDNA expression array. *Endocrinology* 141: 4805-4808.

Gonzalez-Crespo S, Boronat A (1991) Expression of the rat growth hormone-releasing hormone gene in placenta is directed by an alternative promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88: 8749-8753.

Goodyer, C.G., De Stephano, L., Lai, W.H., Guyda, H.J. and Posner, B.I (1984) Characterization of insulin-like growth factor receptors in rat anterior pituitary, hypothalamus and brain. *Endocrinology*, 114 (1984) 1187±1195.

Gosselin K, Abbadie C (2003) Involvement of Rel/NF-kappa B transcription factors in senescence. *Exp Gerontol.* 38(11-12):1271-83.

Gracia MC (2006) Inflammatory, autoimmune, chronic diseases: bad diet and physical inactivity are causes or effects? *Med Hypotheses* 66(5):939-44.

Greaves K A, Parks JS, Williams JK (1999) Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Nutr* 129:1585-1592.

Gredilla R, Barja G (2005) Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* 146(9):3713-7.

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.

Guarente L, Picard F (2005) Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell* 120(4):473-82.

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 : 585-7.

Hagopian K, Harper ME, Ram JJ, Humble SJ, Weindruch R, Ramsey JJ (2005) Long-term calorie restriction reduces proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288(4): E674-84.

Hammer RE, Brinster RL, Rosenfeld MG, Evans RM, Mayo KE (1985) Expression of human growth hormone-releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth. *Nature* 315:413-416.

Han ES, Evans TR, Lee, S, Nelson JF (2001) Food restriction differentially affects pituitary hormone mRNAs throughout the adult Span of male F344 rats. *J Nut* 131:1987-1693

Hanew K, Utsumi A, Tanaka A, Ikeda H, Yokogoshi Y (1998) Secretory mechanisms of growth hormone (GH)-releasing peptide-, GH-releasing hormone-, and thyrotropin-releasing hormone-induced GH release in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 83(10):3578-83.

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.

Hasler CM (2000) The changing face of functional foods. *J Am Coll Nutr* 19(5 Suppl):499S-506S.

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

Heilbronn LK, Ravussin E (2003) Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 78(3):361-9.

Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, DeLany JP, Larson-Meyer DE, Rood J, Nguyen T, Martin CK, Volaufova J, Most MM, Greenway FL, Smith SR, Deutsch WA, Williamson DA, Ravussin E; Pennington CALERIE Team (2006) Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. *JAMA* 295(13):1539-48.

Helenius M, Hanninen M, Lehtinen SK, Salminen A (1996) Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Biochem J* 318 (Pt 2):603-8.

Holl RW, Thorner MO, Leong DA. (1989) Cytosolic free calcium in normal somatotropes: effects of forskolin and phorbol ester. *Am J Physiol.* 256 (3 Pt 1):E375-9.

Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, Lee SC, Lee KB, Rhee SJ (2004) Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 340(1-2):107-15.

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.

Horikawa R, Hellmann P, Cella SG, Torsello A, Day RN, Muller EE, Thorner MO (1996) Growth hormone-releasing factor (GRF) regulates expression of its own receptor. *Endocrinology* 137:2642-2645.

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.

Hua H, Munk S, Goldberg H, Fantus IG, Whiteside CI (2003) High glucose-suppressed endothelin-1 Ca²⁺ signaling via NADPH oxidase and diacylglycerol-sensitive protein kinase C isozymes in mesangial cells. *Biol Chem* 278(36): 3951-62.

Iannone A, Rota C, Bergamini S, Tomasi A, Canfield LM (1998) Antioxidant activity of carotenoids: an electron-spin resonance study on beta-carotene and lutein interaction with free radicals generated in a chemical system. *J Biochem Mol Toxicol* 12(5):299-304.

Ikner A, Shiozaki K (2005) Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat Res* 6; 569(1-2):13-27.

Iqbal MJ, Yaegashi S, Ahsan R, Lightfoot DA, Banz WJ (2002) Differentially abundant mRNAs in rat liver in response to diets containing soy protein isolate. *Physiol Genomics* 11: 219-226.

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.

Jain SK, McVie R, Smith T (2000) Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. *Diabetes Care* 23(9): 1389-94.

James LR, Tang D, Ingram A, Ly H, Thai K, Cai L, Scholey JW (2002) Flux through the hexosamine pathway is a determinant of nuclear factor kappa B-dependent promoter activation. *Diabetes* 51(4):1146-56.

Janssen YM, Matalon S, Mossman BT (1997) Differential induction of c-fos, c-jun, and apoptosis in lung epithelial cells exposed to ROS or RNS. *Am J Physiol.* 273(4 Pt 1):L789-96.

Jelinek LJ, Lok S, Rosenberg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, Bensch PA, Kuijper JL, Sheppard PO, Sprecher CA (1993) Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* 259:1614-1616.

Jones PM, Burrin JM, Ghatei MA, O'Halloran DJ, Legon S, Bloom SR (1990) The influence of thyroid hormone status on the hypothalamo-hypophyseal growth hormone axis. *Endocrinology* 126:1374-1379.

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.

Kahkonen MP, Hopia AI, Heinonen M (2001) Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 49(8):4076-82.

Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Tatsuguchi A, Sugihara H, Oikawa S, Kineman RD (2004) The Role of Pituitary Ghrelin in Growth Hormone (GH) Secretion: GH-Releasing Hormone-Dependent Regulation of Pituitary Ghrelin Gene Expression and Peptide Content. *Endocrinology* 145: 3731-3738.

Kappeler L, Gourdji D, Zizzari P, Bluet-Pajot M-T, Epelbaum J (2003) Age-Associated Changes in Hypothalamic and Pituitary Neuroendocrine Gene Expression in the Rat. *J Neuroendocrinol* 15: 592-601.

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.

Kayo T, Allison DB, Weindruch R, Prolla TA (2001) Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5093-5098.

Kemnitz JW, Weindruch R, Roecker EB, Crawford K, Kaufman PL, Ershler WB (1993) Dietary restriction of adult male rhesus monkeys: design, methodology, and preliminary findings from the first year of study. *J Gerontol* 48: B17-26.

Kim E, Sohn S, Lee M, Jung J, Kineman RD, Park S (2006) Differential responses of the growth hormone axis in two rat models of streptozotocin-induced insulinopenic diabetes. *J Endocrinol* 188(2):263-70.

Kim R (2005) Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 333(2): 336-43.

Klotz LO, Sies H (2003) Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicol Lett* 140-141:125-32.

Koedam JA, Hoogerbrugge CM, van Buul-Offers SC (1998) Insulin-like growth factor-binding protein-3 protease activity in Snell normal and Pit-1 deficient dwarf mice. *J Endocrinol* 157(2):295-303.

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

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.

Koubova J, Guarente L (2003) How does calorie restriction work? *Genes Dev* 17: 313-321.

Kristal BS, Yu BP (1992) An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions. *J Gerontol* 47(4):B107-14.

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.

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.

Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Merry BJ (2004) Effect of ageing and caloric restriction on specific markers of protein oxidative damage and membrane peroxidizability in rat liver mitochondria. *Mech Ageing Dev* 125(8): 529-38.

Lane MA, Black A, Ingram DK, Roth GS (1998) Calorie restriction in non-human primates: implications for age-related disease risk. *J Anti-Aging Med* 1:315-326.

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.

Lee C-K, Allison DB, Brand J, Weindruch R, Prolla TA (2002) Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14988-14993.

Lee CK, Weindruch R, Prolla TA (2000) Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet* 25: 294-297.

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

Lefrancois L, Gaudreau P (1994) Identification of receptor-binding pharmacophores of growth-hormone-releasing factor in rat adenopituitary. *Neuroendocrinology* 59: 363-70.

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: 646-53.

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.

Leonie K Heilbronn and Eric Ravussin (2003) Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 78: 361-9.

Leopold JA, Walker J, Scribner AW, Voetsch B, Zhang YY, Loscalzo AJ, Stanton RC, Loscalzo J (2003) Glucose-6-phosphate dehydrogenase modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 278(34): 32100-6.

Lin C, Lin SC, Chang CP, Rosenfeld MG (1992) Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360: 765-768.

Liu K, Paterson AJ, Konrad RJ, Parlow AF, Jimi S, Roh M, Chin E Jr, Kudlow JE (2002) Streptozotocin, an O-GlcNAcase inhibitor, blunts insulin and growth hormone secretion. *Mol Cell Endocrinol* 194: 135-146.

Lo YY, Cruz TF (1995) Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem* 270(20): 11727-30.

Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JM, Ross C, Arnold A, Sleight P, Probstfield J, Dagenais GR; HOPE and HOPE-TOO Trial Investigators (2005) Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 293(11): 1338-47.

Lopez-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, Cascajo MV, Allard J, Ingram DK, Navas P, de Cabo R (2006) Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(6): 1768-73.

Lopez-Torres M, Gredilla R, Sanz A, Barja G (2002) Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 32(9): 882-9.

Lumpkin, M.D., McDonald, J.K (1989) Blockade of growth hormone-releasing factor (GRF) activity in the pituitary and hypothalamus of the conscious rat with a peptidic GRF 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.

Margioris AN, Brockmann G, Bohler HC, Jr., Grino M, Vamvakopoulos N, Chrousos GP (1990) Expression and localization of growth hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid in rat placenta: in vitro secretion and regulation of its peptide product. *Endocrinology* 126: 151-158.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd (2003) Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 17(1): 24-38.

Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424(1-2): 83-95.

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 *J. Endocrinology* 136: 4147-50.

Mayo KE, Cerelli GM, Lebo RV, Bruce BD, Rosenfeld MG, Evans RM (1985a) Gene encoding human growth hormone-releasing factor precursor: structure, sequence, and chromosomal assignment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 63-7.

Mayo KE, Cerelli GM, Rosenfeld MG, Evans RM (1985b) Characterization of cDNA and genomic clones encoding the precursor to rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature* 314(6010): 464-7.

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. *Recent Prog Horm Res* 50: 35-73.

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

McCay CM, Crowell MF, Maynard LA (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutr* 10: 63-79.

McCormick A, Brady H, Theill LE, Karin M (1990) Regulation of the pituitary-specific homeobox gene GHF1 by cell-autonomous and environmental cues. *Nature* 345(6278): 829-32.

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.

Merry BJ (2000) Calorie restriction and age-related oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 908: 180-98.

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 ER 3rd, Appel LJ, Risby TH (1998) Effect of dietary patterns on measures of lipid peroxidation: results from a randomized clinical trial. *Circulation* 98(22): 2390-5.

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.

Montilla P, Barcos M, Munoz MC, Bujalance I, Munoz-Castaneda JR, Tunez I (2005) Red wine prevents brain oxidative stress and nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Biol* 38(5):539-44.

Mooradian AD, Thurman JE (1999) Glucotoxicity: potential mechanisms. *Clin Geriatr Med* 15(2): 255.

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 KJ (1990) Receptor-mediated actions of growth hormone releasing factor on granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 127: 2117-26.

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.

Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Green CJ (2000) Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 28(8): 1303-12.

Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M (1990) Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 173(3): 932-9.

Murakami Y, Koshimura K, Yamauchi K, Nishiki M, Tanaka J, Kato Y (2001) Roles and mechanisms of action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in growth hormone and prolactin secretion. *Endocr J* 48(2): 123-32.

Murao K, Sato M, Mizobuchi M, Nimi 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(1): 418-23.

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.

Neghishi T, Chik CL, Ho AK (1999) Ceramide enhances growth hormone (GH)-releasing hormone-stimulated cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation but inhibits GH release in rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 140: 5691-5697.

Nelson JF, Karelus K, Bergman MD, Felicio LS (1995) Neuroendocrine involvement in aging: evidence from studies of reproductive aging and caloric restriction. *Neurobiol Aging* 16(5): 837-43; discussion 855-6.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404(6779): 787-90.

Nogami H, Hiraoka Y, Matsubara M, Nonobe E, Harigaya T, Katayama M, Hemmi N, Kobayashi S, Mogi K, Aiso S, Kawamura K, Hisano S (2002) A

composite hormone response element regulates transcription of the rat GHRH receptor gene. *Endocrinology* 143(4): 1318-26.

Nogami H, Matsubara M, Harigaka T, Yatayama 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.

Obal F Jr, Payne L, Opp M, Alfoldi P, Kapas L, Krueger JM (1992) Growth hormone-releasing hormone antibodies suppress sleep and prevent enhancement of sleep after sleep deprivation. *Am J Physiol* 263: R1078-85.

Obrosova IG (2005) Increased sorbitol pathway activity generates oxidative stress in tissue sites for diabetic complications. *Antioxid Redox Signal* 7(11-12): 1543-52.

Ohmura E, Friesen HG (1985) 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate stimulates rat growth hormone (GH) release through different pathways from that of human pancreatic GH-releasing factor. *Endocrinology* 116: 728-733.

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.

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.

Osawa T, Kato Y (2005) Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Ann N Y Acad Sci* 1043: 440-51.

Pap EH, Drummen GP, Winter VJ, Kooij TW, Op den Kamp JA, Hage WJ, Post JA (1999) Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY(581/591). *FEBS Lett* 453: 278-282.

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.

Parr T (1997) Insulin exposure and aging theory. *Gerontology* 43: 182-200.

Pastorcic M, Sarkar DK (1997) Downregulation of TGF-beta 1 gene expression in anterior pituitary cells treated with forskolin. *Cytokine* 9(2): 106-11.

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

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

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: E45.

Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L (2004) Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429(6993): 771-6.

Poitout V, Robertson RP (2002) Minireview: secondary beta-cell failure in type 2 diabetes - a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143: 339-342.

Pombo CM, Zalvide J, Gaylenn BD, Dieguez C (2000) Growth hormone-releasing hormone stimulates mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 141: 2113-2119. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9): 5093-8.

Poss KD, Tonegawa S (1997) Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10919-24.

Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M (2005) A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 59(7): 365-73.

Rao AV, Agarwal S (2000) Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J Am Coll Nutr* 19(5): 563-9.

Rao G, Xia E, Nadakavukaren MJ, Richardson A (1990) Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. *J Nutr* 120(6): 602-9.

Raza H, Robin MA, Fang JK, Avadhani NG (2002) Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J* 366(Pt 1): 45-55.

Reddi AS, Bollineni JS (2001) Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF-beta1 in normal and diabetic rats. *Kidney Int* 59(4): 1342-53.

Renier G, Serri O (1991) Effects of acute and prolonged glucose excess on growth hormone release by cultured rat anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 54(5): 521-5.

Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W (1982) Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature* 300: 276-8.

Robertson RP (2004) Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 279(41): 42351-4.

Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H (2003) Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52(3): 581-7.

Robertson RP, Harmon JS (2006) Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radic Biol Med* 41(2): 177-84.

Rock E, Astier C, Lab C, Vignon X, Gueux E, Motta C, Rayssiguier Y (1995) Dietary magnesium deficiency in rats enhances free radical production in skeletal muscle. *J Nutr* 125(5): 1205-10.

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.

Rolo AP, Palmeira CM (2006) Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 212(2): 167-78.

Rose P, Ong CN, Whiteman M (2005) Protective effects of Asian green vegetables against oxidant induced cytotoxicity. *World J Gastroenterol* 11(48): 7607-14.

Roth GS, Lane MA, Ingram DK, Roth GS, Lane MA, Ingram DK, Mattison JA, Elahi D, Tobin JD, Muller D, Metter EJ (2002) Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans. *Science* 297: 811.

Ruby AJ, Kuttan G, Babu KD, Rajasekharan KN, Kuttan R (1995) Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett* 94(1): 79-83.

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(27): 19294-300.

Sato M, Frohman LA (1993) Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats. *Endocrinology* 133: 793-799.

Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ (1993) Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochem Pharmacol* 45(3): 539-42.

Schoonbroodt S, Piette J (2000) Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochem Pharmacol* 60(8): 1075-83.

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.

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

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.

Seven A, Guzel S, Seymen O, Civelek S, Bolayirli M, Uncu M, Burcak G (2004) Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: investigation of liver and plasma. *Yonsei Med J* 45(4): 703-10.

Shaheen AA, el-Fattah AA (1995) Effect of dietary zinc on lipid peroxidation, glutathione, protein thiols levels and superoxide dismutase activity in rat tissues. *Int J Biochem Cell Biol* 27(1): 89-95.

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.

Shibasaki T, Masuda A, Hotta M, Yamauchi N, Hizuka N, Takano K, Demura H, Shizume K (1989) Effects of ingestion of glucose on GH and TSH secretion: evidence for stimulation of somatostatin release from the hypothalamus by acute hyperglycemia in normal man and its impairment in acromegalic patients. *Life Sci* 44(6): 431-8.

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(2): 263-8.

Shimokawa I, Yanagihara K, Higami Y, Okimoto T, Tomita M, Ikeda T, Lee S (2000) Effects of aging and dietary restriction on mRNA levels of receptors for growth hormone-releasing hormone and somatostatin in the rat pituitary. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55(6): B274-9.

Shukitt-Hale B, Carey A, Simon L, Mark DA, Joseph JA (2006) Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. *Nutrition* 22(3): 295-302.

Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273(5271): 59-63.

Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J (1980) Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology* 107(6): 1875-9.

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.

Spiess J, Rivier J, Vale W (1983) Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature* 303: 532-535.

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

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. *Neurosci Lett.* 276(2): 87-90.

Suhr ST, Rahal JO, Mayo KE (1989) Mouse growth-hormone-releasing hormone: precursor structure and expression in brain and placenta. *Mol Endocrinol* 3(11): 1693-700.

Suryanarayana P, Saraswat M, Mrudula T, Krishna TP, Krishnaswamy K, Reddy GB (2005) Curcumin and turmeric delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(6): 2092-9.

Takahashi T, Okimura Y, Yoshimura K, Shigeyoshi Y, Kaji H, Abe H, Chihara K (1995) Regional distribution of growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor mRNA in the rat brain. *Endocrinology* 136(10): 4721-4.

Takahashi Y, Kipnis DM, Daughaday WH (1968) Growth hormone secretion during sleep. *J Clin Invest* 47(9): 2079-90.

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.

Tanaka Y, Egawa M, Inoue S, Takamura Y (1991) Effect of hypothalamic administration of growth hormone-releasing factor (GRF) of feeding behavior in rats. *Brain Res* 558(2): 273-9.

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

Tannenbaum GS, Martin JB (1976) Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 98(3): 562-70.

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: 1872-1879.

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.

Tannenbaum GS, Gurd W, Lapointe M (1998) Leptin Is a Potent Stimulator of Spontaneous Pulsatile Growth Hormone (GH) Secretion and the GH Response to GH-Releasing Hormone. *Endocrinology* 139: 3871-3875.

Tatar M, Bartke A, Antebi A (2003) The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299: 1346-1351.

Tchantchou F, Graves M, Ortiz D, Rogers E, Shea TB (2004) Dietary supplementation with apple juice concentrate alleviates the compensatory increase in glutathione synthase transcription and activity that accompanies dietary- and genetically-induced oxidative stress. *J Nutr Health Aging* 8(6): 492-6.

Thériault K, Pomerleau L, Gaudreau P (2005) Étude de dimérisation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance. Abstract: 6ème Congrès annuel des stagiaires de recherche en santé de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, January 22.

Thorner MO, Perryman RL, Cronin MJ, Rogol AD, Draznin M, Johanson A, Vale W, Horvath E, Kovacs K (1982) Somatotroph hyperplasia. Successful treatment of acromegaly by removal of a pancreatic islet tumor secreting a growth hormone-releasing factor. *J Clin Invest* 70: 965-977.

Tollet-Egnell P, Parini P, Stahlberg N, Lonnstedt I, Lee NH, Rudling M, Flores-Morales A, Norstedt G (2004) Growth hormone-mediated alteration of fuel metabolism in the aged rat as determined from transcript profiles. *Physiol Genomics* 16: 261-267.

Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2003) Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 144(4): 1506-12.

Uchida K, Sakai K, Itakura K, Osawa T and Toyokuni S (1997) Protein Modification by Lipid Peroxidation Products: Formation of Malondialdehyde-Derived N[epsilon]-(2-Propenal)lysine in Proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 346(1): 45-52.

Unger RH (2003) The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol* 65: 333-347.

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 der Vliet A, Bast A (1992) Effect of oxidative stress on receptors and signal transmission. *Chem Biol Interact* 85(2-3): 95-116.

Van Remmen, H., Ward, W., Sabia, R.V., Richardson, A (1995) Metabolic and molecular aspects of aging. In: Masoro, E.J. (Ed.), *Handbook of Physiology*. American physiological Society, San Antonio, Texas.

Vega-Lopez S, Yeum KJ, Lecker JL, Ausman LM, Johnson EJ, Devaraj S, Jialal I, Lichtenstein AH (2005) Plasma antioxidant capacity in response to diets high in soy or animal protein with or without isoflavones. *Am J Clin Nutr* 81(1): 43-9.

Veldhuis JD, Bowers CY (2003) Human GH pulsatility: an ensemble property regulated by age and gender. *J Endocrinol Invest* 26(9): 799-813.

Vessby J, Basu S, Mohsen R, Berne C, Vessby B (2002) Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. *J Intern Med* 251(1): 69-76.

Veyrat-Durebex C, Gaudreau P, Boghossian S, Alliot J (2001) Effects of peripheral and central administration of GHRH on feeding in aging LOU rats. *Peptides* 22: 2119-26.

Veyrat-Durebex C, Pomerleau L, Langlois D, Gaudreau P (2005) Internalization and trafficking of the human and rat growth hormone-releasing hormone receptor. *J Cell Physiol* 203: 335-344.

Vincent AM, McLean LL, Backus C, Feldman EL (2005) Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons. *FASEB J* 19(6): 638-40.

Wajnrach 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.

Walford RL, Spindler SR (1997) The response to calorie restriction in mammals shows features also common to hibernation: a cross-adaptation hypothesis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 52(4): B179-83.

Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, Capron L, Chappey O, Yan SD, Brett J, et al (1994) Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(16): 7742-6.

Weidig P, McMaster D, Bayraktutan U (2004) High glucose mediates pro-oxidant and antioxidant enzyme activities in coronary endothelial cells. *Diabetes Obes Metab* 6(6): 432-41.

Weindruch R, Kayo T, Lee CK, Prolla TA (2002) Gene expression profiling of aging using DNA microarrays. *Mech Ageing Dev* 123: 177-193.

Weindruch R, Kayo T, Lee CK, Prolla TA (2001) Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. *J Nutr* 131(3): 918S-923S.

Welle S, Brooks A, Thornton CA (2001) Senescence-related changes in gene expression in muscle: similarities and differences between mice and men. *Physiol Genomics* 5: 67-73.

Whiteside, JA Dlugosz (2002) Mesangial cell protein kinase C isozyme activation in the diabetic milieu *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F975-F980.

Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV (1991) Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 10:339-352.

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.

Xia P, Kramer RM, King GL (1995) Identification of the mechanism for the inhibition of Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. *J Clin Invest* 96(2): 733-40.

Xin MG, Zhang J, Block ER, Patel JM (2003) Senescence-enhanced oxidative stress is associated with deficiency of mitochondrial cytochrome c oxidase in vascular endothelial cells. *Mech Ageing Dev* 124(8-9): 911-9.

Xu X, Sonntag WE (1996) Moderate caloric restriction prevents the age-related decline in growth hormone receptor signal transduction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 51(2): B167-74.

Yamashita S, Melmed S (1986) Insulin-like growth factor I action on rat anterior pituitary cells: suppression of growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 118(1): 176-82.

Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269(13): 9889-97.

Yeum KJ, Aldini G, Chung HY, Krinsky NI, Russell RM (2003) The activities of antioxidant nutrients in human plasma depend on the localization of attacking radical species. *J Nutr* 133(8): 2688-91.

Yokozawa T, Nakagawa T, Kitani K (2002) Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem* 50(12): 3549-52.

Yudoh K, Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K (2005) Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* 7(2): R380-91.

Zeitler P, Siriwardana G (2000) Stimulation of mitogen-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.

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

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.

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

**Autorisations des co-auteurs à l'utilisation des articles
dans le mémoire de maîtrise**

Titre de l'article : Regulation of the growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocin-diabetic rats: *in vitro* evidence for a direct effect of glucotoxicity

Auteurs: Julie Strecko*, Karine Bédard*, Karyne Thériault, Chantale Boisvert, Christelle Veyrat-Durebex, Sabrina Hoa et Pierrette Gaudreau

Participation : La totalité des expériences portant sur les effets de la glucotoxicité sur les cellules hypophysaires, de même que l'analyse des résultats ont été effectuées par Karine Bédard. La mise au point des conditions optimales de culture cellulaire ainsi que de plusieurs techniques utilisées dans cette étude (mesure de peroxydation des lipides, quantification de la production d'AMPc, évaluation de la consommation cellulaire de glucose, détermination des niveaux d'apoptose et de nécrose) ont été réalisés par Karine Bédard. L'induction du diabète, le suivi des colonies de rats diabétiques, ainsi que la quantification et caractérisation du récepteur hypophysaire et rénal du GHRH ont été réalisées par Julie Strecko. Sabrina Hoa, stagiaire d'été de niveau collégial, a collaboré à l'étude de la deuxième colonie de rats diabétiques. Chantale Boisvert, étudiante au doctorat en biochimie, a participé à l'étude de quantification des niveaux d'ARNm du récepteur rénal par protection à la RNase. Karyne Thériault, étudiante à la maîtrise en biologie moléculaire, a réalisé l'étude de déglycosylation et de dimérisation du récepteur du GHRH. Les études d'internalisation du GHRH-R ont été faites par Christelle Veyrat-Durebex, stagiaire post-doctorale, et Karyne Thériault avec la collaboration de Karine Bédard. Karine Bédard, Julie Strecko et Christelle Veyrat-Durebex ont participé à la rédaction du manuscrit. Pierrette Gaudreau a supervisé les étapes de réalisation de l'étude et a complété la rédaction de l'article.

Julie Strecko

Karyne Thériault

Chantale Boisvert

Christelle Veyrat-Durebex

Sabrina Hoa

Pierrette Gaudreau

ACCORD DES COAUTEURS

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Karine Bédard
M.Sc. Sciences Biomédicales

2. Description de l'article

Strecko J*, Bédard K*, Theriault K, Boisvert C, Veyrat-Durebex C, Hoa S, Gaudreau P.
Regulation the growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocin-diabetic rats:
in vitro evidence for a direct effect of glucotoxicity, *: equal contribution as first author.

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

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que
Karine Bédard inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour
titre "Glucotoxicité cellulaire comme modèle de vieillissement du récepteur
du facteur de libération de l'hormone de croissance"

Julie Strecko

Karvne Thériault

Chantale Boisvert

Christelle Veyrat-Durebex

Sabrina Hoa

Pierrette Gaudreau

Titre de l'article : Regulation of the growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocin-diabetic rats: *in vitro* evidence for a direct effect of glucotoxicity

Auteurs: Julie Strecko*, Karine Bédard*, Karyne Thériault, Chantale Boisvert, Christelle Veyrat-Durebex, Sabrina Hoa et Pierrette Gaudreau

Participation : La totalité des expériences portant sur les effets de la glucotoxicité sur les cellules hypophysaires, de même que l'analyse des résultats ont été effectuées par Karine Bédard. La mise au point des conditions optimales de culture cellulaire ainsi que de plusieurs techniques utilisées dans cette étude (mesure de peroxydation des lipides, quantification de la production d'AMPc, évaluation de la consommation cellulaire de glucose, détermination des niveaux d'apoptose et de nécrose) ont été réalisés par Karine Bédard. L'induction du diabète, le suivi des colonies de rats diabétiques, ainsi que la quantification et caractérisation du récepteur hypophysaire et rénal du GHRH ont été réalisées par Julie Strecko. Sabrina Hoa, stagiaire d'été de niveau collégial, a collaboré à l'étude de la deuxième colonie de rats diabétiques. Chantale Boisvert, étudiante au doctorat en biochimie, a participé à l'étude de quantification des niveaux d'ARNm du récepteur rénal par protection à la RNase. Karyne Thériault, étudiante à la maîtrise en biologie moléculaire, a réalisé l'étude de déglycosylation et de dimérisation du récepteur du GHRH. Les études d'internalisation du GHRH-R ont été faites par Christelle Veyrat-Durebex, stagiaire post-doctorale, et Karyne Thériault avec la collaboration de Karine Bédard. Karine Bédard, Julie Strecko et Christelle Veyrat-Durebex ont participé à la rédaction du manuscrit. Pierrette Gaudreau a supervisé les étapes de réalisation de l'étude et a complété la rédaction de l'article.

Julie Strecko

Karyne Thériault

Chantale Boisvert

Christelle Veyrat-Durebex *Genève le 25.08.06*

Sabrina Hoa

Pierrette Gaudreau

ACCORD DES COAUTEURS

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Karine Bédard
M.Sc. Sciences Biomédicales

2. Description de l'article

Strecko J*, Bédard K*, Theriault K, Boisvert C, Veyrat-Durebex C, Hoa S, Gaudreau P.
Regulation the growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocin-diabetic rats:
in vitro evidence for a direct effect of glucotoxicity, *: equal contribution as first author.

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

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que
Karine Bédard inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour
titre "Glucotoxicité cellulaire comme modèle de vieillissement du récepteur
du facteur de libération de l'hormone de croissance"

Julie Strecko

Karyne Thériault

Chantale Boisvert

Christelle Veyrat-Durebex

Geneve le 25-08-06

Sabrina Hoa

Pierrette Gaudreau

Titre de l'article: **Effects of age and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus.**

Auteurs: Julie Bédard, **Karine Bédard**, Guylaine Ferland, Tamas Fulop, Danielle Jacques, Abdelouahed Khalil, Christelle Veyrat-Durebex, Richard Wagner et Pierrette Gaudreau.

Participation: La colonie de rats âgés ayant servi à cette étude faisait partie de l'infrastructure *Colonies de rats âgés* du Réseau Québécois de Recherche sur le Vieillissement (RQRV), dont Guylaine Ferland et Pierrette Gaudreau sont responsables. De plus, l'axe de recherche *Nutrition et vieillissement réussi* du RQRV a soutenu financièrement une partie de cette étude puisque plusieurs membres de cet axe, soit G Ferland, T Fulop, D Jacques, A Khalil, C Veyrat-Durebex, R Wagner et P Gaudreau, sont impliqués dans des projets de recherche à l'aide de ce modèle animal de vieillissement réussi, dans le but de mieux comprendre les processus biologiques qui régissent le vieillissement chez l'homme. Le prélèvement des tissus utilisés dans cette étude a été effectué par C Veyrat-Durebex. Les extractions d'ARN ont été réalisées par J Bédard. La stratégie expérimentale utilisée a été élaborée par J Bédard, K Bédard et P Gaudreau, en collaboration avec le personnel scientifique de Génome Québec. L'analyse préliminaire des résultats a été effectuée par J Bédard et K Bédard. L'analyse des résultats et la classification des gènes reliés au stress oxydatif ont été faite par K Bédard. La classification finale des gènes a été effectuée par J Bédard. L'ensemble de l'étude a été supervisé par P Gaudreau. Le manuscrit a été rédigé par K Bédard, J Bédard et P Gaudreau, en collaboration avec les autres co-auteurs.

Julie Bédard

Guylaine Ferland

Tamas Fulop

Danielle Jacques

Abdelouahed Khalil

Christelle Veyrat-Durebex

Richard Wagner

Pierrette Gaudreau

ACCORD DES CO-AUTEURS

A) Déclaration des co-auteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Karine Bédard
M.Sc. Sciences Blomédicales

2. Description de l'article

Bédard J*, **Bédard K***, Ferland G, Fulop T, Jacques D, Khalil A, Veyrat-Durebex C, Wagner R, Gaudreau P. Effects of age and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus. Neurobiol Aging, *: contribution égale à titre de premier auteur.

3. Déclaration de tous les co-auteurs autres que l'étudiant

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise **Karine Bédard** à inclure cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre "Glucotoxicité cellulaire comme modèle de vieillissement du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance"

Julie Bédard

Tamas Fulop

Danielle Jacques

Abdelouahed Khalil

Christelle Veyrat-Durebex

Richard Wagner

Pierrette Gaudreau

Titre de l'article: Effects of age and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus.

Auteurs: Julie Bédard, Karine Bédard, Guylaine Ferland, Tamas Fulop, Danielle Jacques, Abdelouahed Khalil, Christelle Veyrat-Durebex, Richard Wagner et Pierrette Gaudreau.

Participation: La colonie de rats âgés ayant servi à cette étude faisait partie de l'infrastructure *Colonies de rats âgés* du Réseau Québécois de Recherche sur le Vieillessement (RQRV), dont Guylaine Ferland et Pierrette Gaudreau sont responsables. De plus, l'axe de recherche *Nutrition et vieillissement réussi* du RQRV a soutenu financièrement une partie de cette étude puisque plusieurs membres de cet axe, soit G Ferland, T Fulop, D Jacques, A Khalil, C Veyrat-Durebex, R Wagner et P Gaudreau, sont impliqués dans des projets de recherche à l'aide de ce modèle animal de vieillissement réussi, dans le but de mieux comprendre les processus biologiques qui régissent le vieillissement chez l'homme. Le prélèvement des tissus utilisés dans cette étude a été effectué par C Veyrat-Durebex. Les extractions d'ARN ont été réalisées par J Bédard. La stratégie expérimentale utilisée a été élaborée par J Bédard, K Bédard et P Gaudreau, en collaboration avec le personnel scientifique de Génome Québec. L'analyse préliminaire des résultats a été effectuée par J Bédard et K Bédard. L'analyse des résultats et la classification des gènes reliés au stress oxydatif ont été faite par K Bédard. La classification finale des gènes a été effectuée par J Bédard. L'ensemble de l'étude a été supervisé par P Gaudreau. Le manuscrit a été rédigé par K Bédard, J Bédard et P Gaudreau, en collaboration avec les autres co-auteurs.

Julie Bédard

Guylaine Ferland

Tamas Fulop

Danielle Jacques

Abdelouahed Khalil

Christelle Veyrat-Durebex

Richard Wagner

Pierrette Gaudreau

ACCORD DES CO-AUTEURS

A) Déclaration des co-auteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Karine Bédard
M.Sc. Sciences Biomédicales

2. Description de l'article

Bédard J*, **Bédard K***, Ferland G, Fulop T, Jacques D, Khalil A, Veyrat-Durebex C, Wagner R, Gaudreau P. Effects of age and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus. *Neurobiol Aging*, *: contribution égale à titre de premier auteur.

3. Déclaration de tous les co-auteurs autres que l'étudiant

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise **Karine Bédard** à inclure cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre "Glucotoxicité cellulaire comme modèle de vieillissement du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance"

Julie Bédard

Guyline Ferland

Tamas Fulop

Danielle Jacques

Abdelouahed Khalil

Christelle Veyrat-Durebex

Richard Wagner

Pierrette Gaudreau

Titre de l'article: Effects of age and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus.

Auteurs: Julie Bédard, Karline Bédard, Guylaine Ferland, Tamas Fulop, Danielle Jacques, Abdelouahed Khalil, Christelle Veyrat-Durebex, Richard Wagner et Pierrette Gaudreau.

Participation: La colonie de rats âgés ayant servi à cette étude faisait partie de l'infrastructure *Colonies de rats âgés* du Réseau Québécois de Recherche sur le Vieillessement (RQRV), dont Guylaine Ferland et Pierrette Gaudreau sont responsables. De plus, l'axe de recherche *Nutrition et vieillissement réussi* du RQRV a soutenu financièrement une partie de cette étude puisque plusieurs membres de cet axe, soit G Ferland, T Fulop, D Jacques, A Khalil, C Veyrat-Durebex, R Wagner et P Gaudreau, sont impliqués dans des projets de recherche à l'aide de ce modèle animal de vieillissement réussi, dans le but de mieux comprendre les processus biologiques qui régissent le vieillissement chez l'homme. Le prélèvement des tissus utilisés dans cette étude a été effectué par C Veyrat-Durebex. Les extractions d'ARN ont été réalisées par J Bédard. La stratégie expérimentale utilisée a été élaborée par J Bédard, K Bédard et P Gaudreau, en collaboration avec le personnel scientifique de Génome Québec. L'analyse préliminaire des résultats a été effectuée par J Bédard et K Bédard. L'analyse des résultats et la classification des gènes reliés au stress oxydatif ont été faite par K Bédard. La classification finale des gènes a été effectuée par J Bédard. L'ensemble de l'étude a été supervisé par P Gaudreau. Le manuscrit a été rédigé par K Bédard, J Bédard et P Gaudreau, en collaboration avec les autres co-auteurs.

Julie Bédard

Guylaine Ferland

Tamas Fulop

Danielle Jacques

Abdelouahed Khalil

Christelle Veyrat-Durebex

ACCORD DES CO-AUTEURS

A) Déclaration des co-auteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Karine Bédard
M.Sc. Sciences Biomédicales

2. Description de l'article

Bédard J*, **Bédard K***, Ferland G, Fulop T, Jacques D, Khalil A, Veyrat-Durebex C, Wagner R, Gaudreau P. Effects of age and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus. *Neurobiol Aging*, *: contribution égale à titre de premier auteur.

3. Déclaration de tous les co-auteurs autres que l'étudiant

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise **Karine Bédard** à inclure cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre "Glucotoxicité cellulaire comme modèle de vieillissement du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance"

Julie Bédard

Guylaine Ferland

Tamas Fulop

Danielle Jacques

Abdelouahed Khalil

Christelle Veyrat-Durebex

Richard Wagner

Titre de l'article: Effects of age and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus.

Auteurs: Julie Bédard, Karine Bédard, Guylaine Ferland, Tamas Fulop, Danielle Jacques, Abdelouahed Khalil, Christelle Veyrat-Durebex, Richard Wagner et Pierrette Gaudreau.

Participation: La colonie de rats âgés ayant servi à cette étude faisait partie de l'infrastructure *Colonies de rats âgés* du Réseau Québécois de Recherche sur le Vieillessement (RQRV), dont Guylaine Ferland et Pierrette Gaudreau sont responsables. De plus, l'axe de recherche *Nutrition et vieillissement réussi* du RQRV a soutenu financièrement une partie de cette étude puisque plusieurs membres de cet axe, soit G Ferland, T Fulop, D Jacques, A Khalil, C Veyrat-Durebex, R Wagner et P Gaudreau, sont impliqués dans des projets de recherche à l'aide de ce modèle animal de vieillissement réussi, dans le but de mieux comprendre les processus biologiques qui régissent le vieillissement chez l'homme. Le prélèvement des tissus utilisés dans cette étude a été effectué par C Veyrat-Durebex. Les extractions d'ARN ont été réalisées par J Bédard. La stratégie expérimentale utilisée a été élaborée par J Bédard, K Bédard et P Gaudreau, en collaboration avec le personnel scientifique de Génome Québec. L'analyse préliminaire des résultats a été effectuée par J Bédard et K Bédard. L'analyse des résultats et la classification des gènes reliés au stress oxydatif ont été faite par K Bédard. La classification finale des gènes a été effectuée par J Bédard. L'ensemble de l'étude a été supervisé par P Gaudreau. Le manuscrit a été rédigé par K Bédard, J Bédard et P Gaudreau, en collaboration avec les autres co-auteurs.

Julie Bédard

Guylaine Ferland

Tamas Fulop

Danielle Jacques

Abdelouahed Khalil

Christelle Veyrat-Durebex

Geneve le 17.08.06.

Richard Wagner

Pierrette Gaudreau

ACCORD DES CO-AUTEURS

A) Déclaration des co-auteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Karine Bédard
M.Sc. Sciences Biomédicales

2. Description de l'article

Bédard J*, Bédard K*, Ferland G, Fulop T, Jacques D, Khalil A, Veyrat-Durebex C, Wagner R, Gaudreau P. Effects of age and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus. Neurobiol Aging, *: contribution égale à titre de premier auteur.

3. Déclaration de tous les co-auteurs autres que l'étudiant

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise **Karine Bédard** à inclure cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre "Glucotoxicité cellulaire comme modèle de vieillissement du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance"

Julie Bédard

Guylaine Ferland

Tamas Fulop

Danielle Jacques

Abdelouahed Khalil

Christelle Veyrat-Durebex

Signé le 17-08-06

Richard Wagner

Pierrette Gaudreau

Titre de l'article: **Effects of age and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus.**

Auteurs: Julie Bédard, Karine Bédard, Guylaine Ferland, Tamas Fulop, Danielle Jacques, Abdelouahed Khalil, Christelle Veyrat-Durebex, Richard Wagner et Pierrette Gaudreau.

Participation: La colonie de rats âgés ayant servi à cette étude faisait partie de l'infrastructure *Colonies de rats âgés* du Réseau Québécois de Recherche sur le Vieillessement (RQRV), dont Guylaine Ferland et Pierrette Gaudreau sont responsables. De plus, l'axe de recherche *Nutrition et vieillissement réussi* du RQRV a soutenu financièrement une partie de cette étude puisque plusieurs membres de cet axe, soit G Ferland, T Fulop, D Jacques, A Khalil, C Veyrat-Durebex, R Wagner et P Gaudreau, sont impliqués dans des projets de recherche à l'aide de ce modèle animal de vieillissement réussi, dans le but de mieux comprendre les processus biologiques qui régissent le vieillissement chez l'homme. Le prélèvement des tissus utilisés dans cette étude a été effectué par C Veyrat-Durebex. Les extractions d'ARN ont été réalisées par J Bédard. La stratégie expérimentale utilisée a été élaborée par J Bédard, K Bédard et P Gaudreau, en collaboration avec le personnel scientifique de Génome Québec. L'analyse préliminaire des résultats a été effectuée par J Bédard et K Bédard. L'analyse des résultats et la classification des gènes liés au stress oxydatif ont été faite par K Bédard. La classification finale des gènes a été effectuée par J Bédard. L'ensemble de l'étude a été supervisé par P Gaudreau. Le manuscrit a été rédigé par K Bédard, J Bédard et P Gaudreau, en collaboration avec les autres co-auteurs.

Julie Bédard

Guylaine Ferland

Tamas Fulop

Danielle Jacques

Abdelouahed Khalil

Christelle Veyrat-Durebex

J. Richard Wagner

Pierrette Gaudreau

ACCORD DES CO-AUTEURS

A) Déclaration des co-auteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Karine Bédard
M.Sc. Sciences Biomédicales

2. Description de l'article

Bédard J*, Bédard K*, Ferland G, Fulop T, Jacques D, Khalil A, Veyrat-Durebex C, Wagner R, Gaudreau P. Effects of age and diets on the regulation of gene expression in rat anterior pituitary and hypothalamus. Neurobiol Aging, *: contribution égale à titre de premier auteur.

3. Déclaration de tous les co-auteurs autres que l'étudiant

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise **Karine Bédard** à inclure cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre "Glucotoxicité cellulaire comme modèle de vieillissement du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance"

Julie Bédard

Guyline Ferland

Tamas Fulop

Danielle Jacques

Abdelouahed Khalil

Christelle Veyrat-Durebex

J. Richard Wagner

Pierrette Gaudreau