

Université de Montréal

Étude du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance
dans l'anse de Henlé mince

par
Sophie Dubuisson

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



Décembre 2004

© Sophie Dubuisson, 2004

W
H
U58
2005
V.191



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 :

Étude du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance
dans l'anse de Henlé mince

Présenté par:
Sophie Dubuisson

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

D^r Lucie Parent : Présidente rapporteuse
D^r Pierrette Gaudreau : Directrice de recherche
D^r Alain Fournier : Membre du jury

Mémoire accepté le:

I. RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS FRANÇAIS

Le récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH-R), principalement exprimé dans les somatotopes, a été mis en évidence dans plusieurs tissus extrahypophysaires. La médulla rénale est le seul tissu dans lequel l'ARNm du GHRH-R est détectable sans amplification par PCR. Des études d'immunomarquage ont révélé une co-localisation du GHRH-R avec le canal chlore CIC-K1, lequel est exclusivement localisé dans les cellules de l'anse de Henlé ascendante mince (AHam). La présente étude a donc été entreprise dans des cellules d'AH mince (AHm) purifiées, afin d'étudier la régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R suite à une stimulation au GHRH, de déterminer l'implication des voies de signalisation AC/PKA et MAPK dans ce processus, et d'identifier, par biopuces, les gènes régulés suite à une stimulation au GHRH. Cette étude a nécessité la mise au point d'une culture cellulaire d'AHm purifiées et d'un RT-PCR multiplex, afin de quantifier les niveaux d'ARNm du GHRH-R rénal, suite à différentes interventions.

Les résultats obtenus mettent en évidence la présence d'un GHRH-R fonctionnel dans les cellules de l'AHm purifiées, puisqu'une exposition de 4 h en présence de 10 nM de rGHRH(1-29)NH₂ provoque une diminution de 1.5 fois des niveaux d'ARNm du GHRH-R ($P < 0.05$). Par contre, suite à une stimulation au GHRH, le blocage de la voie AC ou MAPK prévient la diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R attendue, indiquant que l'action du GHRH implique ces voies de signalisation. Une étude de régulation génique sur biopuces a été effectuée, suite à une exposition unique au rGHRH(1-29)NH₂, suivie de 4 ou 16 h de culture, ou répétée, (à la mise en culture et à chaque 24 h), pendant 64 h de culture, afin de mieux comprendre le rôle du système GHRH / GHRH-R dans l'AHam. Un ensemble de 121 gènes ont été exprimés de façon différentielle. Ils ont été regroupés en familles selon leur fonction, tel que rapporté dans la littérature. Les principales familles reliées à la fonction rénale sont celles des facteurs de transcriptions, voies de signalisation, adhésion cellulaire, axe somatotrophe, division et prolifération cellulaire, différenciation cellulaire, canaux ioniques et transporteurs et récepteurs

couplés aux protéines G. Ces résultats suggèrent un rôle du GHRH-R rénal dans la différenciation cellulaire au cours du développement et suite à une agression cellulaire, la prolifération cellulaire, le transport d'électrolytes et la concentration de l'urine possiblement *via* la régulation du récepteur V2 de la vasopressine et du canal CIC-K1.

Mots clés : GHRH-R, GHRH, anse de Henlé, adénylyl cyclase, MAPK, prolifération cellulaire, différenciation cellulaire, transport ionique, CIC-K1, régulation génique.

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS ANGLAIS

The growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R), mainly localized in somatotroph cells, was found in several extrapituitary tissues. The renal medulla represents the only tissue containing a sufficient concentration of GHRH-R mRNA to allow its detection without PCR amplification. Immunocytochemistry studies revealed a co-localization of GHRH-R with the chloride channel CIC-K1, which is exclusively localised in the ascending thin limb of Henle's loop (HI). The present study was therefore undertaken in purified thin HI cells to study the effect of a stimulation by GHRH on the regulation of GHRH-R mRNA levels, to assess the implication of AC/PKA and MAPK pathways in this process and to identify, by gene array, the genes regulated following a stimulation to GHRH. This study needed the development of a primary culture of purified thin HI cells and a multiplex RT-PCR, to quantify GHRH-R mRNA levels following different treatments.

The results support the presence of a functional GHRH-R in purified thin HI cells, since a 4-h stimulation with 10 nM rGHRH(1-29)NH₂ induced a 1.5 times decrease of GHRH-R mRNA levels ($P < 0.05$). However, following a GHRH stimulation, the blockade of the AC or MAPK pathways prevented the expected decrease of GHRH-R mRNA levels, implying that GHRH is acting through these signaling pathways. A gene array study was performed, following a single stimulation with rGHRH(1-29)NH₂, followed by a 4- or 16-h culture period, or repeated stimulation (at plating and every 24 h), followed by a 64-h culture period, to better understand the role of the GHRH/GHRH-R system in the ascending thin limb of HI. A set of 121 genes were differentially expressed. They were clustered in families according to their function, as reported in literature. The main families related to kidney functions were those of transcription factors, signaling pathways, cell adhesion, somatotroph axis, cell division and proliferation, cell differentiation, ion channels and transporters and G protein-coupled receptors. These results suggest that the renal GHRH-R could play a role in cell differentiation during development and following cell injury, in cell proliferation, in electrolyte transport and in the capacity to concentrate urine,

possibly by regulating the vasopressin V2 receptor and ClC-K1 channel.

Key words : GHRH-R, GHRH, Henle's loop, adenylyl cyclase, MAPK, cellular proliferation, cellular differentiation, ion transport, ClC-K1, gene regulation.

III. TABLE DES MATIÈRES

I. Résumé et mots clés français.....	i
II. Résumé et mots clés anglais.....	iii
III. Table des matières.....	v
IV. Liste des figures.....	vii
V. Liste des tableaux.....	ix
VI. Liste des abréviations.....	x
VII. Dédicace.....	xiii
VIII. Remerciements.....	xiv
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Hormone de croissance.....	2
1.1.1 Caractéristiques et rôles de l'hormone de croissance.....	2
1.1.2 Régulation de l'hormone de croissance.....	3
1.2 Le facteur de libération de l'hormone de croissance.....	5
1.2.1 Structure du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	5
1.2.2 Rôles du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	6
1.3 Le récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	8
1.3.1 Structure du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	8
1.3.2 Isoformes du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	9
1.3.3 Structure du gène du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	13
1.3.4 Localisation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	14
1.3.5 Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	14
1.3.5.1 Récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	14

1.3.5.2 Récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	16
1.3.6 Voies de signalisation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	16
1.3.7 Régulation du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	19
1.3.8 Rôles du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	22
1.4 Le rein comme tissu cible du GHRH.....	23
1.4.1 Structure et fonction rénale.....	23
1.4.2 Mécanisme de concentration de l'urine.....	25
1.4.3 L'axe GH-IGF-I rénal.....	28
1.4.4 Caractéristiques et rôle de l'anse de Henlé ascendante mince.....	28
1.4.5 Canal chlorure CIC-K1.....	31
1.5 Justification de l'étude et objectifs.....	32
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	35
3. RÉSULTATS.....	47
4. DISCUSSION.....	90
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	110
6. BIBLIOGRAPHIE.....	113

IV. LISTE DES FIGURES

Figure 1	Régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance dans la cellule somatotrope.....	4
Figure 2	Représentation schématique du récepteur de rat du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	10
Figure 3	Voies de signalisations impliquées dans la réponse au GHRH dans l'hypophyse antérieure.....	18
Figure 4	Représentation schématique du néphron et des caractéristiques structurales de ses différentes populations cellulaires	24
Figure 5	Mécanisme de concentration de l'urine dans le néphron.....	26
Figure 6	Localisation des composantes du système GH/IGF-I dans le rein de rat.....	27
Figure 7	Transformation des cellules de l'anse de Henlé ascendante au cours du développement.....	30
Figure 8	Représentation schématique du GHRH-R et de l'ADNc du rps-1 de rat.....	43
Figure 9	Caractérisation des cellules de l'AHm purifiées en culture à l'aide de l'Ac anti-BSL-1, du marqueur DBA-FITC, de l'Ac anti-aquaporine-1, de l'Ac anti-CIC-K1 et de l'Ac anti-GHRH-R.....	50

- Figure 10 Représentation autoradiographique d'un RT-PCR montrant le fragment amplifié d'ARN du GHRH-R dans les cellules d'AH mince suite à des périodes de culture de 4, 20 et 64 h, en fonction du nombre de cycles d'amplification.....53
- Figure 11 Relation de linéarité des signaux obtenus suite à l'amplification des fragments d'ARNm du GHRH-R et de GAPDH en fonction de la quantité d'ARN total utilisée.....54
- Figure 12 Régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R dans les cellules d'AHm purifiées suite à une exposition de 4 h en présence de 10 nM de rGHRH(1-29)NH₂, et implication des voies AC et MAPK dans ce processus.....56
- Figure 13 Représentation graphique de l'analyse des composants principaux (PCA) illustrant le profil de variation d'expression des gènes de toutes les biopuces.....61
- Figure 14 Représentation schématique de la séquence partielle du gène du GHRH-R hypophysaire de rat.....97
- Figure 15 Représentation schématique de certains mécanismes d'action potentiels du système GHRH/GHRH-R dans la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et le transport du Cl⁻ dans les cellules de l'AH ascendante mince..... 109

V. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Caractérisation immunocytochimique des cellules d'AHm purifiées en fonction de la période de culture.....	51
Tableau 2	Régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R dans les cellules d'AHm purifiées suite à une exposition de 4 h en présence de 10 nM de rGHRH(1-29)NH ₂ et en présence ou absence de 2', 5'-dideoxyadenosine ou de U-0126.....	57
Tableau 3	Effets spécifiques d'une exposition unique ou répétée au rGHRH(1-29)NH ₂ sur la régulation de l'expression génique dans les cellules d'AH mince en culture	62

VI. LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	Acide aminé
AC	Adénylyl cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AH	Anse de Henlé
AHm	Anse de Henlé mince
AHam	Anse de Henlé ascendante mince
AMPc	Adénosine 3'-5'-cyclique monophosphate
Arhgap4	Protéine activatrice 4 de la Rho GTPase
ARN	Acide ribonucléique
ARNc	Acide ribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Avpr2	Récepteur 2 de l'arginine vasopressine
BHK	lignée de cellules rénales de bébé hamster
BSA	albumine sérique bovine
BSL-1	<i>Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia 1 lectin</i>
Ca ²⁺	Ion calcium
Cdh6	Cadhérine 6
Cdc25a	Cycle de division cellulaire 25A
Cdk1	Kinase dépendante des cyclines 1
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
Cl ⁻	Ion chlorure
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
DAG	diacylglycérol
DBA	<i>Dolichos biflorus agglutinin</i>
DMEM	<i>Dulbecco modified Eagle's medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde

EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
eEF2k	<i>Eukaryotic elongation factor-2 kinase</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Egr2	<i>Early growth response 2</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FBS	Sérum bovin foetal
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
G _i	Protéine G de type inhibitrice de l'adénylyl cyclase
G _s	Protéine G de type stimulatrice de l'adénylyl cyclase
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
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 de sécrétagogues de la GH
Gfra1	<i>Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1</i>
h	Heure
HeLa	Cellules épithéliales humaines d'adénocarcinome du col de l'utérus
HEK 293	Cellules rénales humaines
hGHRH	Facteur humain de libération de l'hormone de croissance
ICV	Intracérébroventriculaire
IGF-I	Facteur insulinique de croissance de type I
IP ₃	1,4,5-inositol-phosphate
JASP1	<i>stress activated protein kinase-associated protein 1</i>
kb	Kilo paires de base
kDa	Kilodalton
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEK1/MEK2	MAPK/ERK (extracellular-signal-regulated kinase) kinases (MEKs)
Mep1a	<i>Mep1in 1 alpha</i>

min	Minute
MVA	<i>Multivariate analysis</i>
Na ⁺	Ion sodium
NCAM1	<i>Neural cell adhesion molecule 1</i>
NREMS	<i>Non-rapid-eye-movement sleep</i>
PCA	Analyse des composants principaux
PDB	Phorbol 12,13-dibutyrate
Pik3r2	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2</i>
PIP ₂	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
Recc1	Facteur de réplication C
rGHRH	Facteur de libération de l'hormone de croissance de rat
RMA	<i>Robust Multichip Average</i>
RPA	Protection à la RNase
RT-PCR	Amplification en chaîne par une polymérase précédée d'une étape de transcription réverse
Sec	Seconde
Shox2	<i>Short stature homeobox 2</i>
SRIF ou SS	Somatostatine
Stx1b2	Syntaxine 1B2
TCF4E	<i>T-cell factor 4E</i>
T ₃	Triiodothyronine
T ₄	Thyroxine
Tsc2	Tuberous sclerosis 2
VIP	Peptide intestinal vasoactif
Wnt-4	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 4</i>

Je dédie ce mémoire à...
Ma chère Grand-Maman Gabrielle,
Ma sœur Isabelle,
Et mon Amour, Yannick

VII. REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier le D^r Pierrette Gaudreau, source inépuisable de connaissances, pour sa générosité, sa disponibilité constante, sa passion pour la recherche et toute l'expérience que j'ai acquise dans le laboratoire de Neuroendocrinologie du vieillissement.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble de l'équipe du labo NEV pour leur aide à réaliser mon projet de maîtrise, particulièrement Julie Bédard pour son professionnalisme et sa patience légendaire, Karine Bédard pour sa bonne humeur et tous les bons moments passés ensemble, Julie Strecko pour toute son aide et ses encouragements, Christelle Veyrat-Durebex pour ses connaissances indispensables, Luc Pomerleau pour toutes ses réponses à mes milliers de questions, Karine Thériault, pour sa joie de vivre, et également Mélanie Borie, Daniel Langlois, Chantale Boisvert, Karin Robinette et Alma Robert. Un merci tout spécial à l'indispensable et toujours souriante Joanne Auclair.

Merci beaucoup à ma Grand-Maman Gabrielle, ma sœur Isabelle et toute ma famille pour leur soutien constant et leur présence. Merci à toi Yannick, mon amour, pour ton support, tes encouragements et ta grande générosité.

Finalement, je voudrais remercier les membres de mon jury d'évaluation de mémoire de maîtrise et le FRSQ pour la bourse de formation accordée.

1. INTRODUCTION

1.1 Hormone de croissance

1.1.1 Caractéristiques et rôles de l'hormone de croissance

L'hormone de croissance (GH) a été isolée en 1945 à partir d'hypophyses antérieures bovines (Li et coll., 1945). Cette protéine de 191 acides aminés est sécrétée par les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure (Li et coll., 1945). La GH agit en se liant à son récepteur (GH-R) hépatique, mais également à celui de plusieurs autres tissus, dont le rein (Tiong et coll., 1991). La liaison de GH à son récepteur augmente la synthèse et la sécrétion du facteur insulinique de croissance de type I (IGF-I), qui est majoritairement produit dans le foie (Schwander et coll., 1983).

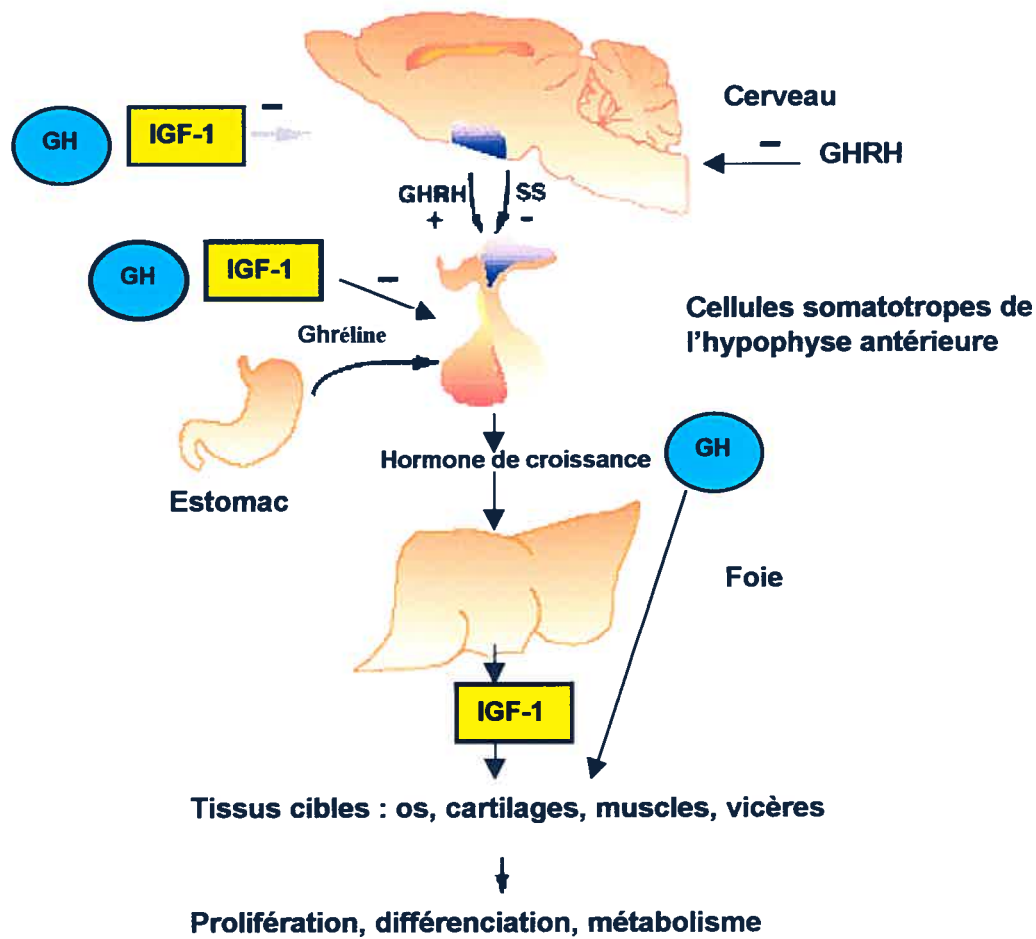
La GH joue un rôle primordial dans la régulation de la croissance longitudinale et du développement chez l'enfant, et le maintien de l'intégrité et de la fonctionnalité des tissus chez l'adulte (Andreasen et coll., 1996). La GH stimule la croissance de plusieurs tissus, en augmentant la taille des cellules et le taux de mitose. La GH est également un important régulateur du métabolisme des protéines, lipides et glucides (Andreasen et coll., 1996). Elle augmente la concentration de protéines musculaires en stimulant la transcription de l'ADN, la synthèse protéique et en diminuant 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 diminue l'utilisation du glucose en causant une résistance à l'insuline, ce qui entraîne une diminution de l'entrée et de l'utilisation du glucose dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux (Andreasen et coll., 1996). Une hyposécrétion de GH au cours de l'enfance mène à des retards de croissance et au nanisme lorsque non traité par une thérapie hormonale de substitution (Andreasen et coll., 1996). Une déficience en GH chez l'enfant est caractérisée par un retard de la maturation des os, et chez l'adulte, par une augmentation de la masse adipeuse et une diminution des masses musculaire et corporelle (Andreasen et coll., 1996).

1.1.2 Régulation de l'hormone de croissance

La synthèse et la sécrétion de GH sont principalement contrôlées dans les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure par deux facteurs hypothalamiques, le facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH) et la somatostatine (SRIF ou SS). Le GHRH est un peptide de 40 et 44 aa chez l'humain (Bohlen et coll., 1983), et de 43 aa chez le rat (Mayo et coll., 1985). Des études immunocytochimiques (Merchenthaler et coll., 1986) et immunohistochimiques (VandePol et coll., 1986) ont démontré que la majorité des neurones sécrétant le GHRH proviennent du noyau arqué de l'hypothalamus, chez le rat. Le GHRH est relâché dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, se lie à son récepteur couplé à une protéine G stimulatrice (Mayo, 1992) exclusivement situé sur les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure (Morel et coll., 1999), et stimule la synthèse et la sécrétion de GH (Barinaga et coll., 1985). La SRIF, un peptide de 14 aa synthétisé dans le noyau périventriculaire de l'hypothalamus, inhibe la sécrétion de GH (Tannenbaum et coll., 1984), en se liant à son récepteur couplé à une protéine G inhibitrice (Yamada et coll., 1992).

Des mécanismes de rétrocontrôles positifs et négatifs de plusieurs peptides et hormones, incluant le GHRH, la SRIF, la GH et l'IGF-I participent à la régulation de la sécrétion de GH (Figure 1). Le GHRH régule sa propre sécrétion au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus en agissant sur son récepteur (Lumpkin et coll., 1989). Une injection intraventriculaire de GH augmente la sécrétion de SRIF de l'hypothalamus chez le rat (Chihara et coll., 1981). La GH inhibe également sa sécrétion par une rétroaction négative au niveau de l'hypophyse, ou en diminuant la sécrétion de GHRH par l'hypothalamus (Frohman et coll., 1992). L'IGF-I exerce un rétrocontrôle en diminuant la sécrétion de GH et les niveaux d'ARNm de GH dans des cellules tumorales hypophysaires (Yamashita et coll., 1986).

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>.

L'IGF-I est impliqué dans l'inhibition de la sécrétion de GH en diminuant la sécrétion de GHRH de l'hypothalamus (Shibasaki et coll., 1986), et en diminuant les niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire (Kamegai et coll., 1998), chez le rat.

La ghréline, un peptide de 28 acides aminés purifié à partir d'estomac de rat, stimule également la sécrétion de GH hypophysaire, en se liant à son récepteur de la famille des sécrétagogues de la GH (GHS-R) (Kojima et coll., 1999). La ghréline et son ARNm ont été détectés dans l'hypophyse humaine par RT-PCR, et dans l'hypothalamus humain par immunocytochimie (Korbonits et coll., 2001). La ghréline agit sur l'axe de GH principalement via l'hypothalamus, et peut également stimuler la sécrétion de GH directement de l'hypophyse, de façon paracrine ou autocrine (Korbonits et coll., 2001).

1.2 Le facteur de libération de l'hormone de croissance

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

Le GHRH a été isolé de tumeurs pancréatiques de patients souffrant d'acromégalie. Vale et coll. ont identifié la structure d'un peptide de 40 acides aminés (aa), le GHRH(1-40)OH (Rivier et coll., 1982), et l'équipe de Guillemin a identifié, en plus du peptide de 40 aa, un peptide de 37 aa, le GHRH(1-37)NH₂, et un peptide de 44 aa, le GHRH(1-44)NH₂ (Guillemin et coll., 1982). Il a été démontré par des études *in vivo* que ces trois peptides stimulent de façon équivalente la sécrétion de GH, puisque la séquence bioactive est constituée des 29 aa de la portion N-terminale (Rivier et coll., 1982 ; Guillemin et coll., 1982). Les formes de 40 et 44 aa ont été observées chez l'humain (Bohlen et coll., 1983), alors que chez le rat, la forme de 43 aa (GHRH(1-43)OH) remplace celle de 44 aa (Mayo et coll., 1985). Chez l'humain, le gène du GHRH est situé sur le chromosome 20 (Mayo et coll., 1985), et chez le rat, sur le chromosome 3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

À l'aide d'un essai de liaison au [¹²⁵I-Tyr¹⁰]hGRF(1-44)NH₂, Gaudreau et coll.

(1992) ont effectué une étude de structure-affinité permettant d'identifier les régions importantes du GHRH impliquées dans sa liaison au GHRH-R, dans l'hypophyse antérieure de rat. L'effet de délétions a permis de déterminer que les acides aminés contenus dans la région 13-21 du hGRF(1-29)NH₂ sont plus importants que ceux situés en 24-29, pour permettre une affinité de liaison optimale du GHRH à son récepteur (Gaudreau et coll., 1992). En utilisant cet essai, Lefrançois et coll. (1994) ont déterminé les caractéristiques structurales du GHRH nécessaires au maintien d'une haute affinité de liaison au récepteur, dans l'adénohypophyse de rat. La substitution de chaque aa du hGRF(1-29)NH₂ par l'alanine (Ala), afin d'examiner l'importance de chaque chaîne latérale dans la liaison avec le récepteur, ou par son stéréoisomère, afin d'étudier l'effet de changements conformationnels locaux sur l'affinité de liaison du GHRH au récepteur, a été entreprise. Les résultats de cette étude montrent que les résidus Tyr¹, Asp³, Tyr¹⁰, Arg¹¹, Lys¹², Leu¹⁴, Leu¹⁷, Arg²⁰ et Lys²¹ sont importants pour la liaison au récepteur, alors que les aa Ala⁴, Val¹³, Ala¹⁹ et Ile²⁶ sont impliqués dans le maintien de la structure du hGRF(1-29)NH₂, permettant une liaison à haute affinité. Les aa Ile⁵ et Phe⁶ seraient importants pour les deux paramètres. Les résidus impliqués dans la liaison au récepteur seraient également nécessaires à l'activation du récepteur et la production d'AMPc (Lefrançois et coll., 1994).

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

Dans l'hypophyse antérieure, le GHRH provoque une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de GH (Barinaga et coll., 1985). De plus, le GHRH augmente les niveaux d'ARNm de GH dans des cultures primaires de cellules hypophysaires de rat (Gick et coll., 1984). La liaison du GHRH à son récepteur stimule la prolifération des cellules somatotropes, induite par l'AMPc (Billestrup et coll., 1986). En effet, la forskoline, un activateur de l'adénylyl cyclase, stimule la prolifération des cellules somatotropes de façon similaire au GHRH (Billestrup et coll., 1986). Le GHRH induit la prolifération des cellules somatotropes impliquant une augmentation de l'expression du gène *c-fos* (Billestrup et coll., 1987).

Dans le cerveau, le GHRH module la prise alimentaire (Dickson et coll., 1990). Une administration intracérébroventriculaire (ICV) de GHRH augmente la prise alimentaire diurne chez le rat Wistar, mais n'a aucun effet ou diminue la prise alimentaire nocturne (Feifel et coll., 1989). Une injection d'antisérum anti-GHRH dans le noyau suprachiasmatique et la région préoptique médiane diminue significativement la prise alimentaire nocturne, mais n'a pas d'effet durant les périodes semi-éclairées ou diurnes, suggérant un rôle du GHRH dans la régulation du cycle circadien de la prise alimentaire (Vaccharino et coll., 1991). Cette diminution est spécifique à l'apport protéique (Dickson et coll., 1995). Chez les rats LOU âgés, le GHRH injecté de façon périphérique diminue la prise alimentaire globale et de lipides, et augmente de façon transitoire la prise protéique, alors que le GHRH injecté IVC induit une diminution de la prise alimentaire globale et de lipides (Veyrat-Durebex et coll., 2001). Ces résultats suggèrent que le GHRH régule la prise alimentaire via le GHRH-R hypophysaire et /ou hypothalamique (Veyrat-Durebex et coll., 2001). L'ensemble de ces résultats montrent que le GHRH joue un rôle dans le contrôle de l'organisation de la prise alimentaire.

Le GHRH est aussi impliqué dans le cycle du sommeil. Une injection ICV de GHRH chez le rat augmente la phase d'ondes lentes (sommeil profond), associée à une augmentation de basses fréquences (1-2 Hz) et une diminution des fréquences hautes (32-64 Hz) (Ehlers et coll., 1986). L'administration ICV d'anticorps anti-GHRH chez le rat résulte en une diminution du sommeil NREMS (*non-rapid-eye-movement sleep*) chez ces animaux, montrant le rôle du GHRH endogène dans la régulation du sommeil (Obal et coll., 1992).

L'ARNm du GHRH a été détecté dans les cytotrophoblastes de placenta de rat (Margioris et coll., 1990). Une stimulation avec 8-bromo-AMPC (un activateur de l'AMPC) et une stimulation par le phorbol 12-myristate 13-acétate (un activateur de la PKC) ont augmenté la sécrétion de GHRH dans le placenta de rat, ce qui suggère une régulation par les voies AC et PKC (Margioris et coll., 1990). Le GHRH

placentaire pourrait réguler la production d'hormones placentaires afin d'agir directement sur la croissance et la différenciation du fœtus (Mayo et coll., 1996).

L'ARNm du GHRH est présent chez l'humain et le rat au niveau du testicule (Berry et coll., 1992, Berry et coll., 1988) et de l'ovaire (Bagnato et coll., 1992). Le GHRH, présent dans les cellules interstitielles et germinales du testicule de rat, joue un rôle important dans la régulation de la fonction des cellules de Sertoli (Fabbri et coll., 1995). Dans l'ovaire de rat, le GHRH joue un rôle dans la maturation des cellules de la granulosa (Moretti et coll., 1990).

L'ARNm du GHRH est présent dans le pancréas et l'intestin (Matsubara et coll., 1995). Le GHRH stimule la sécrétion d'enzymes digestives du pancréas (Pandol et coll., 1984). Le GHRH intestinal augmente la prolifération des cellules épithéliales de l'intestin chez le rat (Lehy et coll., 1986).

1.3 Le récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

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

Le GHRH-R a été cloné dans l'hypophyse de plusieurs mammifères, incluant le rat (Mayo et coll., 1992 ; Lin et coll., 1992) la souris (Lin et coll., 1992), l'humain (Mayo et coll., 1992 ; Gaylinn et coll., 1993), le porc (Hsiung et coll., 1993), le bœuf et le mouton (Horikawa et coll., 2001).

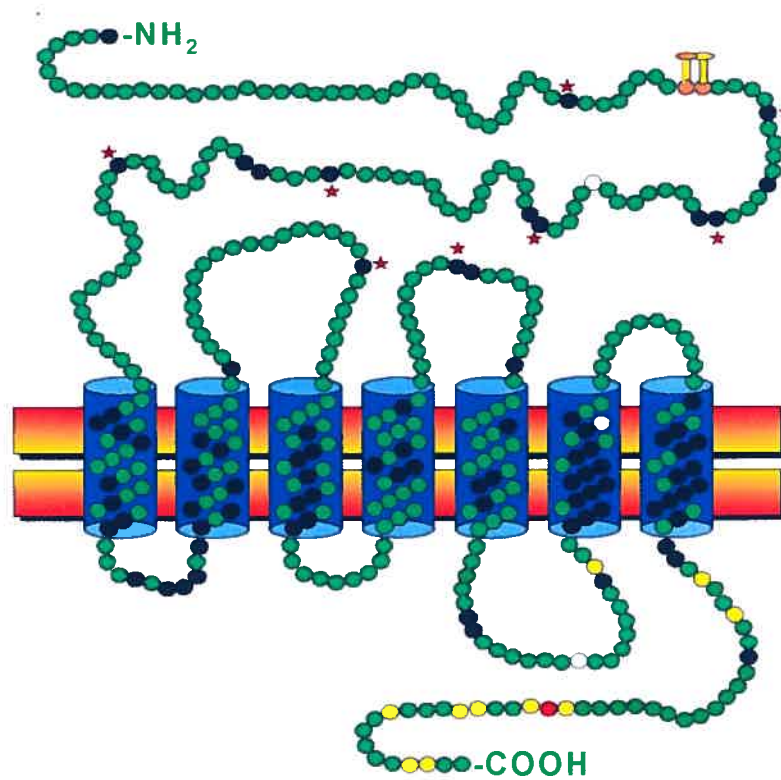
Le GHRH-R appartient à la sous-famille B-III des récepteurs couplés aux protéines G (Kolakowski et coll., 1999), comprenant également les récepteurs du peptide intestinal vasoactif (VIP) (Ishihara et coll., 1992), de la sécrétine (Ishihara et coll., 1991) et du glucagon (Jelinek et coll., 1993). Le GHRH-R de rat partage respectivement 35 et 40% d'homologie de séquence avec les récepteurs de la sécrétine et du VIP (Mayo et coll., 1992).






Le GHRH-R possède plusieurs caractéristiques conservées parmi les récepteurs couplés aux protéines G, soit sept domaines transmembranaires, des résidus cystéines dans les deuxièmes et troisièmes boucles extracellulaires, qui formeraient des ponts disulfures, et une cystéine dans la partie C-terminale intracytoplasmique pouvant être palmitoylée (Mayo et coll., 1992 ; Mayo et coll., 1996). Il possède au moins un site de N-glycosylation dans la partie N-terminale, et des sites potentiels de phosphorylation dans la troisième boucle cytoplasmique et la partie C-terminale (Mayo et coll., 1992 ; Mayo et coll., 1996). Il renferme plusieurs résidus hautement conservés dans les domaines transmembranaires (Mayo et coll., 1992 ; Mayo et coll., 1996). Le long domaine N-terminal du GHRH-R comporte six cystéines conservées (Figure 2).

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

Deux transcrits d'ARNm du GHRH-R d'environ 2.5 et 4 kb ont été identifiés dans l'hypophyse antérieure de rat (Mayo et coll., 1992 ; Lin et coll., 1992). Le transcrit de 2.5 kb est le plus abondant et encode le GHRH-R fonctionnel de 423 acides aminés (Miller et coll., 1999). Cette forme lie le GHRH avec une haute affinité et active la production d'AMPc intracellulaire (Miller et coll., 1999). Une isoforme de 464 aa, contenant une insertion de 41 aa (addition de 123 pb) au niveau de la troisième boucle intracytoplasmique, située immédiatement avant le sixième domaine transmembranaire, a également été décrite (Mayo, 1992 ; Lin et coll., 1992). Ce point d'insertion correspond à une jonction intron-exon, suggérant que cette isoforme longue du récepteur serait formée à partir d'un processus d'épissage alternatif de l'ARN (Mayo et coll., 1992). Elle possède une affinité plus faible pour le GHRH que la forme native de 423 aa du GHRH-R. La stimulation de cette isoforme par le GHRH ne provoque aucune production d'AMPc, contrairement à la forme de 423 aa (Miller et coll., 1999).

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



-  : 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.

Par ailleurs, Zeitler et coll. (1998) ont identifié une deuxième isoforme du GHRH-R par RT-PCR dans l'hypophyse de rat normal et nain, contenant l'insertion de 123 pb (41 aa) dans la troisième boucle cytoplasmique décrite précédemment, 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. L'ARNm de cette isoforme produit une protéine de 42 kDa, qui provoque une augmentation GHRH-dépendante de la production d'AMPc, dans une lignée de cellules fibroblastiques rénales de singe (Cos) ou cancéreuses humaines (Hela) (Zeitler et coll., 1998).

Un ADNc du GHRH-R encodant une protéine fonctionnelle de 423 aa a été identifié dans l'hypophyse humaine (Mayo et coll., 1992). Trois isoformes, résultant de l'épissage alternatif de l'intron 11 ont été identifiées à partir de tumeurs hypophysaires GH-sécrétantes et non sécrétantes et d'hypophyses humaines normales (Tang et coll., 1995). Leur taille partielle est de 1.3, 1.7 et 1.8 kb. La forme de 1.3 kb est la plus abondante et correspond au GHRH-R, alors que les deux autres variants contiennent des insertions d'environ 400 et 500 pb, respectivement, en position 1025 du transcrit d'ARNm du GHRH-R. Ces formes proviendraient d'un processus d'épissage alternatif. Le variant de 1.7 kb donnerait donc une protéine tronquée à partir de l'aa 325, alors que celui de 1.8 kb donnerait une protéine tronquée à partir de l'acide aminé 338, mais dont les 12 derniers résidus seraient différents de la séquence native du GHRH-R (Tang et coll., 1995).

Hashimoto et coll. (1995) ont étudié l'expression de l'ARNm du GHRH-R dans des hypophyses normales et des adénomes hypophysaires humains. En plus d'un transcrit prédominant de 2.0 kb, retrouvé dans les hypophyses normales, et correspondant à la protéine de 423 aa, des transcrits de 2.8 et 4.5 kb ont été observés (Hashimoto et coll., 1995). La séquence codante des transcrits de 2.8 et 4.5 kb contient un codon stop donnant naissance à des récepteurs tronqués au niveau de la troisième boucle intracytoplasmique. Dans les cellules Cos-7 transfectées avec le transcrit de 2.0 kb, une stimulation au GHRH provoque une accumulation d'AMPc, mais non dans celles transfectées avec le transcrit de 4.5 kb, montrant que le

récepteur tronqué ne peut transmettre le signal du GHRH (Hashimoto et coll., 1995). De plus, la co-transfection des transcrits de 4.5 kb et 2 kb diminue la production d'AMPc par le GHRH, suggérant un rôle de dominant négatif de la forme longue du GHRH-R (Motomura et coll., 1998).

Le clonage du GHRH-R à partir d'une librairie d'ADNc d'hypophyse de brebis a révélé que la structure du récepteur correspond chez cette espèce au segment 1-407 aa de la forme de 423 aa retrouvée chez les autres mammifères (Horikawa et coll., 2001). Il possède un codon stop prématuré à la position 408, entraînant une délétion des 16 aa en C-terminal. Le séquençage de l'ADN génomique de chèvre de la région contenant la mutation chez la brebis, a montré que les deux espèces présentaient une mutation identique. Cette mutation du GHRH-R n'affecte pas les paramètres de liaison du GHRH, mais augmente la sensibilité du GHRH à stimuler la production d'AMPc, suggérant que le domaine C-terminal contrôle l'efficacité de signalisation de la voie adénylyl cyclase. Cette mutation élimine six sites potentiels de phosphorylation, ce qui pourrait entraîner une inhibition de la régulation à la baisse du GHRH-R *via* son internalisation, ou son inefficacité à se coupler à la protéine G (Horikawa et coll., 2001).

Deux isoformes du GHRH-R (G3R et G5R), isolées d'une librairie d'ADNc d'hypophyse antérieure de porc, possèdent une structure primaire identique entre les aa 1-418, puis une différente séquence de 419 à 423 (Hassan, 2001). L'isoforme G5R possède 28 aa supplémentaires à l'extrémité C-terminale. Lorsque exprimé de manière stable dans les cellules HEK 293, le GHRH se lie à l'isoforme G3R du GHRH-R avec une affinité plus élevée qu'à l'isoforme G5R. L'activité de la GTPase et la concentration d'AMPc suite à une stimulation au GHRH sont plus élevées pour l'isoforme G3R. Ces résultats suggèrent que la modification de l'extrémité C-terminale du GHRH-R peut interférer avec la liaison du GHRH au récepteur et diminuer l'efficacité de signalisation du GHRH-R (Hassan, 2001).

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

Le gène du GHRH-R humain a été localisé sur le bras court du chromosome 7p14 (Gaylinn et coll., 1994) et sur le chromosome 7p15 (Wajnrajch et coll., 1994). L'analyse du gène a montré qu'il s'étend sur plus de 8 kb et renferme plus de 10 exons (Petersenn et coll., 1998). Il contient un seul site d'initiation de la transcription, qui est situé à 40 pb en amont du site d'initiation de la traduction (Petersenn et coll., 1998). La séquence du promoteur comprend des sites de liaison de facteurs de transcription tissu-spécifiques, tels que les facteurs à domaines POU, Pit-1 ou *growth hormone factor 1* (GHF-1), qui sont spécifiques à l'hypophyse, et le facteur de transcription *brain-2* (Brn-2), spécifique aux neurones (Petersenn et coll., 1998). Des facteurs de transcription inductibles par des stimuli exogènes, comme la protéine activatrice-1 (AP-1), la protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (CREB), le récepteur à l'œstrogène (ER) et le facteur nucléaire- κ B (NF-KappaB) ont également été identifiés dans la région promotrice du GHRH-R humain (Petersenn et coll., 1998). Un élément de réponse positif aux glucocorticoïdes et un élément de réponse négatif aux œstrogènes ont également été rapportés (Petersenn et coll., 1998).

Le gène du GHRH-R de rat est composé de 14 exons s'étendant sur 15 kb (Miller et coll., 1999). Trois sites importants d'initiation de la transcription ont été identifiés aux positions 286, 93 et 84 pb en amont du site d'initiation de la traduction alors qu'un site mineur a été observé en position 203 (Miller et coll., 1999). Plusieurs sites potentiels de liaison à Pit-1 ont été identifiés dans la région promotrice de 1.9 kb en amont du site initiateur de la traduction (Miller et coll., 1999 ; Nogami et coll., 2002). Nogami et coll. (2002) ont également identifié deux éléments de réponse fonctionnels aux glucocorticoïdes, un élément de réponse aux hormones thyroïdiennes, et un élément de réponse fonctionnel à l'acide rétinoïque. De plus, tel que pour le GHRH-R humain, l'œstrogène inhibe l'expression du GHRH-R de rat (Miller et coll., 1997).

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

La présence du GHRH-R a été mise en évidence au niveau de 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).

De faibles niveaux d'ARNm du GHRH-R ont également été détectés par RT-PCR dans plusieurs tissus extrahypophysaires de rat, tels que le muscle squelettique, le duodénum, la rate, l'épididyme, le cœur, le poumon, le cerveau et le rein, mais non dans le foie (Matsubara et coll., 1995). Seule la médulla rénale renferme des niveaux d'ARNm du GHRH-R détectables sans amplification (Matsubara et coll., 1995 ; Boisvert et coll., 2002). Des études d'hybridation *in situ* et d'essais de protection à la RNase ont montré que l'anse de Henlé (AH) mince de la médulla renferme des niveaux élevés d'ARNm du GHRH-R (Boisvert et coll., 2002). Des études d'immunocytochimie ont révélé une co-localisation du GHRH-R avec le canal anionique CIC-K1, exclusivement localisé dans les cellules de l'AH ascendante mince (AHam), et non avec le canal aquaporine-1, restreint à l'AH descendante mince (Boisvert et coll., 2001).

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

1.3.5.1 Récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance

Les études de radioliation ont constitué les premières techniques permettant de caractériser le GHRH-R dans l'hypophyse de différents mammifères. Des études de saturation dans des homogénats d'hypophyse antérieure de rat de 2 mois, à l'aide du ligand [125 I-Tyr 10]hGHRH(1-44)NH $_2$ (125I-GHRH), ont mis en évidence la présence

de deux sites de liaison du ligand au récepteur: un premier site à haute affinité et basse capacité, et un deuxième site à basse affinité et haute capacité (Atribat et coll., 1990).

Des études de réticulation chimique ont permis de caractériser les complexes ligand-GHRH-R de 26 kDa (Zysk et coll., 1986), de 27 et 42 kDa (Guarcello et coll., 1991) ou de 28, 47 et 65 kDa dans l'hypophyse antérieure de rat (Boulanger et coll., 1999). L'immunobuvardage Western de préparations membranaires d'homogénats d'hypophyse de rats a permis la détection de trois protéines de 44, 47 et 65 kDa (Boulanger et coll., 1999). L'entité de 47kDa correspondrait à la forme décrite par Mayo (Mato et coll., 1992), et 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 serait une forme longue ou glycosylée du GHRH-R, car la structure du récepteur possède des sites potentiels de N-glycosylation (Mayo et coll., 1992 ; Lin et coll., 1992). 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). Une protéine de 45 kDa est détectée dans les cellules BHK transfectées avec le GHRH-R humain (Boulanger et coll., 1999).

De Almeida et Mayo (1998) ont étudié les régions du GHRH-R humain impliquées dans la liaison du GHRH par l'analyse de récepteurs mutants et chimériques. L'extrémité N-terminale extracellulaire du GHRH-R, en association avec les segments transmembranaires et leurs boucles extracellulaires, sont essentiels à l'interaction initiale entre le ligand et le récepteur. De plus, des résidus dans les boucles extracellulaires, en relation avec des domaines trans-membranaires, sont essentiels pour la spécificité de liaison du GHRH (DeAlmeida et coll., 1998). Les domaines C-terminal et N-terminal doivent être présents pour permettre la liaison optimale du GHRH (DeAlmeida et coll., 1998).

1.3.5.2 Récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance

Fujinaka et coll. (1996) ont effectué une expérience d'immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti-GHRH-R dans plusieurs tissus extrahypophysaires humains incluant l'ovaire, le placenta, le poumon, la glande surrénale et le rein, et une entité immunoréactive de 52 kDa a été mise en évidence uniquement dans le rein.

Des études de saturation avec le ligand [^{125}I -Tyr 10]hGHRH(1-44)NH $_2$ ont mis en évidence la présence d'un site de liaison pour le GHRH-R (K_d : 28nM) dans la médulla rénale de rat (Boulanger et coll., 2002). Des études de réticulation chimique ont permis de détecter des complexes protéiques de 38, 55 et 65 kDa dans la médulla rénale de rat, comparativement à ceux de 28, 47 et 65 kDa dans l'hypophyse antérieure (Boulanger et coll., 2002). La protéine de 47 kDa représentant un récepteur fonctionnel de 423 aa dans l'hypophyse, la protéine rénale de 55 kDa pourrait correspondre à une forme glycosylée du GHRH-R, tel que rapporté pour les hypophysés bovine et ovine (Gaylinn et coll., 1994). La protéine de 65 kDa pourrait également représenter une forme glycosylée ou une isoforme plus longue du récepteur. Quant à la protéine de 38 kDa, elle pourrait résulter d'une protéolyse du complexe ^{125}I -GHRH-R-GHRH durant le processus de réticulation (Boulanger et coll., 2002). Des différences de profil de structure-affinité observées entre l'hypophyse et le rein suggèrent des différences structurales au niveau du site de liaison du GHRH, ou au niveau d'autres domaines du récepteur pouvant influencer la conformation du site de liaison (Boulanger et coll., 2002).

Boisvert et coll. (2002) ont détecté par buvardage Northern des transcrits d'ARNm polyA du GHRH-R de 2.3 et 3.7 kb, dans la médulla rénale et l'hypophyse antérieure de rat. Ils seraient respectivement 2.3 et 1.3 fois moins abondants dans le rein que dans l'hypophyse (Boisvert et coll., 2002).

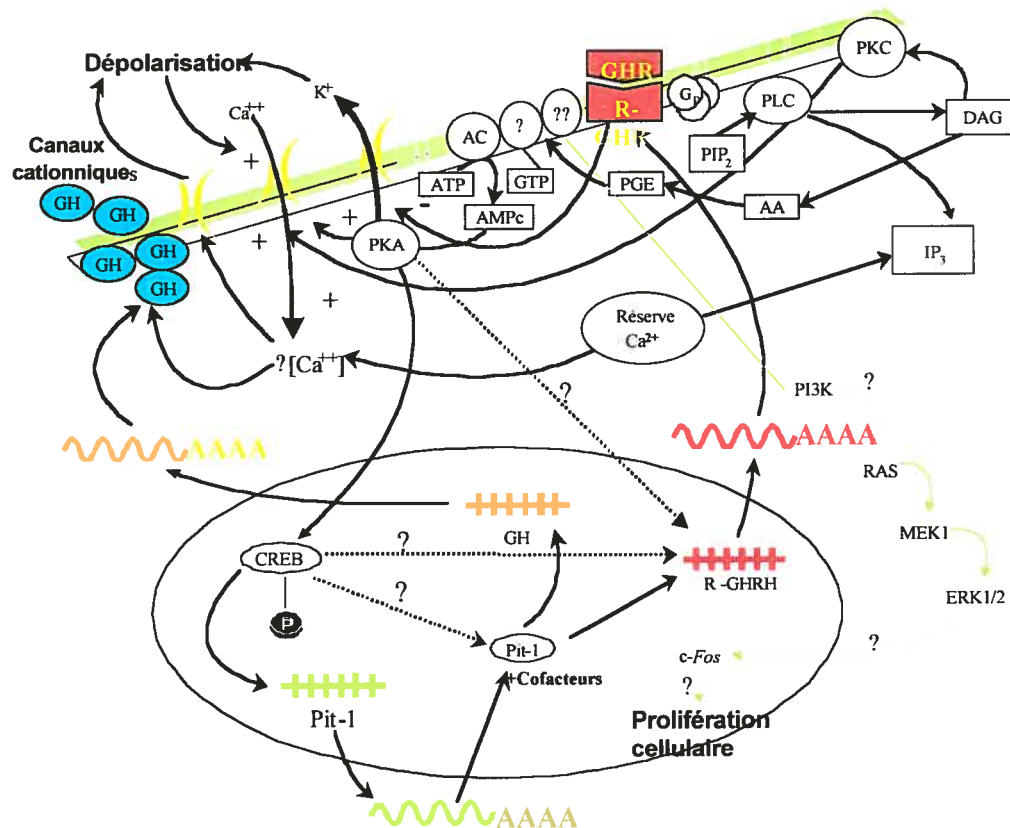
1.3.6 Voies de signalisation du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance

Dans les cellules somatotropes, l'activation du GHRH-R par le GHRH induit une cascade de signalisation menant à la synthèse et sécrétion de GH (Figure 3). La liaison du GHRH à son récepteur permet l'activation d'une protéine Gs, la stimulation de l'adénylyl cyclase et la production d'AMPc, qui active la protéine kinase A.

L'augmentation des niveaux d'AMPc entraîne la phosphorylation des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, menant à leur ouverture et à l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire nécessaire à la sécrétion de GH (Cuttler et coll., 1992 ; Lussier et coll., 1991a ; Lussier et coll., 1991b). Une stimulation au GHRH dans des cellules hypophysaires *in vitro* active également des canaux Na^+ insensibles à la tétrotoxine et des canaux cationiques non sélectifs, causant une dépolarisation qui active les canaux calciques (Kato et coll., 1992 ; Frohman et coll., 1996). L'activation de la protéine kinase A permet la phosphorylation de plusieurs autres substrats cytoplasmiques et nucléaires, dont le facteur CREB (*cAMP-responsive element binding protein*) (Brindle et coll., 1992). Celui-ci stimule la transcription de plusieurs gènes, dont celui de Pit-1, qui active la transcription des gènes de GH et du GHRH-R.

Le GHRH-R est également lié à une protéine Gp qui active la phospholipase C (Frohman et coll., 1996). Celle-ci transforme le phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate (PIP_2) en inositol 2,4,5 triphosphate (IP_3) et diacyl glycérol (DAG). L' IP_3 libère le calcium du réticulum endoplasmique, et le DAG active la PKC, qui augmente l'entrée de calcium extracellulaire. Dans les cellules de l'hypophyse antérieure de rat, des activateurs de la PKC augmentent la sécrétion de GH suite à une stimulation au GHRH (Ohmura et coll., 1985 ; Summers et coll., 1985). La 4 β -phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), un activateur de la PKC, augmente significativement la quantité d'AMPc stimulée par le GHRH dans les cellules de l'hypophyse antérieure de rat (Cronin et coll., 1986). L'activation de la PKC par l'ester de phorbol PDB (phorbol 12,13-dibutyrate) provoque une augmentation des concentrations de calcium intracellulaire dans les cellules somatotropes (Holl et coll., 1989).

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



Tiré de la thèse de C Boisvert, Université de Montréal, 2003, Localisation, régulation et fonction du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat.

Suite à une stimulation avec des activateurs de la PKC, tel que la phospholipase C, qui libère du DAG endogène, le PMA ou le DAG synthétique, la sécrétion de GH est augmentée *via* une mobilisation de calcium dans les cellules de l'hypophyse antérieure (Judd et coll., 1986).

La liaison du GHRH à son récepteur hypophysaire active une cascade de signalisation stimulant la prolifération (Billestrup et coll., 1986 ; Mayo et coll., 1988) (Figure 3) et la différenciation des somatotropes (Dean et coll., 1999). La forskoline, un activateur de l'adénylyl cyclase, stimule la prolifération des cellules somatotropes de façon similaire au GHRH (Billestrup et coll., 1986). Le GHRH active la voie MAPK dans les cellules hypophysaires, causant leur prolifération (Pombo et coll., 2000 ; Zeitler et coll., 2000). De plus, un inhibiteur de MEK1, le PD98095, empêche l'activation des MAPK et la prolifération de la lignée GH4 de cellules somatotropes (Zeitler et coll., 2000). L'activation des MAPK a lieu *via* les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G couplée au GHRH-R, et nécessite p21^{ras}, une MAPK, et PI3-K, qui active la PKB (Pombo et coll., 2000). Également, une induction de l'expression du gène c-fos est observée après une stimulation au GHRH (Billestrup et coll., 1987).

1.3.7 Régulation du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance

Plusieurs facteurs interviennent dans l'effet du GHRH sur l'expression du GHRH-R, tels que la durée de stimulation au GHRH et le stade de développement de l'hypophyse (Lasko et coll., 2001). Une exposition prolongée au GHRH cause une désensibilisation des somatotropes, *via* une régulation à la baisse du nombre de sites de liaison du GHRH (Bilezikjian et coll., 1986). L'internalisation et le trafic intracellulaire du GHRH-R ont été étudiés suite à une stimulation au GHRH, dans l'hypophyse antérieure de rat et dans les cellules BHK transfectées avec le GHRH-R humain (h) et de rat (r) (Veyrat-Durebex et coll., 2004). Les résultats suggèrent que l'acylation des acides gras du rGHRH-R est un pré requis à l'internalisation par la voie cavéoline-dépendante, et que le hGHRH-R est internalisé de façon clathrine-

dépendante. Le GHRH-R est ensuite dirigé dans les lysosomes dans les deux types cellulaires. Une synthèse *de novo* et le recyclage dans les cellules somatotropes, et une synthèse *de novo* dans les cellules BHK transfectées avec le hGHRH-R, permettent le maintien d'une quantité optimale de récepteurs fonctionnels à la membrane (Veyrat-Durebex et coll., 2004).

Chez le rat nouveau-né, une immunisation passive au GHRH pendant dix jours provoque une diminution marquée des niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire, suggérant une régulation de l'expression du GHRH-R par son ligand (Horikawa et coll., 1996). De plus, un traitement de 4 h avec 0.1 ou 1 nM de GHRH dans les cellules hypophysaires de rat provoque une diminution de 50% des niveaux d'ARNm du GHRH-R (Aleppo et coll., 1997). Un pré-traitement au GHRH (10 nM) provoque une diminution de la production d'AMPc induite par un traitement subséquent au GHRH. Cependant, un pré-traitement à la GH n'influence pas la production d'AMPc, ce qui démontre que le GHRH, et non la GH, régule à la baisse les niveaux d'ARNm du GHRH-R (Aleppo et coll., 1997). Un traitement à la forskoline (10 μ M), qui stimule directement l'adénylyl cyclase et augmente les taux d'AMPc, diminue significativement les niveaux d'ARNm du GHRH-R, donc le GHRH agirait par la voie de l'AMPc pour réguler négativement l'ARNm de son récepteur (Aleppo et coll., 1997). Des études *in vitro* avec des cellules hypophysaires de rats nouveaux nés et adultes ont démontré une modulation de l'expression de l'ARNm du récepteur lorsque les rats sont traités avec le GHRH (Lasko et coll., 2001). Une réduction significative des niveaux d'ARNm du GHRH-R est observée après 4 h de traitement, une restauration du niveau basal après 24 h et une augmentation après 72 h. La ghréline est le ligand endogène spécifique du récepteur de la famille des sécrétagogues de la GH (GHS) (Kojima et coll., 1999). Une stimulation de 4 h avec 1 μ M de ghréline régule négativement l'ARNm du GHS-R et du GHRH-R, et une stimulation de 4 h avec 10 nM de GHRH régule à la baisse les niveaux d'ARNm du GHRH-R et du GHS-R, montrant une régulation négative hétérologue de ces récepteurs dans les cellules somatotropes de porc (Luque et coll., 2004).

L'augmentation de l'expression du GHRH-R est plus élevée chez les rats nouveaux nés que chez les rats adultes (Lasko et coll., 2001). Une stimulation de 0.5 mg/kg de GHRH chez des rats de deux mois pendant 14 jours augmente le nombre de sites de liaison du GHRH, et une stimulation avec 1.0 mg/kg diminue le nombre de sites de liaison, ce qui suggère une régulation négative ou positive de la transcription du gène du GHRH-R selon la dose de GHRH utilisée (Girard et coll., 1999). Des rats âgés (18 mois) nécessitent une dose de 1.0 mg/kg de GHRH afin de restaurer les paramètres de liaison du GHRH-R en comparaison à ceux observés chez des rats de deux mois, supposant une régulation de l'affinité du récepteur pour son ligand en fonction de l'âge (Girard et coll., 1999).

L'expression du GHRH-R est également régulée par des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. Un traitement à la dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, augmente les niveaux d'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 coll., 1997). En présence d'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, la dexaméthasone ne peut augmenter le niveau d'ARNm du GHRH-R, indiquant une action transcriptionnelle (Miller et coll., 1997). Les hormones thyroïdiennes T_3 (Korytko et coll., 1997) et T_4 (Miki et coll., 1995) augmentent également l'expression du gène du GHRH-R dans les cellules hypophysaires de rat. De plus, une action synergique des glucocorticoïdes avec les hormones thyroïdiennes et l'acide rétinoïque, résultant en une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH-R, a été mise en évidence dans les cellules hypophysaires de rat (Nogami et coll., 2000). Un traitement de 24 h avec l'acide rétinoïque ou l'hormone thyroïdienne T_3 , en synergie avec la dexaméthasone, augmente l'expression de l'ARNm du GHRH-R dans des cellules MtT/S en culture ainsi que dans des cellules d'hypophyse fœtale de rat (Nogami et coll., 2000).

Un dimorphisme sexuel important de l'expression du gène du GHRH-R hypophysaire a été mis en évidence chez le rat. Les niveaux d'ARNm du GHRH-R chez la femelle jeune représentent 15% de ceux retrouvés chez le mâle (Ono et coll.,

1995), se traduisant par une capacité de sécrétion de la GH de 33% plus faible que celle du mâle. Cette diminution du niveau d'expression du GHRH-R et de la capacité à libérer la GH chez la femelle pourrait expliquer la croissance plus lente de la femelle et son poids corporel inférieur à celui du mâle à l'âge adulte (Ono et coll., 1995). Une stimulation aux œstrogènes diminue les 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).

1.3.8 Rôles du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

Dans les cellules somatotropes, les actions du GHRH sont induites par le GHRH-R, qui est impliqué dans la synthèse et la sécrétion de GH (Barinaga et coll., 1985), ainsi que dans la prolifération (Billestrup et coll., 1986) et différenciation (Dean et coll., 1999) des cellules somatotropes. L'étude de la souris *little* a permis de confirmer le rôle du GHRH-R hypophysaire. Une hypoplasie des somatotropes a été observée chez la souris *little*, ce qui suggère un rôle du GHRH-R dans la prolifération et la différenciation de ces cellules (Lin et coll., 1993). Une mutation *missens* dans le domaine extracellulaire du GHRH-R conduit à une diminution importante de la sécrétion de GH, une hypoplasie hypophysaire et un phénotype nain, démontrant le rôle essentiel du GHRH-R dans la sécrétion de GH et la prolifération des cellules somatotropes (Godfrey et coll., 1993). Il a été démontré que cette mutation empêche la liaison du GHRH à son récepteur et la stimulation d'AMPc intracellulaire (Gaylinn et coll., 1999). Chez l'humain, des mutations familiales *missens* du gène du GHRH-R causent une déficience en GH et le nanisme (Carakushansky et coll., 2003 ; Salvatori et coll., 2001). Des cellules CHO exprimant le récepteur muté montrent une augmentation très faible ou nulle des taux d'AMPc suite à une stimulation au GHRH (Carakushansky et coll., 2003 ; Salvatori et coll., 2001).

Des évidences récentes indiquent qu'un GHRH-R fonctionnel est exprimé dans les cellules de l'AH semi-purifiées de rat. Une exposition de 4 h de cellules de l'AH semi-purifiées avec 1, 10 ou 100 nM de rGHRH-(1-29)NH₂ provoque une diminution

de 50-70% des niveaux d'ARNm du GHRH-R, montrant une régulation à la baisse du GHRH-R (Boisvert et coll., 2002). Une stimulation avec un agoniste fluorescent montre une internalisation du récepteur dépendante du temps et de la température d'incubation (Boisvert et coll., 2002). La localisation du GHRH-R rénal dans les cellules de l'AH ascendante mince, suggère un rôle dans l'homéostasie ionique ou hydrique, en lien avec le canal chlore CIC-K1, ou dans la prolifération cellulaire (Boisvert et coll., 2002).

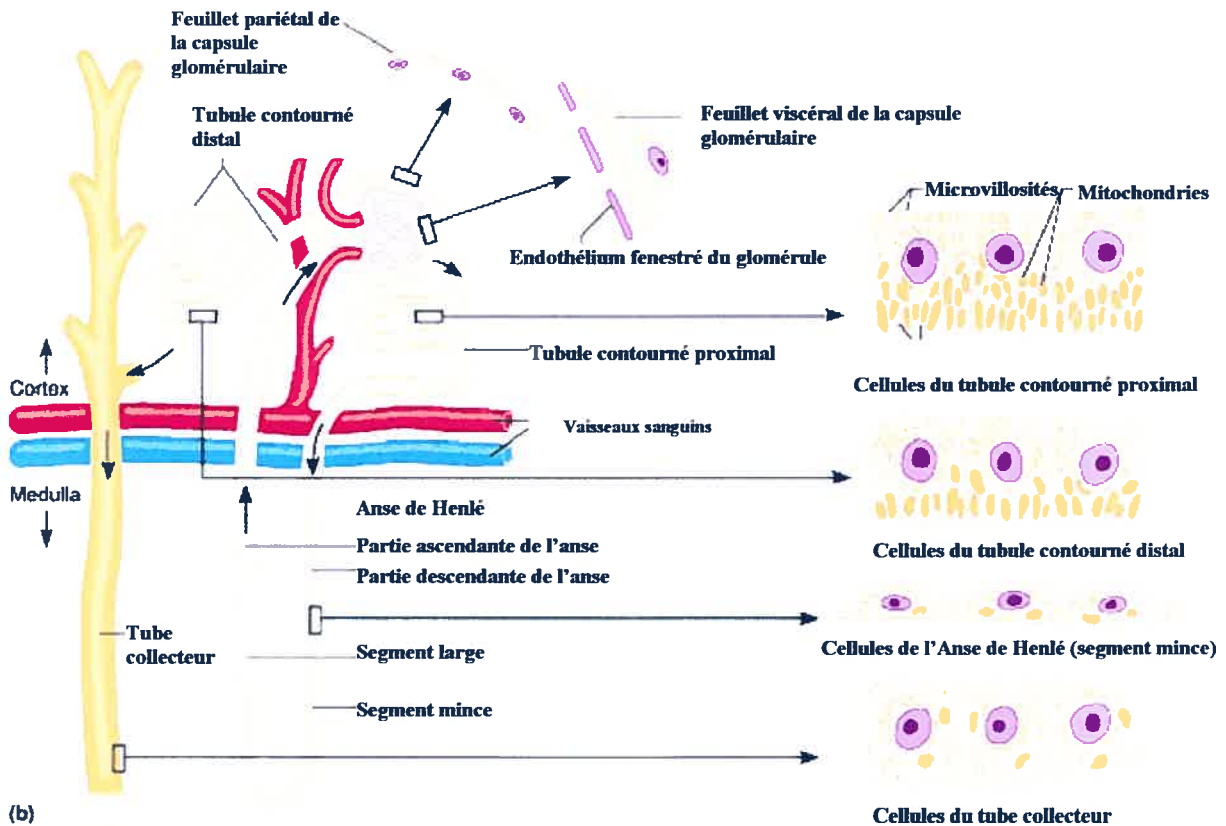
1.4 Le rein comme tissu cible du GHRH

1.4.1 Structure et fonction rénale

Le rein est composé d'une partie externe, le cortex, d'une partie interne, la médulla, et d'un hile, contenant l'artère et la veine rénale ainsi que le bassinnet. L'unité fonctionnelle du rein est le néphron, composé d'un corpuscule rénal, contenant une capsule glomérulaire rénale et un glomérule, et un tubule rénal, composé d'un tubule proximal, une AH et un tubule distal (Figure 4). Celui-ci rejoint le tubule collecteur où converge l'urine de plusieurs néphrons. Les vaisseaux sanguins du néphron sont composés des capillaires glomérulaires, qui produisent le filtrat, et des *vasa recta*, capillaires entourant les tubules et réabsorbant la majorité du filtrat.

Les reins filtrent en moyenne 180 L de liquide par jour et en réabsorbent 99% dans le sang, ce qui résulte en une excrétion d'environ 1.5 L d'urine. Le sang est d'abord filtré passivement par le glomérule rénal, à l'exception des macromolécules telles que les protéines. Ce filtrat glomérulaire est ensuite acheminé dans le tubule proximal et l'AH, où la majorité de l'eau, des nutriments et des ions sont ré-absorbés dans le sang, et où les substances indésirables du plasma, comme des médicaments ou l'urée, sont excrétées dans le tubule. Ce qui reste du filtrat, l'urine, est ensuite acheminée dans les tubes collecteurs, qui la concentreront ou la dilueront selon les besoins de l'organisme (Gougoux, A. 1999).

Figure 4 : Représentation schématique du néphron et des caractéristiques structurales de ses différentes populations cellulaires.



(b)

Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

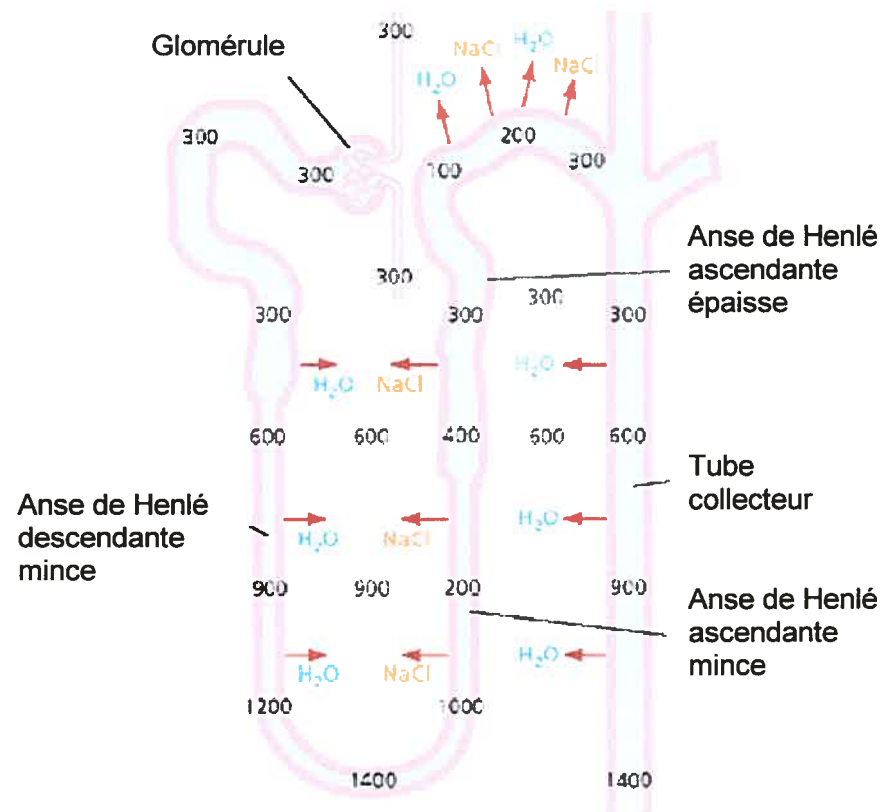
Tiré de E.N. Marieb, Anatomie et physiologie humaines, Éditions du Renouveau Pédagogique INC, 2ème édition, 1999, p. 977.

1.4.2 Mécanisme de concentration de l'urine

L'un des rôles principaux des reins est de maintenir l'osmolalité à environ 300 mOsm/kg, en contrôlant le volume et la concentration de l'urine. Les reins exercent ce contrôle à l'aide d'un mécanisme à contre-courant, qui permet de maintenir un gradient osmotique entre le cortex et la médulla interne (Figure 5). Le terme contre-courant signifie la descente et la remontée des liquides dans les anses de Henlé et *vasa recta* descendantes et ascendantes. Le filtrat qui entre dans le tubule proximal possède une osmolalité approximative à celle du plasma, soit 300 mOsm/kg. Le tubule proximal réabsorbe beaucoup d'eau et d'ions dans le sang (65% du filtrat), ce qui permet au filtrat de demeurer isotonique (Gougoux, A. 1999).

L'AH descendante mince, qui est imperméable aux ions mais perméable à l'eau, réabsorbe de grandes quantités d'eau par osmose vers le milieu interstitiel à osmolalité élevée. Le filtrat devient ainsi de plus en plus concentré vers la médulla interne, atteignant jusqu'à 1400 mOsm/kg. Les anses de Henlé ascendantes minces et épaisses étant imperméables à l'eau mais perméables aux ions, le Na^+/Cl^- du filtrat à osmolalité élevée est dirigé vers le milieu interstitiel, contribuant à augmenter son osmolalité. Le filtrat devient ainsi hypotonique, avec une osmolalité diminuant jusqu'à 100 mOsm/kg lorsqu'il remonte vers le cortex. Plus la partie ascendante réabsorbe des ions et augmente l'osmolalité du liquide interstitiel, plus la partie descendante réabsorbe de l'eau dans le sang par osmose. L'énergie utilisée pour créer le gradient osmotique de la médulla provient majoritairement du transport actif de sodium dans l'AH ascendante épaisse. L'urine sera ensuite acheminée dans le tubule distal et le tubule collecteur. Le sang des *vasa recta*, les vaisseaux sanguins parallèles aux néphrons, s'équilibre avec le milieu interstitiel de la médulla, devenant hypertonique en descendant vers la médulla. Il réabsorbe de l'eau et perd des ions en remontant vers le cortex, maintenant le gradient osmotique du milieu interstitiel. La concentration de l'urine est ensuite contrôlée par la vasopressine dans le tubule distal et le tubule collecteur (Gougoux, A. 1999).

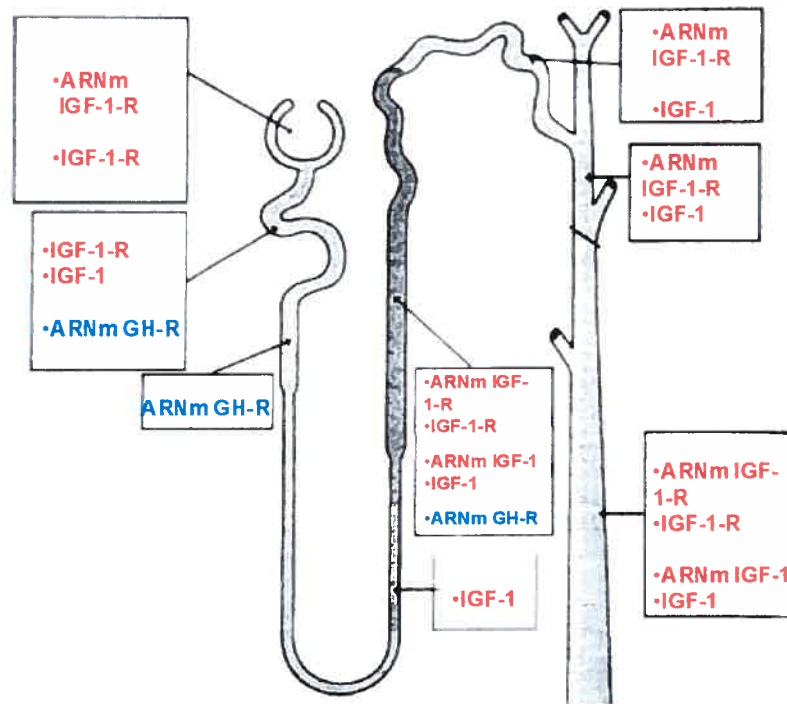
Figure 5 : Mécanisme de concentration de l'urine dans le néphron.



Les valeurs représentent l'osmolalité en mOsm/kg.

Tiré de http://www.nature.com/ng/journal/v21/n1/images/ng0199_68.gif.

Figure 6 : Localisation des composantes du système GH/IGF-I dans le rein de rat.



Tiré de : Dubuisson et coll., 2001. Internalisation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance dans les cellules de l'anse de Henlé. 4^{ème} congrès annuel des étudiants du CRCHUM, Montréal, Canada.

1.4.3 L'axe GH-IGF-I rénal

Chez le rat, la présence de l'IGF-I dans le tubule collecteur et l'AH mince rénale a été mise en évidence par immunocytochimie (Andersson et coll., 1988) (Figure 6).

L'AH mince ne possède pas de récepteur de l'IGF-I (IGF-I-R), suggérant une action paracrine de l'IGF-I. L'ARNm du récepteur de la GH (GH-R) est principalement situé dans le tubule proximal et dans l'AH ascendante épaisse (Chin et coll., 1992). L'ARNm de l'IGF-I-R est localisé dans le glomérule, le tubule distal, le tubule collecteur et l'AH ascendante épaisse (Chin et coll., 1992). La partie ascendante épaisse de l'AH est la seule où sont co-localisés l'IGF-I, l'IGF-I-R et le GH-R, ce qui suggère un rôle de la GH dans la synthèse d'IGF-I, permettant une action autocrine ou paracrine (Chin et coll., 1992).

1.4.4 Caractéristiques et rôle de l'anse de Henlé ascendante mince

L'AHam est composée d'un épithélium simple et ne contient aucun canal aquaporine. Contrairement aux cellules du tubule proximal, qui contiennent plusieurs mitochondries nécessaires au transport actif de nombreux solutés, les cellules de l'AHam contiennent peu de mitochondries, car le transport est majoritairement passif. L'AHam permet la réabsorption passive du NaCl du tubule vers le milieu interstitiel de la médulla selon le gradient de concentration, ce qui dilue l'urine et concentre le milieu interstitiel. L'AHam et l'AH épaisse réabsorbe environ 25% du sodium filtré (Gougoux, A. 1999).

À la naissance, le rat ne possède pas d'AHam. Elles sont dérivées des anses de Henlé ascendantes épaisses immatures, par délétion apoptotique (Kim et coll., 1996). Les cellules épithéliales cuboïdes survivantes sont transformées en épithélium simple squameux au cours des deux premières semaines post-natale (Kim et coll., 1996). Aucune prolifération cellulaire n'a été observée dans les anses ascendantes

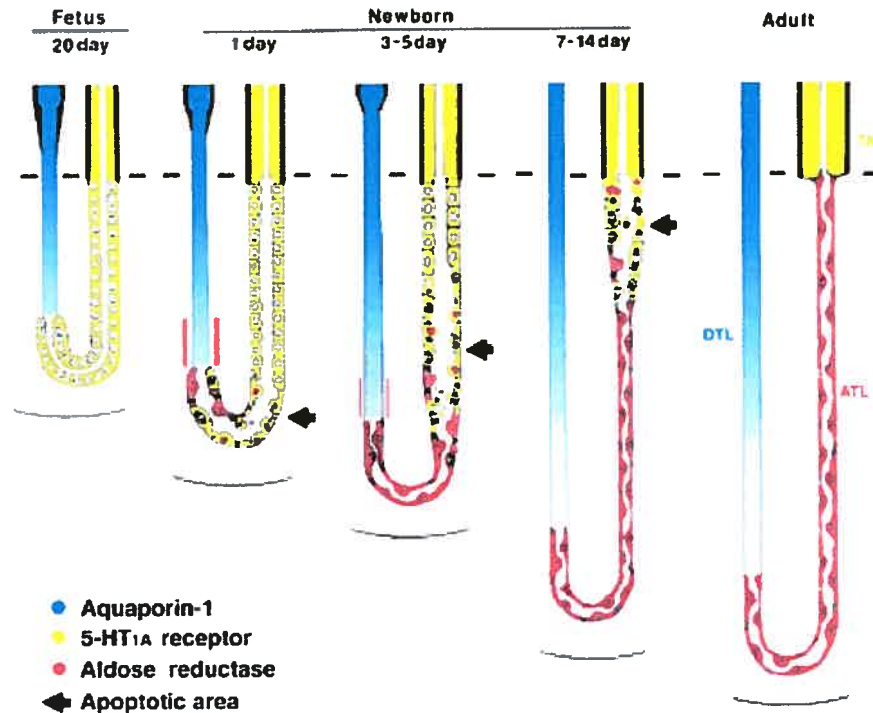
en transformation ou dans l'épithélium nouvellement formé d'AHam chez le rat (Cha et coll., 2001).

Nadasdy et coll. (1994) ont déterminé le taux de prolifération de plusieurs populations cellulaires rénales chez l'humain, en utilisant des anticorps dirigés contre des protéines nucléaires associées à la prolifération. Des index de prolifération de 0.22 à 0.24 pour le tubule proximal, 0.29 à 0.30 pour l'AH mince, 0.32 à 0.29 pour l'AH ascendante épaisse et 0.33 à 0.44 pour le tubule distal et les tubes collecteurs corticaux ont été rapportés (Nadasdy et coll., 1994). Ces résultats démontrent que les cellules d'AHam prolifèrent de façon comparable à celles de l'AH ascendante épaisse, et un système serait nécessaire pour maintenir cette prolifération à long terme. Les cellules de l'AH ascendante mince étant les seules cellules rénales à exprimer un niveau élevé de GHRH-R (Boisvert et coll., 2002), il peut être suggéré que ce système peptidergique serait impliqué dans leur prolifération.

Les cellules de l'AHam et des tubules collecteurs de la médulla interne expriment l'aldose réductase, une enzyme qui transforme le glucose en sorbitol, un osmolyte intracellulaire. L'aldose réductase est exprimée de façon croissante au cours du développement, parallèlement à l'augmentation de l'osmolalité du milieu interstitiel, suggérant un rôle dans la concentration de l'urine (Jung et coll., 2002) (Figure 7). Au cours du développement chez le rat, seules les cellules transformées en AHam contiennent l'aldose réductase, et non les cellules apoptotiques de l'AH ascendante épaisse, suggérant que l'aldose réductase puisse jouer un rôle dans la différenciation cellulaire et la protection des cellules de l'AHam de l'apoptose (Jung et coll., 2002).

L'ARNm des récepteurs V1a et V2 de la vasopressine a été mis en évidence dans l'AHam de rat par RT-PCR quantitatif (Firsov et coll., 1994). Takahashi et coll. ont mesuré l'effet de l'arginine vasopressine (AVP) sur le transport du Cl⁻ par les canaux CIC-K1 dans l'AHam de hamster (Takahashi et coll., 1995).

Figure 7 : Transformation des cellules de l'anse de Henlé ascendante au cours du développement.



Tiré de : Jung et coll., 2002, Expression of aldose reductase in developing rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 283(3): p. F489.

Un antagoniste des récepteurs V2 de la vasopressine a bloqué le transport du Cl^- , tandis qu'un antagoniste des récepteurs V1 est demeuré sans effet, démontrant que l'AVP augmente la réabsorption de Cl^- via les récepteurs V2 (Takahashi et coll., 1995). Cette réabsorption de Cl^- dilue l'urine dans l'AHam et rend le milieu interstitiel hypertonique, ce qui permet la réabsorption de l'eau au niveau du tubule collecteur, et la concentration de l'urine dans ce segment (Takahashi et coll., 1995).

De plus, la forskoline et le « dibutyryl cAMP », des activateurs de la voie adénylyl cyclase, ont augmenté le transport de Cl^- , tandis que le H89, un antagoniste de la PKA, a inhibé le transport de Cl^- , montrant l'importance de la voie adénylyl cyclase-AMPC-PKA dans l'AHam de hamster (Takahashi et coll., 1995). La structure de l'AHam est très semblable chez le rat et le hamster (Imai et coll., 1987).

1.4.5 Canal chlore CIC-K1

Des études immunocytochimiques ont permis de déterminer que le canal CIC-K1 est exclusivement localisé dans l'AHam de rat, le segment du néphron le plus perméable aux ions chlorure (Uchida et coll., 1995). Une restriction hydrique de cinq jours a augmenté d'environ quatre fois la quantité d'ARNm de CIC-K1 chez le rat (Uchida et coll., 1994), ce qui suggère l'importance de la réabsorption d'ions chlorure par l'AHam pour augmenter l'osmolarité du milieu interstitiel de la médulla, lors du mécanisme de contre-courant permettant la concentration de l'urine. Une souris déficiente pour le gène CIC-K1 produit cinq fois plus d'urine qu'une souris hétérozygote ou homozygote. De plus, les souris déficientes en CIC-K1 mises en restriction hydrique pour 24 h sont sévèrement déshydratées et léthargiques (Matsumura et coll., 1999). Ces résultats confirment que le CIC-K1 joue un rôle prédominant dans la concentration de l'urine. Kobayashi et coll. (2001) ont montré par immunocytochimie que CIC-K1 n'est pas présent au stade prénatal chez le rat, mais qu'il apparaît au cinquième jour et augmente au cours du développement, cette augmentation étant parallèle au développement de la capacité à concentrer l'urine.

Les niveaux d'ARNm du GHRH-R dans l'AH sont faibles chez des rats de 3 à 12 jours, mais augmentent significativement chez des rats de 30 à 70 jours (Boisvert et coll., 2002). Ces résultats suggèrent une corrélation avec l'augmentation de CIC-K1. Le GHRH-R pourrait donc jouer un rôle dans le transport d'ions, en augmentant l'expression de CIC-K1 à la membrane.

Afin de vérifier l'implication du GHRH-R dans le transport ionique, la régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R rénal a été étudiée lors de la modulation *in vivo* de l'équilibre ionique chez le rat (Boisvert et coll., 2001). Une diète riche en NaCl de 2, 7 et 14 jours diminue, augmente et n'a pas d'effet sur les niveaux d'ARNm du GHRH-R rénal, respectivement (Boisvert et coll., 2001). L'expression de l'ARNm du GHRH-R est régulée de façon différentielle selon la durée de la diète riche en sel. Ces résultats suggèrent l'implication du GHRH-R dans l'équilibre ionique (Boisvert et coll., 2001).

1.5 Justification de l'étude et objectifs

Le GHRH-R et le GHRH ont été mis en évidence dans plusieurs tissus extrahypophysaires, suggérant de nombreux rôles pour ce système peptidergique. La médulla rénale est toutefois le seul tissu extrahypophysaire où l'ARNm du GHRH-R est détectable sans amplification (Matsubara et coll., 1995 ; Boisvert et coll., 2002). Des études d'immunomarquage ont révélé une co-localisation du GHRH-R avec le canal chlore CIC-K1, exclusivement localisé dans les cellules de l'AHam (Boisvert et coll., 2001). Boulanger et coll. (2002) ont démontré que le GHRH-R avait la capacité de lier le GHRH de façon spécifique, saturable et réversible dans la médulla rénale de rat. Une étude effectuée avec un agoniste fluorescent du GHRH-R a montré une internalisation du ligand dépendante du temps et de la température, dans des cellules de l'AH semi-purifiées en culture (Boisvert et coll., 2002), et de l'AH mince en culture (Dubuisson et coll., 2003), chez le rat. La capacité du GHRH-R à lier son ligand et être internalisé suite à une stimulation au GHRH indique un récepteur fonctionnel. Boisvert et coll. (2002) ont montré que le GHRH peut induire une régulation négative de son récepteur rénal *in vitro* chez le rat. Une exposition de 4 h à

une concentration unique de rGHRH(1-29)NH₂, (1-100 nM) de cellules de l'AH semi-purifiées en culture primaire, diminue significativement les niveaux d'ARNm du GHRH-R dans cette population cellulaire (Boisvert et coll., 2002). La détection du GHRH-R dans un type cellulaire spécifique comme l'AHam suggère un rôle du GHRH-R associé à une fonction spécifique de ces cellules. Le GHRH-R pourrait jouer un rôle dans la concentration de l'urine ou être impliqué dans la prolifération et/ou différenciation cellulaire, tel que rapporté pour l'hypophyse antérieure.

Afin de caractériser le GHRH-R dans l'AHam et de mieux comprendre son rôle, plusieurs objectifs ont été proposés dans le cadre du présent projet. Le premier objectif de l'étude était de développer un modèle de culture cellulaire d'AH mince purifiées, et de le caractériser par immunocytochimie. Le second objectif a consisté en la mise au point d'un RT-PCR multiplex, afin de quantifier les niveaux d'ARNm du GHRH-R, suite à différentes interventions. Le troisième objectif était d'évaluer l'effet d'une exposition de 4, 20 et 64 h au GHRH sur les niveaux d'ARNm du GHRH de cellules d'AH mince purifiées, à l'aide de la technique de RT-PCR. Le quatrième objectif était de déterminer l'implication des voies de signalisation adénylyl cyclase-AMPC-PKA et MAPK dans la régulation de l'ARNm du GHRH-R suite à une exposition de 4 h au GHRH dans les cellules de l'AH mince purifiées. La régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R a été déterminée par RT-PCR post-exposition 4 h au rGHRH(1-29)NH₂ en absence et présence de 2', 5'-didéoxyadénosine, un inhibiteur de l'adénylyl cyclase, et de U0126, un inhibiteur des MAPK, dans les cellules de l'AH mince purifiées suite à leur mise en culture. La voie de signalisation intracellulaire AC-AMPC-PKA est la principale voie activée par le GHRH dans la cellule somatotrope (Frohman et coll., 1992). Dans les cellules hypophysaires, le GHRH active également la voie des MAPK, causant leur prolifération (Pombo et coll., 2000 ; Zeitler et coll., 2000), donc cette voie de signalisation peut également être suggérée dans l'AHam. Le cinquième objectif visait à étudier la régulation génique afin de mieux comprendre le rôle du système GHRH / GHRH-R dans l'AHam. Les modèles de stimulation retenus étaient une exposition unique au rGHRH(1-29)NH₂ (4 ou 16 h de culture) ou répétée (1 exposition / 24 h, culture de 64 h) des cellules de l'AHm.

L'étude de la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la spécialisation cellulaire (Ex : CIC-K1), a été réalisée sur biopuces (GeneChip® Rat Genome 230/2.0, Affimetrix).

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Le rGHRH(1-29)NH₂ utilisé (contenu peptidique : 73% ; pureté >97%), a été synthétisé dans le laboratoire de P Gaudreau (Gaudreau et coll., 1992). L'anticorps (Ac) polyclonal anti-GHRH-R reconnaissant la portion C-terminale (392-404) du GHRH-R utilisé a été caractérisé précédemment (Boulanger et coll., 1999). Le HEPES, le Na-HEPES, le NaCl, le KCl, le CaCl₂, le KH₂PO₄, le Na₂HPO₄, l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et le glucose provenaient de Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON). Le MgSO₄, le chloroforme et l'acide borique ont été obtenus de Fisher Scientific Ltd (Nepean, ON). La paraformaldéhyde et l'acétone ont été obtenus d'Anachemia Science (Montréal, QC). La L-glutamine provenait de Mediatech Cellgro (Hemton, VA). Les Ac de chèvre anti-IgGs de lapin couplés au fluorophore Alexa 488 ou Texas Red ont été obtenus de Molecular Probes (Eugene, OR), les IgGs normales de lapin, de Cappel Inc (Aurora, OH) et le DBA-FITC (*dolichos biblorus* agglutinin-fluorescéine isothiocyanate) de Sigma-Aldrich. Les Ac primaires anti-aquaporine et anti-CICK-1 de lapin provenaient d'Alomone Labs (Munich, DL). Le pyruvate de sodium, le collagène et les Ac anti-BSL-ont été obtenus de Sigma-Aldrich.

La DNase et la trousse « Titan One Tube RT-PCR System » provenaient de Roche Diagnostics Corporation (Mississauga, ON). La pénicilline/streptomycine, l'amphotéricine, la collagénase type II et le sérum foetal bovin (FBS), le milieu de culture DMEM /F-12, le TRIzol, le Tris, l'inhibiteur de RNase, l'échelle d'ADN de 100 pb provenaient de Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON). L'Accudenz provenait de Accurate (Westbury, NY). L'albumine sérique bovine (BSA), le Triton X-100, l'hyaluronidase, le sucrose, l'EDTA, le bleu de trypan, le réactif de Hoescht, la 2',5'-didéoxyadénosine et le U0126 ont été obtenus de Sigma-Aldrich. L'acrylamide a été obtenue de Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON). Les pétris « cell+ » ont été obtenus de Sarstedt (St-Léonard, QC). Les lamelles utilisées provenaient de Fisher Scientific (Nepean, ON).

Le dCTP marqué au $\alpha^{32}\text{P}$, l'ATP marqué au $\gamma^{32}\text{P}$ et la « T4 poly-nucleotide kinase » provenaient d'Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC). Les colonnes

Microcon provenaient de Millipore (Nepean, ON). Les films « Kodak Biomax Ms-1 » provenaient d'Eastman Kodak Co. (Rochester, NY). La puce RNA 6000 Nano LabChip provenait de Agilent Technologies Canada Inc (Mississauga, ON).

2.2 Animaux

Des rats mâles Sprague Dawley de 2 mois ont été utilisés (Charles River Canada, St-Constant, QC). Ils ont été hébergés à l'animalerie du Centre de Recherche du CHUM, à l'hôpital Notre-Dame, à température ambiante (TA), soumis à des cycles de lumière de 12 h (ouverture à 07:00 h) et avaient un libre accès à la nourriture (2018 : « *tecklad global* » 18% « *protein rodent diet* ») et à l'eau. Les animaux ont été sacrifiés par décapitation rapide entre 09:30 et 11:30 h. Le protocole de recherche a été approuvé par le comité institutionnel de protection des animaux (CIPA-CRCHUM), en conformité avec la réglementation du Conseil canadien de protection des animaux.

2.3 Prélèvement des tissus

Les reins ont été prélevés et disséqués sur glace sur un verre de montre, en conditions stériles. La médulla interne, définie comme la partie centrale rosée d'une coupe longitudinale, a été prélevée. Pour les expériences d'immunocytochimie, une condition, incluant le non spécifique, pendant trois périodes de culture, nécessitait le prélèvement de dix médullas rénales. Pour les études de régulation de l'expression du GHRH-R par le rGHRH(1-29)NH₂, et de régulation génique suite à une exposition au rGHRH(1-29)NH₂ sur biopuces d'ADN, une condition et son témoin, pour une période de culture, nécessitait le prélèvement de 12 médullas rénales. Toutes les étapes subséquentes ont été effectuées stérilement sous hotte à flux. Les médullas ont été émincées à l'aide d'un scalpel, puis lavées dans du tampon HEPES-Ringer, (16 mM HEPES, 16 mM Na-HEPES, 118 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.8 mM MgSO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ et 14 mM glucose, pH 7.4) froid et pré-oxygéné 30 min, contenant une concentration 5X d'antibiotiques (ABT) (pénicilline/streptomycine à 250 U/mL et amphotéricine à 0.5%).

2.4 Dispersion enzymatique et purification des cellules d'anse de Henlé mince

La digestion a été effectuée à 37°C durant 75 min, en présence de tampon HEPES-Ringer-5X ABT, contenant 0.2% de collagénase type II et 0.2% d'hyaluronidase. Après 30 min de digestion, 0.001% de DNase a été ajoutée. Les agrégats cellulaires ont été dissociés par aspiration douce aux 30 min, à l'aide d'une pipette de plastique à embout poli. La suspension cellulaire a été centrifugée deux fois à 28g (2 min à 4°C) après resuspension, et les sumageants combinés et centrifugés à 150g (10 min à 4°C). Les culots ont été lavés trois fois avec le tampon HEPES-Ringer-5X ABT (centrifugation à 1000g, 10 min à 4°C) et resuspendus dans 0.5 mL de tampon HEPES-Ringer-5X ABT. La suspension cellulaire a été déposée sur gradient d'Accudenz et centrifugée à 1500g (45 min, 16°C) afin d'isoler les cellules de la partie mince ascendante et descendante de l'AH. La fraction supérieure, contenant les cellules de l'AH mince (Boisvert et coll., 2002, Grupp et coll., 1998), a été prélevée. Les cellules ont été lavées des traces d'Accudenz en ajoutant trois volumes de tampon Hepes-Ringer-5X ABT (centrifugation à 430g, 10 min, 4°C). Les cellules ont été lavées une fois dans du milieu de culture DMEM /F-12 -5X ABT et une fois avec du milieu-1X ABT (150g, 10 min, 4°C).

2.5 Culture primaire de cellules d'anse de Henlé mince purifiées

La viabilité cellulaire avant la mise en culture était de $91 \pm 1\%$, tel que déterminé avec le bleu de trypan. Pour les études d'immunocytochimie, les cellules ont été resuspendues à une concentration de 0.8×10^6 cellules/mL. Les cellules ont été mises en culture dans le milieu-1X ABT contenant 10% de FBS, dans des plaques à 6 puits stériles (2 mL/puit), contenant une lamelle de 22 mm de diamètre recouverte de collagène ($\approx 20 \mu\text{g}$ de collagène/cm²) et incubées à 37°C pendant 16, 40 ou 64h (atmosphère : 95% air / 5% CO₂).

Pour les études de régulation de l'expression du GHRH-R par le rGHRH(1-29)NH₂, et de régulation génique suite à une exposition au rGHRH(1-29)NH₂ sur

biopuces d'ADN, la concentration cellulaire a été déterminée et les cellules ont été re-suspendues à une concentration de 1×10^6 cellules/mL. Les cellules mises en culture durant une période de 4 h étaient re-suspendues dans du milieu DMEM-F12 1X ABT contenant 0.1% de BSA. Les cellules mises en culture 16, 20 ou 64 h étaient re-suspendues dans du milieu DMEM-F12 1X ABT contenant 10% de FBS. L'utilisation de pétris Cell+, ayant une surface chargée positivement tel que les groupes fonctionnels aminés (α et ϵ) des protéines, a permis une meilleure adhésion des cellules AHm. Les cellules ont été mises en culture dans des pétris Cell+ de 21 cm^2 (5 mL/puit) et dans des plaques à 12 puits stériles (1 mL/puit) contenant une lamelle de 15 mm de diamètre pour les études de viabilité. Les cellules ont été incubées à 37°C durant 4, 16, 20 et 64 h (atmosphère : 95% air / 5% CO_2). Les milieux ont été changés à chaque 24 h pour les cellules en culture 64 h.

2.6 Caractérisation immunocytochimique des cellules d'anse de Henlé mince purifiées, en culture primaire

Les cellules marquées avec les Ac anti-BSL-1, anti-CICK-1 et anti-aquaporine ont été fixées 15 min à -20°C dans une solution 1:1 (v:v) d'acétone/méthanol, refroidie 30 min à -20°C , puis lavées deux fois au PBS (274 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 20.3 mM Na_2HPO_4 et 3.5 mM KH_2PO_4) (10 min, TA). Les cellules marquées au DBA-FITC (*fluorescein isothiocyanate*) ont été fixées et perméabilisées par incubation dans l'éthanol 70% (1 min, TA). Les cellules marquées avec l'Ac anti-GHRH-R ont été fixées à la paraformaldéhyde 4%, lavées (2X dans le PBS, 10 min, TA), perméabilisées au Triton 100 (0.2%/PBS) et relavées (4X dans le PBS, 5 min, TA). Les lames ont été bloquées 30 min dans le PBS contenant 5% BSA et lavées (2X dans le PBS, 5 min, TA).

Des cellules ont été incubées avec l'Ac anti-BSL-1 (déjà couplé au FITC) (30 ug BSL-1/1mL de PBS-BSA 1%, 30 min, TA). D'autres cellules ont été incubées avec le DBA-FITC (dilution 1:100 dans PBS-BSA 1%, 10 min, TA). Le DBA-FITC a été utilisé afin de déterminer la proportion de cellules résiduelles de tube collecteur dans la préparation cellulaire d'AHm purifiée. D'autres cellules ont été incubées

avec l'Ac primaire anti-GHRH-R (dilution 1:400 dans le PBS-BSA 1%; NS, dilution IgGs normale de lapin 1:800 dans PBS-BSA 1%, (60 min, TA), anti-aquaporine (dilution 1:2000 dans le PBS-BSA 1%; NS, dilution IgGs normale de lapin 1:500 dans PBS-BSA 1%, 60 min, 37°C) ou anti-CICK-1 (dilution 1:250 dans le PBS-BSA 1%; NS, dilution IgGs normales de lapin 1:500 dans PBS-BSA 1%, 60 min, TA). Les cellules ont été lavées dans le PBS (2X, 10 min, TA) et incubées l'Ac secondaire Alexa 488 (dilution 1/7500, dans le tampon PBS-BSA 1%) ou Texas-Red (dilution 1/10000, dans le tampon PBS-BSA 1%) 60 min à TA et lavées dans le PBS (2X, 10 min, TA). Le degré de fluorescence non spécifique (NS) a été évalué en substituant le premier Ac par 30 ug d'IgGs normales de lapin dans 1mL de PBS-BSA 1%. Toutes les étapes du protocole impliquant la fluorescence ont été effectuées dans l'obscurité. Les cellules ont été observées par microscopie à fluorescence, en utilisant les filtres Texas-Red (485/520 nm) et fluorescéine (577/590 nm). Les résultats ont été obtenus à partir de 4 champs par lame, sous-divisés en 5 champs choisis aléatoirement, pour obtenir en moyenne 20 cellules par champ. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Métamorph 4.5 (Universal Imaging Corporation, Canberra Packard Canada LTD, Mississauga, ON), avec un microscope Nikon Éclipse TE600 (objectif X20).

2.7 Étude de stimulation par le rGHRH(1-29)NH₂.

Afin de déterminer l'effet régulateur du GHRH sur son récepteur rénal, les cellules de l'AHm purifiées ont été exposées en présence de 10 nM de rGHRH(1-29)NH₂, immédiatement après la mise en culture, pour une période de 4 h. Une exposition de 4 h avec 1, 10 et 100nM de rGHRH(1-29), dans les cellules de l'AH semi-purifiées, a régulé à la baisse de façon similaire les niveaux d'ARNm du GHRH-R (Boisvert et coll., 2002), donc la concentration moyenne de 10 nM a été choisie. Le GHRH a été dilué dans du milieu DMEM-F12 1X ABT, contenant 0.1% de BSA. Les cellules témoins ont été incubées en présence du même volume de milieu de solubilisation du GHRH.

2.8 Étude d'inhibition de la stimulation au rGHRH(1-29)NH₂ par la 2', 5'-didéoxyadénosine ou le U0126.

Afin d'évaluer l'implication des voies de signalisation AC et MAPK dans la régulation du GHRH-R par le GHRH, les cellules d'AHm purifiées ont été exposées au rGHRH(1-29)NH₂ (10 nM) et mises en présence de 100 µM de 2', 5'-didéoxyadénosine, un inhibiteur de l'adénylyl cyclase, ou de 15 µM de U-0126, un inhibiteur spécifique de MEK1/MEK2 (Favata et coll., 1998), pour une période de 4 h. Ces conditions ont été comparées aux cellules témoins, qui ont été mises en présence du même volume de solution servant à solubiliser les substances évaluées, et ont été cultivées dans le même milieu. La concentration de 2', 5'-didéoxyadénosine (100 µM) a été utilisée par Bertuccio et coll. (1995) dans une étude de production d'AMPc dans les cellules d'AH ascendante épaisse chez le rat, suite à une insuffisance rénale chronique. La concentration de U0126 (15 µM) a été utilisée par Watts et coll. (2002), dans une étude du rôle des MAPK dans l'inhibition de l'échange Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ et de l'absorption de HCO par le « *nerve growth factor* », dans les cellules d'AH ascendante épaisse chez le rat. Les inhibiteurs ont d'abord été dilués dans le DMSO, à 100 mM pour la 2', 5'-didéoxyadénosine et à 15 mM pour le U0126, puis ils ont été dilués dans du milieu DMEM F12 1X ABT, contenant 0.1% de BSA, afin d'obtenir une concentration de DMSO égale à 0.1% dans le milieu final, laquelle n'a pas affecté la viabilité cellulaire.

2.9 Développement d'un essai de RT-PCR multiplex pour le GHRH-R.

L'ARN total des cellules d'AHm purifiées a été isolé en une étape à l'aide du TRIzol, immédiatement après chaque période de culture. Les niveaux d'ARNm du GHRH-R ont été quantifiés par RT-PCR en une étape, à l'aide de la trousse « Titan One Tube RT-PCR System ». Le RT-PCR utilisé pour les cellules de l'AHm a été adapté d'un protocole mis au point dans le laboratoire de P. Gaudreau, à partir d'un protocole utilisé pour mesurer les niveaux d'ARNm du GHRH-R dans des cellules hypophysaires en culture (Aleppo et coll., 1997).

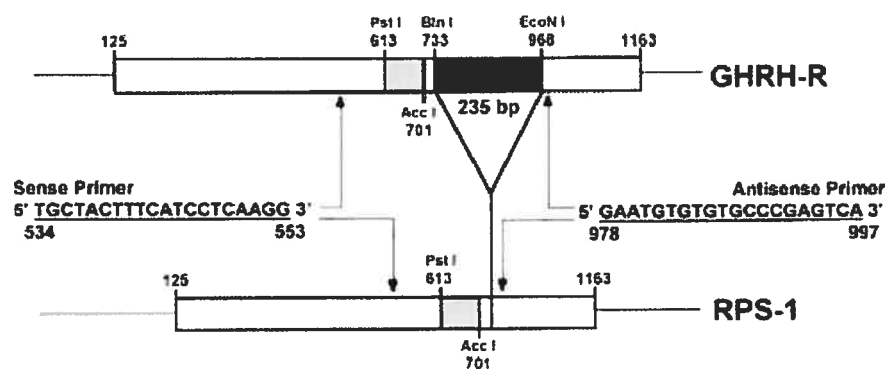
La réaction du RT-PCR a été effectuée dans un volume final de 25 µL, contenant 1.5 µL de mélange maître. Les réactifs ont été ajoutés à une

concentration finale de : 1X de tampon RT-PCR, 5 mM de DTT, 1.5 mM MgCl₂, 12 U d'inhibiteur de RNase, 0.4 mM dNTPs et 0.5 μCi [³²P] dCTP, dilué dans de l'eau picopure stérile. Les amorces de GHRH-R de rat sens (5'TGCTACTTTTCATCCTCAAGG3') et anti-sens (5'ACTGAGCCCGTGTGTGTAAG3') ont été utilisées à une quantité de 20 pmol. L'amplification a été effectuée à l'aide de l'appareil 'Biometra TGradient PCR' (Montreal Biotech Inc, Kirkland, QC). Le contrôle externe, rps-1 (Fig. 8), a permis de compenser pour la variabilité expérimentale, et le contrôle interne, GAPDH, a permis de corriger la variation de la quantité d'ARN de départ.

Différentes mises au point ont été effectuées en fonction de la durée des périodes de culture. Dans le cas des cultures cellulaires de 4 h (études de régulation du GHRH-R), 20 cycles d'amplification ont été utilisés, qui consistaient en 30 min à 50°C, 1 cycle de 3 min de dénaturation à 94°C, 70 sec à la température d'hybridation (59.0°C), 1 min à la température d'élongation (72°C), 18 cycles de 1 min à 94 °C, 70 sec à 59.0°C, 1 min 72°C, suivis d'un cycle final de 1 min à 94 °C, 70 sec à 59.0°C, 5 min d'élongation à 72°C. Une quantité de 0.13x10⁷ molécules de rps-1 a été ajoutée pour 80 ng d'ARN total ainsi que 250 pmol d'amorces GAPDH de rat sens (5'AGGGCTGCCTTCTCTTGAC3') et anti-sens (5'CAGCATCAAAGGTGGAGGAAT3'). Dans le cas des cultures cellulaires mises en culture 20 ou 64 h, 30 cycles d'amplification ont été utilisés, qui consistaient en 10 cycles ayant une température d'hybridation de 62°C, suivis de 20 cycles ayant une température d'hybridation de 59°C. Une quantité de 6.5x10⁴ molécules de rps-1 a été ajoutée pour 40 ng d'ARN total, et 30 pmol d'amorces GAPDH de rat sens et anti-sens.

Les produits totaux de RT-PCR ont été filtrés sur colonnes Microcon et analysés par électrophorèse sur gel d'acrylamide 4.5%, avec une échelle d'ADN de 100 pb. Le poids moléculaire du GHRH-R est de 463pb. Le TBE 5X (450 mM Tris, 445 mM acide borique et 10 mM EDTA à pH 8.0) a été utilisé comme tampon de migration.

Figure 8 : Représentation schématique du GHRH-R et de l'ADNc du rps-1 de rat.



Tiré de : Aleppo et coll., 1997, Homologous down-regulation of growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 138 :1058-1065

Le rps-1 est utilisé comme contrôle d'efficacité de la réaction de RT-PCR. La localisation des sondes sens et anti-sens est indiquée par les flèches.

Le poids moléculaire a été marqué à l'ATP $\gamma^{32}\text{P}$ par la « T4 poly-nucléotide kinase », selon les instructions du manufacturier (Invitrogen Life Technologies). L'autoradiographie a été effectuée à -80°C ou à TA, en utilisant des films Kodak Biomax Ms-1 en présence d'un écran intensificateur. Les niveaux d'ARNm de GAPDH, rps-1 et GHRH-R ont été quantifiés par densitométrie à l'aide d'un système d'analyse d'image IS1000 (Alpha Innotech Corp./ Canberra Packard Canada).

2.10 Étude de régulation génique par le rGHRH(1-29)NH₂

Afin d'identifier les gènes activés par le GHRH dans les cellules d'AH minces purifiées, une étude de régulation génique a été effectuée suite à une exposition à 10 nM de rGHRH(1-29)NH₂. Trois conditions ont été évaluées : une exposition suivie d'une période de culture de 4 h, une exposition suivie d'une période de culture de 16 h et finalement, une exposition suivie d'une période de culture de 64 h au cours de laquelle 10 nM rGHRH(1-29)NH₂ est ajouté aux temps 24 h et 48 h. Des cellules témoins ont été cultivées en présence d'un volume identique de milieu de solubilisation du GHRH. L'ARN total a été isolé avec le TRIzol et les culots lavés à l'éthanol 75%. L'ARN total est reconstitué dans l'eau sans RNase (Ambion, Austin, TX). L'intégrité de l'ARN a été analysé à l'aide de la puce à ARN 6000 Nano LabChip et d'un « Bioanalyser » (Agilent Technologies Canada Inc, Mississauga, ON) qui permet la séparation de l'ARN total sur la base de la taille moléculaire. Le ratio des ARN ribosomiaux 18S et 28S était toujours égal ou supérieur à un 1.9. Cette qualité d'ARN constitue un pré-requis à l'analyse sur biopuce Affimetrix. L'ARN total provenant de trois expériences indépendantes de culture (témoin et GHRH) a été regroupé afin d'en avoir une quantité suffisante à l'expérience de régulation génique sur biopuce.

Pour chaque condition de traitement et de période de culture, la régulation des niveaux d'ARN total a été analysé, à l'aide de la puce Affymetrix GeneChip® Rat Genome 230 2.0, qui permet l'analyse de 28 000 gènes. La transcription inverse a été effectuée à partir de l'ARN total. Une quantité de 5 μg d'ARN total a

été utilisée pour la synthèse de l'ADNc. L'ADNc a été subséquemment transcrit *in vitro* en ARNc marqué à la biotine et fragmenté, selon les protocoles standardisés d'Affimetrix. Les fragments d'ARNc marqués ont été hybridés à la puce de verre qui contient de 11-20 paires de sondes oligonucléotidiques anti-sens différentes, de 25 mer, pour chaque gène, distribuées au hasard sur la puce. Les différentes paires de sondes consistent en une première sonde identique à la région ciblée d'un gène (« Perfect Match ») et une deuxième, comportant un nucléotide différent en position 13 (« Miss Match »). Pour chaque gène, les ensembles de sondes sont classifiés en 4 catégories, allant du plus au moins spécifique : 1) les sondes reconnaissant une cible anti-sens spécifique d'un gène (code : `_at`), 2) les sondes reconnaissant plusieurs transcrits alternatifs d'un gène (code : `_a_at`), 3) les sondes qui partagent des séquences communes avec des transcrits de différents gènes (code : `_s_at`), et 4) les sondes où il n'a pas été possible de sélectionner des sondes identiques parmi plusieurs transcrits et où les règles de sélection pour éviter l'hybridation croisée n'ont pas été respectées (code : `_x_at`).

Suite à l'hybridation des fragments d'ARNc, la visualisation est effectuée avec la streptavidine-phycoérythrine. Les complexes fluorescents sont excités à 488 nm et les émissions enregistrés à 570 nm. Elles sont proportionnelles à la liaison des fragments d'ARNc aux sondes de la biopuce. Les régions du gène du GHRH-R amplifiées par les différentes sondes sont spécifiées à la Figure 14.

À partir de l'ARN total fourni au Centre d'innovation Génome Québec et Université de l'Université McGill, les données expérimentales brutes générées à partir des biopuces ont été analysées à l'aide de la méthode RMA (« Robust Multichip Average »). Cette approche mathématique est fortement recommandée par Affimetrix et Génome Québec, puisqu'elle permet de générer une fenêtre étroite de valeurs d'intensités avec des variances plus petites et plus uniformes et d'éliminer la grande majorité des faux positifs. Cette méthode normalise les données par la soustraction globale de valeur de bruit de fond, en prenant en compte plusieurs éléments de standardisation. La normalisation quantitative des intensités de signaux se situant au dessus du bruit de fond permet la génération d'une moyenne des intensités des sondes, reflétant le niveau d'expression d'un

gène. Les graphiques d'analyse des valeurs de composantes principales (PCA) et de nuages de points résultant des analyses multivariées (MVA) ont permis de valider la qualité des résultats et ont aidé à leur interprétation macroscopique. Les PCA informe sur le degré de similarité entre les échantillons analyses (témoin versus GHRH d'une part et changement en fonction du temps de culture), en montrant d'où provient la plus grande source de variation des données entre les biopuces. Les graphiques de nuages de points MVA ont permis de comparer la variation des profils d'expression des gènes entre les différentes biopuces, ce qui permet par exemple, de déceler les problèmes techniques. Les intensités normalisées obtenues de Génome Québec ont été transformées sous forme de log en base 2 ($0.379 = \log_2(1.3)$), en utilisant le logiciel Excel. La valeur moyenne des intensités des sondes pour chaque gène des puces « témoin » a été soustraite de celle des puces « traitement au GHRH », permettant d'obtenir les valeurs d'expression différentielles reliées au traitement, à chaque période de culture. Les gènes exprimés de façon différentielle, dont l'intensité était ≥ 0.379 , soit ≥ 1.3 fois, ont été analysés à la section Résultats. Cet écart de 1.3 a été choisi, puisque des différences significatives ont été observées par RPA, suite à une variation de 1.3 fois de l'expression du GHRH-R rénal (Boisvert et coll., 2001). Les gènes affectés par le traitement ont été classifiés par grande familles.

2.11 Analyses statistiques

Pour les études d'immunocytochimie, les résultats ont été exprimés comme étant la moyenne \pm SEM d'un minimum de 3 expériences indépendantes. Les comparaisons entre les intensités de marquage et les pourcentages de viabilité ont été effectuées par ANOVA, suivi d'un test de Tukey ou par test de t de Student, à l'aide du logiciel PRISM. Pour les études de régulation par le rGHRH(1-29)NH₂, les résultats ont été exprimés comme étant la moyenne \pm SEM d'un minimum de 3 expériences indépendantes. Les niveaux d'ARNm du GHRH-R ont été normalisés avec rps-1 et GAPDH. Les données ont été comparées à l'aide d'un test de t de Student à une voie pour la stimulation au rGHRH(1-29)NH₂ seul, et à deux voies pour la stimulation en présence de 2', 5'-didéoxyadénosine ou d'U0126. La signification statistique des différences a été établie à $P < 0.05$.

3. RÉSULTATS

3.1 Caractérisation immunocytochimique des cellules purifiées d'anse de Henlé mince en fonction de la période de culture

Une culture primaire de cellules d'AH mince (AHm) purifiées a été développée et caractérisée afin de permettre l'étude du GHRH-R dans cette population cellulaire. Lors de la mise en culture, les cellules étaient de forme arrondie. Cependant, après 16 h de culture, des cellules fusiformes plates étaient visibles, et leur nombre augmentait avec la période de culture, ce qui était accompagné d'une baisse progressive du nombre de cellules rondes. La viabilité cellulaire totale n'était pas significativement différente en fonction de la durée de culture : $93 \pm 1\%$ après 16 h, $88 \pm 1\%$ après 40 h et $86 \pm 3\%$ après 64 h ($P > 0.05$). Cependant, celle des cellules rondes était significativement différente selon la période de culture ($87 \pm 1\%$ après 16 h, $76 \pm 5\%$ après 40 h et $69 \pm 6\%$ après 64 h), ($P < 0.05$).

Cette culture a été caractérisée par immunocytochimie afin de déterminer sa composition en fonction du temps. Dans la médulla rénale, le marqueur BSL-1 est présent dans les cellules endothéliales et interstitielles ainsi que dans des fibroblastes du cortex (Grupp et coll., 1997). Une caractérisation immunocytochimique de la culture primaire purifiée d'AHm, à l'aide d'un Ac anti-BSL-1, a mis en évidence la présence de $7 \pm 3\%$ de cellules BSL-1-positives après 16 h de culture (Figure 9Aa), $8 \pm 3\%$ après 40 h et $11 \pm 2\%$ après 64 h ($P > 0.05$) (Tableau 1). Au cours des premières 40 h de culture, BSL-1 était spécifiquement associé aux cellules rondes (Figure 9A a), mais à 64 h de culture, des cellules fusiformes plates devenaient positives. Le DBA-FITC marque spécifiquement les cellules du tubule collecteur (Grupp et coll., 1997). L'incubation des cellules d'AHm purifiées avec le DBA-FITC a démontré que la préparation contient $8 \pm 2\%$ de cellules du tubule collecteur après 16 h (Figure 9B a) et $6 \pm 1\%$ après 64 h de culture ($P > 0.05$) (Tableau 1). Les cellules marquées étaient plates mais plus arrondies que les cellules fusiformes. L'anticorps anti-aquaporine, détectant les cellules de l'AHm descendante, marquait spécifiquement $49 \pm 9\%$ des cellules rondes après 16 h de culture (Figure 9C a et b), $49 \pm 3\%$ après 40 h, et $46 \pm 5\%$ après 64 h (Tableau 1).

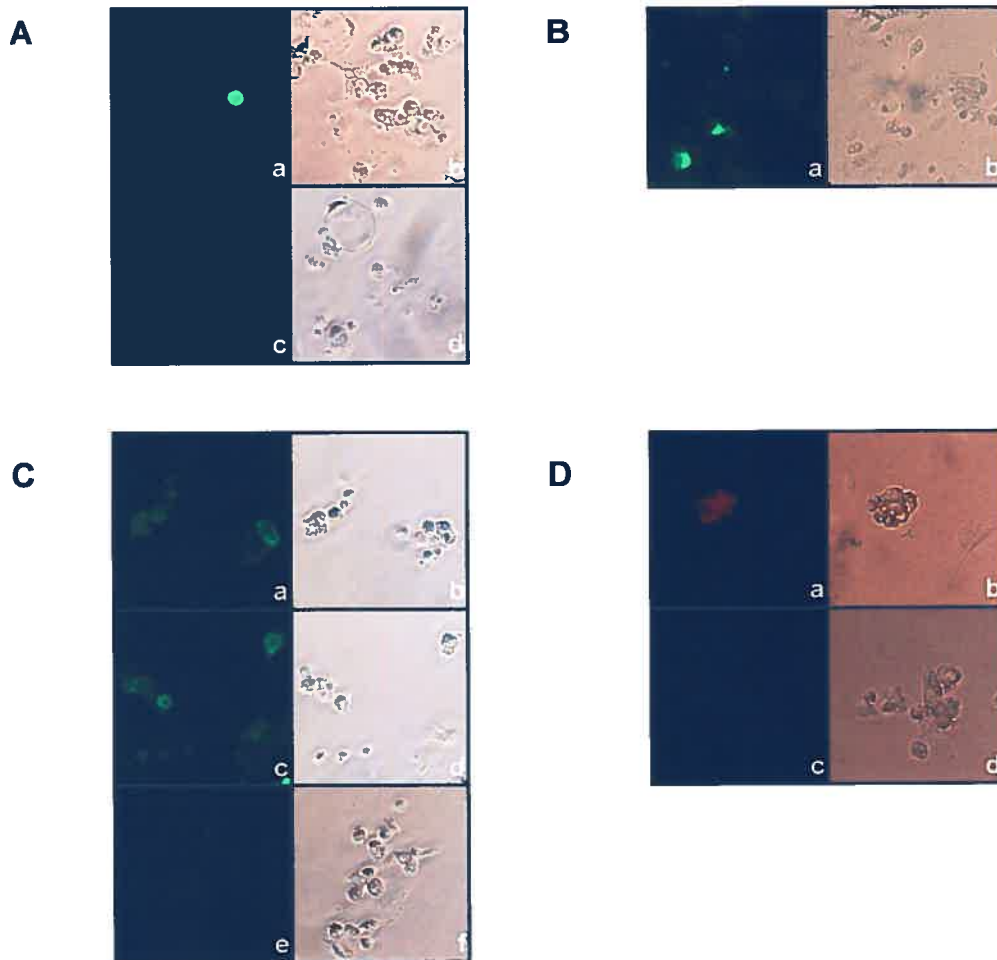
L'anticorps anti-CLC-K1, détectant les cellules de l'AH ascendante mince, marquait spécifiquement $50 \pm 1\%$ des cellules rondes après 16 h (Figure 9C c et d), $50 \pm 3\%$ après 40 h et $48 \pm 5\%$ après 64 h, ainsi que quelques cellules fusiformes après 48 h de mise en culture (Tableau 1). Dans le cas des marquages d'aquaporine et de CLC-K1, le nombre de cellules marquées ne variait pas de façon significative entre 16-64 h de culture ($P > 0.05$). L'Ac anti-GHRH-R se liait de façon spécifique au GHRH-R et marquait un nombre modéré de cellules rondes après 16 h, avec une intensité modérée (Figure 9D). La substitution de l'Ac anti-BSL-1, anti-CLC-K1, anti-aquaporine et anti-GHRH-R par des IgGs normales de lapin a montré une fluorescence de très faible à nulle (Figure 9A c, C e et D c).

3.2 Développement d'un essai de RT-PCR multiplex dans les cellules de l'AHm pour l'ARNm du GHRH-R

La technique de RT-PCR quantitatif multiplex, jugée comme étant la plus sensible pour quantifier le niveau d'expression génique, a été choisie afin de mesurer les niveaux d'ARNm du GHRH-R. Un ARNc homologue (*rps-1*), amplifié par les oligonucléotides du GHRH-R, a été ajouté dans chaque échantillon pour contrôler la variabilité expérimentale, afin de permettre une comparaison entre les différents échantillons. De plus, un contrôle interne, le GAPDH, présent dans l'ARN total utilisé, a permis de corriger la variation de la quantité d'ARN total provenant de chaque échantillon.

Le schéma expérimental de départ consistait à mettre les cellules d'AHm en culture 16 h et à les exposer au GHRH pour une durée de 4 h, puis à extraire l'ARN total et procéder au RT-PCR. Sur la base d'une étude préliminaire utilisant l'ARN total de l'hypophyse antérieure, différentes concentrations d'ARN total de l'AHm ont été évaluées (20, 80, 100, 120, 140, 160, 400 ng), mais aucun signal n'a été obtenu. Le nombre de cycles d'amplification a été augmenté de 20 à 25, et un faible signal a été obtenu pour le GHRH-R. Un signal bien visible a été obtenu après 30 cycles d'amplification, mais le bruit de fond était proportionnel au nombre de cycles.

Figure 9 : Caractérisation des cellules de l'AHm purifiées en culture à l'aide de l'Ac anti-BSL-1, du marqueur DBA-FITC, de l'Ac anti-aquaporine-1, de l'Ac anti-CIC-K1 et de l'Ac anti-GHRH-R.



La caractérisation immunocytochimique a été effectuée à l'aide de l'Ac anti-BSL-1 (A a), un marqueur des cellules endothéliales et interstitielles ainsi que des fibroblastes du cortex, du marqueur DBA-FITC (B a), spécifique aux cellules du tubule collecteur, l'Ac anti-aquaporine-1 (C a), marqueur de l'AH descendante mince, l'Ac anti-CIC-K1 (C c), marqueur de l'AH ascendante mince, et l'Ac anti-GHRH-R (D a). Le contraste de phase est présenté en b, d et f, pour chaque marquage. La spécificité du marquage a été évaluée en remplaçant l'Ac primaire par des IgG normales (A c, C e et D c). Ces images sont représentatives de deux expériences indépendantes.

Tableau 1 : Caractérisation immunocytochimique des cellules d'AHm purifiées en fonction de la période de culture.

PÉRIODE DE CULTURE	AC ANTI-BSL-1 ^a (%)	DBA-FITC ^b (%)	AC ANTI-AQUAPORINE-1 ^c (%)	AC ANTI-CLC-K1 ^d (%)
16 h	7 ± 3	8 ± 2	49 ± 9	50 ± 1
40 h	8 ± 3	---	49 ± 3	50 ± 3
64 h	11 ± 2	6 ± 1	46 ± 5	48 ± 5

^a Marqueur des cellules endothéliales et interstitielles ainsi que des fibroblastes du cortex

^b Marqueur des cellules du tubule collecteur

^c Marqueur de l'AH descendante mince

^d Marqueur de l'AH ascendante mince

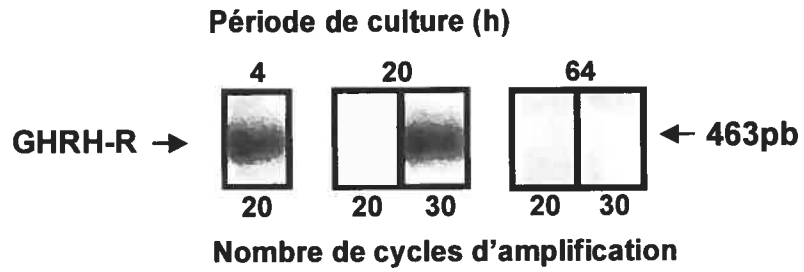
Afin d'améliorer la spécificité et de diminuer le bruit de fond, la température d'hybridation a été augmentée de 59°C à 60, 61, 62 ou 64°C. Les conditions optimales utilisées pour observer un signal net étaient 10 cycles à 62°C, suivis de 20 cycles à 59°C, et l'utilisation de 40 ng d'ARN total. Les oligonucléotides de GAPDH ont été diminués de 300 pmol à 150, 50 ou 30 pmol, à cause de la grande amplification obtenue après 30 cycles. La concentration de rps-1 a été fixée à 6.5×10^4 molécules. Cette mise au point, en utilisant 30 cycles d'amplification, a permis d'obtenir un signal net pour le GHRH-R après 20 h de culture (Figure 10). Cependant, la linéarité du signal dans ces conditions nécessitant une importante mise au point, des cellules exposées 4 h immédiatement après leur mise en culture ont été utilisées, car elles ont montré un signal net après 20 cycles d'amplification. Différentes concentrations d'ARN total ont été testées (20, 40, 80, 160 ng) et la concentration optimale pour l'obtention d'un signal de bonne intensité a été fixée à 80 ng. Une relation linéaire a été observée pour le GHRH-R. Afin d'obtenir une relation linéaire pour le GAPDH, les amorces pour amplifier l'ARN de GAPDH dans ces conditions ont été diminuées à 250 pmol (Figure 11).

Une diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R a été observée en fonction de la période de culture cellulaire (Figure 10). Pour toutes les expériences de RT-PCR subséquentes, les cellules ont été mises en culture 4 h suite à une exposition au GHRH, et 80 ng d'ARN total, 20 cycles d'amplification avec une température d'hybridation de 59°C, 20 pmol d'oligonucléotides de GHRH-R, 250 pmol d'oligonucléotides de GAPDH et 0.13×10^7 molécules de rps-1 ont été utilisés.

3.3 Étude de la modulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R par le rGHRH(1-29)NH₂

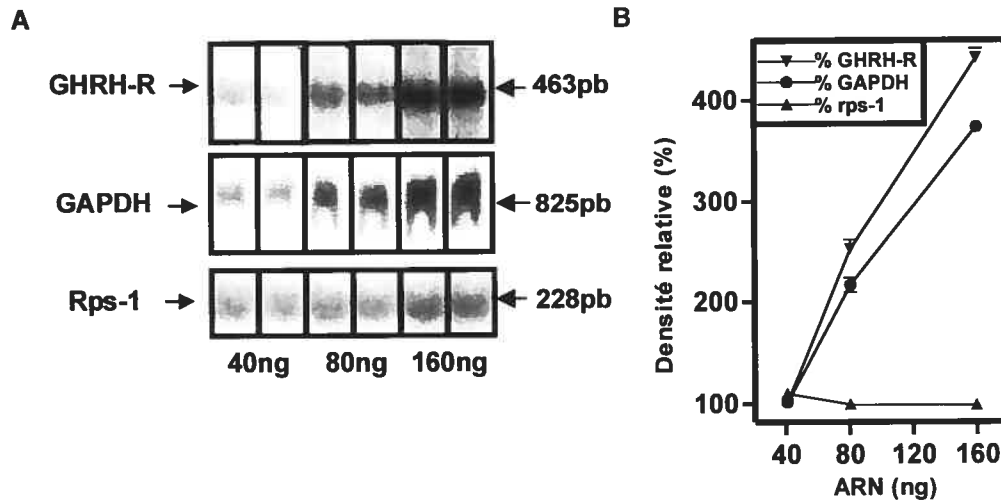
Afin de déterminer l'effet du GHRH sur l'expression de son récepteur, les cellules d'AHm purifiées en culture ont été traitées avec 10 nM de rGHRH(1-29)NH₂ pendant 4 h dans du milieu 1X ABT contenant 0.1% de BSA (Figure 12 A et B gauche).

Figure 10 : Représentation autoradiographique d'un RT-PCR montrant le fragment amplifié d'ARN du GHRH-R dans les cellules d'AH mince suite à des périodes de culture de 4, 20 et 64 h, en fonction du nombre de cycles d'amplification.



Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes, effectuées en duplicata.

Figure 11 : Relation de linéarité des signaux obtenus suite à l'amplification des fragments d'ARNm du GHRH-R et de GAPDH en fonction de la quantité d'ARN total utilisée.



Le RT-PCR multiplex a été effectué avec l'ARN total provenant de cellules d'AHm en culture exposées 4 h au GHRH, suite à 20 cycles d'amplification. (A) Représentation autoradiographique d'un RT-PCR typique, montrant la relation linéaire des signaux de GHRH-R et GAPDH obtenus avec 40, 80, 160 ng d'ARN total. (B) Une augmentation proportionnelle des signaux a été obtenue en fonction de l'augmentation de la quantité d'ARN total (40-160 ng). Le contrôle externe, rps-1 (0.13×10^7 molécules), est demeuré constant dans ces conditions. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes, effectuées en duplicata.

Ce traitement au GHRH régule à la baisse les niveaux d'ARNm du GHRH-R à $67 \pm 5\%$ du témoin ($P < 0.05$) (Tableau 2). Les niveaux d'ARNm du GHRH-R ont diminué de 1.5 fois en présence de GHRH ($P < 0.05$).

3.4 Implication des voies AC et MAPK dans la régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R

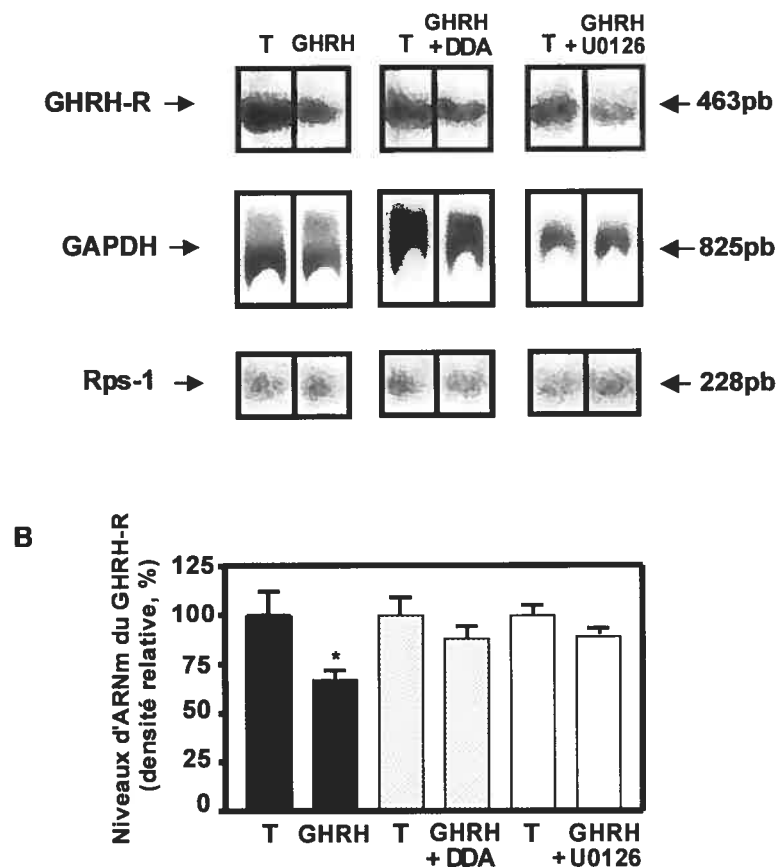
Afin de déterminer si la diminution de l'ARNm du GHRH-R causée par le GHRH est induite par l'activation de la voie AC, les niveaux d'ARNm du GHRH-R ont été mesurés par RT-PCR après une exposition de 4 h avec 10 nM de rGHRH(1-29)NH₂, en présence de 100 μM de 2', 5'-didéoxyadénosine, un inhibiteur de l'AC. Les niveaux d'ARNm du GHRH-R n'étaient pas significativement différents entre la condition témoin et celle en présence de GHRH après l'inhibition de la voie de l'AC (Figure 12 A et B centre; Tableau 2).

La voie MAPK a également été étudiée. Les cellules de l'AHm ont été exposées 4 h avec 10 nM de rGHRH(1-29)NH₂, en présence de 15 μM de U0126, un inhibiteur spécifique de MEK1/MEK2. Le GHRH n'a pas régulé à la baisse les niveaux d'ARNm du GHRH-R de façon significative par rapport au témoin lors du blocage de la voie des MAPK (Figure 12 A et B droite ; Tableau 2).

3.5 Étude de régulation génique suite à une exposition au rGHRH(1-29)NH₂

L'étude de la régulation génique à l'aide des biopuces est très utile pour identifier les changements moléculaires menant aux processus biologiques et aux différences phénotypiques observées dans les cellules. Cette technologie permet d'identifier la régulation et l'interconnexion de voies de signalisation et de processus, en évaluant l'expression de dizaines de milliers de gènes simultanément.

Figure 12 : Régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R dans les cellules d'AHm purifiées suite à une exposition de 4 h en présence de 10 nM de rGHRH(1-29)NH₂, et implication des voies AC et MAPK dans ce processus.



(A) Représentation autoradiographique des signaux obtenus suite à l'amplification de GHRH-R, GAPDH et rps-1 (n=1). Les cellules ont été exposées à 10 nM de rGHRH(1-29)NH₂, en présence ou absence de 100 μM de 2', 5'-dideoxyadenosine, un inhibiteur de l'adénylate cyclase, ou de 15 μM de U-0126, un inhibiteur spécifique de MEK1/MEK2. (B) Niveaux d'ARNm des fragments du GHRH-R, normalisés avec GAPDH et rps-1. Les résultats représentent la moyenne ± SEM de 3-4 expériences indépendantes, effectuées en triplicata. * $P < 0.05$.

Tableau 2 : Régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R dans les cellules d'AHm purifiées suite à une exposition de 4 h en présence de 10 nM de rGHRH(1-29)NH₂ et en présence ou absence de 2', 5'-didéoxyadénosine ou de U-0126.

CONDITIONS D'EXPOSITION	NIVEAUX D'ARNm DU GHRH-R (%)
Témoin	100 ± 12
10 nM rGHRH(1-29)NH ₂	67 ± 5 *
Témoin	100 ± 9
10nM rGHRH(1-29)NH ₂ et 100 µM 2', 5'-didéoxyadénosine	88 ± 6
Témoin	100 ± 5
10nM rGHRH(1-29)NH ₂ et 15 µM U-0126	89 ± 4

* $P < 0.05$.

Afin de mieux comprendre le rôle du GHRH-R dans les cellules de l'AHm, une étude de l'effet d'une exposition unique au rGHRH(1-29)NH₂ suite à leur mise en culture, pendant 4 h ou 16 h de culture, ou d'une exposition suite à leur mise en culture et répétée toutes les 24 h, pendant 64 h de culture, sur la régulation de l'expression de différents gènes, a été effectuée dans ces cellules. L'analyse génique a été validée à l'aide de biopuces d'Affymetrix, en utilisant l'ARN extrait des cellules d'AHm.

L'analyse en composantes principales (PCA) constitue une approche mathématique permettant de réduire un système complexe de corrélations, soit l'analyse des 6 puces, en un plus petit nombre de dimensions et de fournir des données globales sur les principales sources de variations, tel qu'illustré à la Fig. 13, indépendamment de l'hypothèse de recherche et du schéma expérimental retenu. Les temps correspondants aux symboles représentent les différentes périodes de culture en absence (symbole le plus bas sur le graphique) et en présence de GHRH (symbole le plus haut sur le graphique).

L'analyse a révélé que 74.3% de la variation peut être expliquée par la durée de culture. Le traitement au GHRH qui affecte majoritairement l'expression génique à 4 h, contribue à 1.8% de la variation globale. Finalement, la préparation cellulaire utilisées pour la culture de 16h constituerait une source additionnelle de variation (22.6%). Les graphiques de nuages de points MVA (non illustrés) ont permis de comparer la variation des profils d'expression des gènes entre les différentes biopuces. L'observation des MVA a montré que les patrons d'expression sont semblables entre les puces, suggérant que toutes les biopuces renferment des données exploitables au plan de la qualité expérimentale. Les nuages groupés des biopuces ayant la même période de culture montrent une expression génique consistante selon la période de culture.

Tel que présenté au Tableau 3, un ensemble de 121 gènes ont été exprimés,

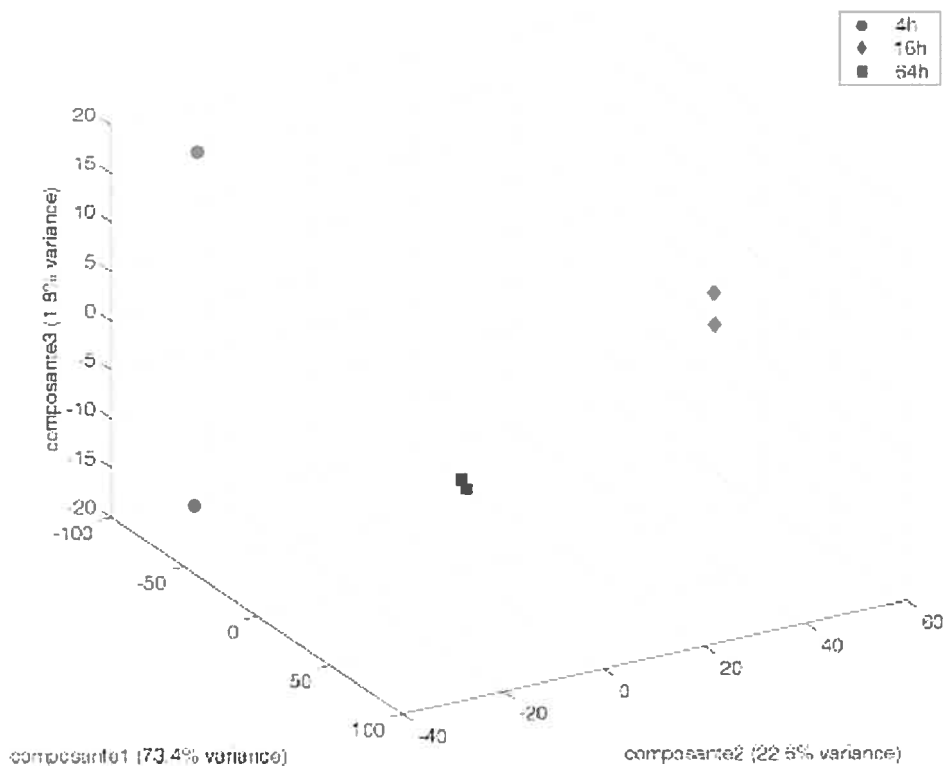
de façon différentielle (écart d'au moins 1.3 fois), suite à une exposition au rGHRH(1-29)NH₂, montrant que l'action de ce peptide provoque des changements d'expression génique dans les cellules de l'AHm. La majorité des gènes régulés à la hausse ou à la baisse, suite à une exposition au GHRH, font partie de catégories de gènes reliées à des fonctions spécifiques. Les gènes ont donc été regroupés en familles selon leur fonction, telle que rapportée dans la littérature : facteurs de transcriptions, voies de signalisation, adhésion cellulaire, axe somatotrope, division et prolifération cellulaire, différenciation cellulaire, canaux ioniques et transporteurs, récepteurs couplés aux protéines G, enzymes, enzymes de la protéolyse, transport intracellulaire, hormones, médiateurs de l'inflammation et autres fonctions. L'analyse des gènes exprimés de façon différentielle suite à une exposition au GHRH permet d'offrir des pistes d'identification des fonctions impliquant la stimulation du GHRH-R rénal.

Au total, 14 gènes ont été régulés à la hausse entre 1.3 et 1.4 fois et 62, entre 1.5 et 2 fois. Douze gènes ont été régulés à la baisse entre -1.3 et -1.4 fois et 49, -1.5 et -2 fois. Dans les cellules mises en culture 4 h suite à une stimulation à 10 nM de rGHRH(1-29)NH₂, 6 gènes ont été régulés à la hausse entre 1.3 et 1.4 fois et 57 entre 1.5 et 2 fois ; 5 gènes ont été régulés à la baisse entre -1.3 et -1.4 fois et 43, entre -1.5 et -2 fois. Dans les cellules mises en culture 16 h suite à une stimulation à 10 nM de rGHRH(1-29)NH₂, 3 gènes ont été régulés à la hausse entre 1.3 et 1.4 fois et 3, entre 1.5 et 1.7 fois; 3 gènes ont été régulés à la baisse entre -1.3 et -1.4 fois et 4, entre -1.5 et -1.7 fois. Dans les cellules exposées au rGHRH(1-29)NH₂ suite à leur mise en culture, et de façon répétée toutes les 24 h, durant une période de 64 h, 5 gènes seulement ont été régulés à la hausse entre 1.3 et 1.4 fois et 2, entre 1.5 fois; 4 gènes ont été régulés à la baisse entre -1.3 et -1.4 fois et 2, à -1.5 fois.

Plus spécifiquement, dans la famille des facteurs de transcription, 8 gènes ont été régulés à la hausse et 5 l'ont été à la baisse. Dans les facteurs impliqués dans les voies de signalisation, 5 gènes ont été régulés à la hausse et 5 l'ont été à la baisse. Dans la famille des molécules d'adhésion cellulaire, 2 gènes ont été régulés à la hausse et 4 l'ont été à la baisse. Dans la famille des molécules impliquées dans la

fonction somatotrope, un gène a été régulé à la hausse et un autre à la baisse. Dans la famille des molécules impliquées dans la division et prolifération cellulaire, 12 gènes ont été régulés à la hausse et 9 l'ont été à la baisse. Dans la famille des molécules impliquées dans la différenciation cellulaire, 12 gènes ont été régulés à la hausse et 5 l'ont été à la baisse. Dans la famille des canaux ioniques et transporteurs, 10 gènes ont été régulés à la hausse et 6 l'ont été à la baisse. Dans la famille des récepteurs couplés aux protéines G, 3 gènes ont été régulés à la hausse et 3 l'ont été à la baisse. Dans la catégorie des enzymes, 10 gènes ont été régulés à la hausse et 10 l'ont été à la baisse. Dans la famille des enzymes protéolytiques spécifiquement, 6 gènes ont été régulés à la hausse et 4 l'ont été à la baisse. Dans la famille des molécules impliquées dans le transport intracellulaire, 4 gènes ont été régulés à la hausse et 6 l'ont été à la baisse. Dans la catégorie des hormones, 1 gène a été régulé à la hausse. Dans la famille des médiateurs de l'inflammation, 3 gènes ont été régulés à la hausse et 4 l'ont été à la baisse. En ce qui concerne les gènes impliqués dans d'autres fonctions, 1 gène a été régulé à la hausse et 4 l'ont été à la baisse.

Figure 13 : Représentation tridimensionnelle des composantes principales de l'étude de régulation génique par le GHRH.



Les temps correspondants aux symboles représentent les différentes périodes de culture en absence (symbole le plus bas sur le graphique) et en présence de GHRH (symbole le plus haut sur le graphique). L'axe des X, Y et Z représentent les pourcentage de variation provenant des trois composantes principales.

L'analyse révèle que 74.3% de la variation peut être expliquée par la durée de culture. Le traitement au GHRH qui affecte majoritairement l'expression génique à 4 h, contribue à 1.8% de la variation globale. Finalement, la préparation cellulaire utilisée pour la culture de 16h constituerait une source additionnelle de variation (22.6%).

Tableau 3 : Effets spécifiques d'une exposition unique ou répétée au rGHRH(1-29)NH₂ sur la régulation de l'expression génique dans les cellules d'AH mince en culture.^a

FACTEURS DE TRANSCRIPTION					
Catégorie/ GenBank	Gène	GHRH 4h	GHRH 16h	GHRH 64h	Rôle
BE116976	---	1.8	*	*	Similar to HMG-box transcription factor TCF4E. Les facteurs de transcription Wnt contrôlent plusieurs décisions concernant l'avenir de la cellule au cours du développement, en altérant l'expression de gènes spécifiques, via des activateurs de la transcription hétérodimériques. Ceux-ci consistent en la beta-caténine et l'un des quatre membres de la famille TCF (<i>T-cell factor</i>), TCF4E, qui consistent en des protéines se liant à l'ADN.
AF059678	Recc1	1.5	*	*	Facteur de réplication C, ou RFC1 RFC1 est un répresseur de la transcription, qui contrôle la transcription du gène du récepteur du peptide intestinal vasoactif. Il s'agit d'une protéine accessoire de l'ADN polymérase, d'une ATPase dépendante de l'ADN nécessaire à la réplication et la réparation de l'ADN des eucaryotes. Il active l'ADN polymérase, et stabilise les télomères. Il est largement exprimé dans plusieurs organes, dont le rein.
NM_133525	C6orf108	1.5	*	*	Chromosome 6 open reading frame 108. C6orf108 est un facteur de transcription impliqué dans la prolifération et différenciation cellulaire, et dans l'apoptose. Il est exprimé dans plusieurs organes, dont le rein.

NM_013028	Shox2	1.6	*	*	<p><i>Short stature homeobox 2.</i></p> <p>Shox2 est un régulateur positif de la transcription. SHOX est impliqué dans le phénotype du syndrome de Turner, où les patients ont une petite stature et des anomalies rénales. SHOX est un régulateur positif de la croissance, et joue un rôle dans la formation des structures corporelles. Il est exprimé dans plusieurs organes, dont le rein.</p>
D83508	Egr2	1.5	*	*	<p><i>Early growth response 2.</i></p> <p>Egr2 est un facteur de transcription ayant trois doigts de zinc de type C2H2 en tandem. Il est exprimé dans plusieurs tissus, dont le rein.</p>
AW528459	Pou2f1	2.0	*	*	<p>Domaine POU de classe 2, facteur de transcription 1. Oct-1 (<i>Octamer-binding transcription factor 1</i>).</p> <p>Pou2f1 est un activateur transcriptionnel de CYP2D22, une enzyme du cytochrome P450 qui possède une activité oxidoréductase et monoxygénase. Il s'agit d'un facteur de transcription ubiquitaire activant les promoteurs de gènes de snrna (small nuclear rnas), et de gènes comme l'histone et les immunoglobulines.</p>
AI175320	Nfatc4	1.8	*	*	<p>Facteur nucléaire de cellules T activées.</p> <p>Nfatc4 est un facteur de transcription induisant la production de l'IL-2, qui élimine les cellules infectées, et d'IL-4, qui stimule une réponse aux anticorps et qui empêche les cellules d'être infectées. Il est exprimé dans plusieurs tissus, dont le rein.</p>
BE117138	Nfix	1.6	*	*	<p><i>Nuclear factor 1X.</i></p> <p>Nfix est une protéine de liaison à l'ADN impliquée dans l'activation de la transcription et l'expression de gènes de l'olfaction.</p>

L08812	Tfec	-2.0	*	*	Facteur de transcription EC. Tfec est une protéine de liaison de l'ADN hélice-boucle-hélice, qui contient un motif leucine zipper. Il forme des hétérodimères avec TFE3 (<i>transcription factor binding to IGHM enhancer 3</i>), et inhibe l'activation de la transcription dépendante de TFE3. L'interaction entre TFE3 et E2F3 facilite l'activation de la transcription du gène p68, qui est un antigène nucléaire associé à la prolifération.
NM_024388	Nr4a1	-1.5	*	*	<i>Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1</i> . Nr4a1 code pour une protéine membre de la superfamille des récepteurs stéroïdes-thyroïde hormone-rétinoïde. Il s'agit d'un facteur de transcription nucléaire, dont la translocation du noyau à la mitochondrie induit l'apoptose. Il est exprimé dans plusieurs tissus, dont le foie et le cerveau.
BF408988	---	-1.6	*	*	Similaire à la protéine Zfp67. Cette protéine est membre de la famille des ' <i>early growth response gene</i> ', qui joue un rôle important dans le développement. Il s'agit d'un facteur de transcription contenant un doigt de zinc, qui se lie aux régions promotrices du gène du collagène et réprime la transcription du collagène de type I. Elle réprime également la fibronectine et d'autres gènes de la matrice extracellulaire.
AI578566	---	-1.7	*	*	Similaire à l'ubiquitine. Ce gène est relié à la nucléogénèse, et maintient la structure du noyau. Il possède une activité GTPase et ATPase intrinsèque, et peut jouer un rôle important dans la transcription catalysée par l'ARN polymérase I.

BE098273	Gtf2h4	-1.5	*	*	Facteur de transcription général II H, polypeptide 4. Gtf2h4 est une composante du facteur de transcription basal TFIIH, impliqué dans le NER (nucleotide excision repair) de l'ADN, et, lorsque lié à CAK, à la transcription de l'ARN par l'ARN polymérase II.	
VOIES DE SIGNALISATION						
Catégorie/ GenBank	Gène	GHRH 4h	GHRH 16h	GHRH 64h	Rôle	
NM_021661	Rgs19	2.0	*	*	<i>Regulator of G-protein signalling 19, ou Gaip.</i> Rgs19 est membre de la famille des RGS (<i>regulators of G-protein signaling</i>), qui régule à la baisse la signalisation de Gα _i /Gα _q . Il peut agir comme une protéine activant la GTPase, localisée dans des vésicules de clathrine associées avec le Golgi et la membrane plasmique. Il est présent dans le rein.	
BF395788	Mapk4	1.5	*	*	<i>Mitogen activated protein kinase 4.</i> Les MAPK phosphorylent des cibles nucléaires. MAPK4 phosphoryle MAP2 (microtubule-associated protein-2). Elle active l'entrée dans le cycle cellulaire. Elle est fortement exprimée dans le cœur et le cerveau, et elle est exprimée dans le rein.	
BF399528	JSAP1	1.7	*	*	Protéine 1 associée à JNK/SAPK ou Mapk8ip3. JSAP1 est une protéine d'échafaudage dans la cascade des MAPK, qui permet une bonne adhésion cellulaire. Son ARNm est présent dans plusieurs organes, dont le rein.	

NM_022185	Pik3r2	1.5	*	1.3	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2.</i> Pik3r2 est impliqué dans les mécanismes de signalisation cellulaire, tels la prolifération et la survie cellulaire. Il est ubiquitaire.
BE117439	Pik3ca	-1.7	*	*	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide.</i> Pik3ca est associé avec une augmentation de la prolifération cellulaire, et une diminution de l'apoptose. Il peut jouer un rôle dans la progression du cancer de l'ovaire. Il est présent dans plusieurs organes, dont le rein.
NM_012947	Eef2k	-1.6	*	*	<i>Eukaryotic elongation factor-2 kinase.</i> Eef2k catalyse la phosphorylation de eEF2 (<i>eukaryotic elongation factor 2</i>), et inhibe sa fonction. eEF2 : catalyse la translocation du peptidyl-tRNA du site A ribosomal au site P, lors de l'élongation au cours de la traduction de l'ARN en protéines. Eef2k est une protéine kinase hautement conservée dans la voie de signalisation médiée par la calmoduline, qui relie l'activation de récepteurs de surface et la division cellulaire. L'activité de cette kinase est augmentée dans plusieurs cancers, et peut être une cible valide pour un traitement anti-cancer.
BF419367	---	-1.5	*	*	<i>Similar to SMC5 structural maintenance of chromosomes 5-like 1.</i> Ce gène maintient l'intégrité des chromosomes et permet la réparation de la double hélice d'ADN. Il est ubiquitaire.
NM_019196	Mpdz	-1.7	*	*	Protéine à multiples domaines PDZ (<i>PSD-95, Discs-large, ZO-1</i>), ou MUPP1. Mpdz joue un rôle dans la signalisation du second messenger de récepteurs couplés aux protéines G tel que le récepteur 5-HT2C. Ses transcrits sont abondants dans le cerveau et plusieurs organes périphériques.

AI012081	---	-1.6	*	*	*	<p>Similaire à la protéine RhoH, reliée à Rho et liant le GTP.</p> <p>Ce gène est membre de la superfamille Ras des petites GTPases. Selon la littérature actuelle, il est transcrit seulement dans les cellules hémapoïétiques.</p>
ADHESION CELLULAIRE						
Catégorie/ GenBank	Gène	GHRH 4h	GHRH 16h	GHRH 64h	Rôle	
D25290	Cdh6	1.6	*	*	Cadhérine 6. Nom précédent: <i>K-cadherin</i> .	Cdh6 active l'adhésion cellulaire dépendante du calcium. Elle peut jouer un rôle dans le développement de l'ovaire. Elle est exprimée dans l'ovaire, les testicules, le carcinome rénal et le rein en développement, plus précisément dans les cellules épithéliales au cours de la glomérulonéogenèse.
NM_013225	Cntn6	1.5	*	*	<i>Contactin 6</i> .	L'isoforme longue est une protéine membranaire neuronale ancrée au glycosylphosphatidylinositol (GPI), qui fonctionne comme une molécule d'adhésion cellulaire. Peut jouer un rôle dans l'axonogénèse. L'ARNm de Cntn6 est exprimé dans le cerveau. L'isoforme courte serait une molécule d'adhésion cellulaire plus générale, impliquée dans d'autres tissus et localisée dans des tissus autres que le cerveau. Cette molécule est vitale pour le développement embryonnaire.
BG372598	Ncam1	-1.4	-1.3	*	<i>Neural cell adhesion molecule 1</i> .	Ncam1 est une molécule d'adhésion cellulaire, présente dans le néphron en développement, dans les tubules proximaux, les segments épais de l'AH et les tubules collecteurs.

AI229409	Ncam1	*	*	-1.3	Neural cell adhesion molecule 1. Ncam1 est une molécule d'adhésion cellulaire, présente dans le néphron en développement, dans les tubules proximaux, les segments épais de l'AH et les tubules collecteurs.
BE108345	Col12a1	*	-1.5	*	Procollagen, type XII, alpha 1. Col12a1 est impliqué dans l'adhésion cellulaire en induisant des interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules.
AXE SOMATOTROPHE					
Catégorie/G enBank	Gène	GHRH 4h	GHRH 16h	GHRH 64h	Rôle
AF409106	Ghrhr	1.4	*	*	Récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance. Dans l'hypophyse antérieure, le GHRH-R est impliqué dans la synthèse et la sécrétion de la GH, ainsi que dans la prolifération et différenciation des cellules somatotropes. Le GHRH-R a également été détecté dans l'AH ascendante mince de la médulla rénale.
U94321	Ghsr	-1.3	*	*	Récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance. Ghsr est un récepteur couplé aux protéines G liant la gréline, et jouant un rôle dans la sécrétion de l'hormone de croissance. Situé dans l'hypothalamus.
DIVISION ET PROLIFÉRATION CELLULAIRE					
Catégorie/G enBank	Gène	GHRH 4h	GHRH 16h	GHRH 64h	Rôle

X64589	ccnb1	1.3	*	*	Cycline B1. Ccnb1 est la principale cycline B impliquée dans les premières phases de la mitose jusqu'à la transition métaphase/anaphase.
NM_133571	Cdc25a	1.3	*	*	Cycle de division cellulaire 25A. Cdc25a est une phosphatase nécessaire à la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire.
BM385445	Top2a	1.3	*	*	ADN topoisomérase 2 alpha. Top2a est une enzyme nucléaire qui altère l'état topologique de l'ADN pendant la transcription, qui est impliquée dans la condensation des chromosomes et la séparation des chromatides pendant la transcription et la réplication de l'ADN.
BE099652	---	2.0	*	1.4	FBNP2, <i>Formin binding protein 2</i> , alias KIAA0456. FBNP2 est une GTPase qui active rac1 et peut-être cdc42. FBNP2 est hautement exprimée dans le cerveau, et exprimée à de faibles niveaux dans le rein. Rac1 : GTPase qui fait partie de la superfamille des RAS, des petites protéines liant le GTP. Les membres de cette famille régulent une variété d'événements cellulaires, dont le contrôle de la croissance cellulaire, la réorganisation du cytosquelette, et l'activation de protéines kinases. Cdc42 (cell division cycle 42) : petite GTPase de la sous-famille Rho, qui régule les voies de signalisation contrôlant différentes fonctions cellulaires, dont la morphologie cellulaire, la migration, l'endocytose et la progression du cycle cellulaire.

BF281271	Pgf	2.0	*	*	Facteur de croissance placentaire. Pgf forme un hétérodimère avec VEGF, et peut jouer un rôle dans la prolifération de cellules endothéliales vasculaires. Il s'agit d'un facteur de croissance actif lors de l'angiogénèse et de la croissance des cellules endothéliales, stimulant leur prolifération et migration. Pgf est présent dans des carcinomes rénaux.
NM_022955	Egfl3	1.6	*	*	<i>Multiple EGF(epidermal growth factor) -like-domain protein 3.</i> Egfl3 est impliqué dans la différenciation et prolifération cellulaire et l'apoptose, et peut jouer un rôle lors du développement du SNC. Il est présent dans plusieurs tissus, dont le rein.
NM_012523	Cd53	*	1.5	*	Antigène CD53. Cd53 est impliqué dans la survie et la régulation de la croissance cellulaire. Il est présent dans plusieurs organes, dont le rein.
NM_031066	Fez1	1.8	*	*	<i>Fasciculation and elongation protein zeta 1.</i> Fez1 est nécessaire à l'élongation et à la croissance des axones. Il interagit avec la protéine kinase C zeta, et joue un rôle dans la guidance axonale. Il est exprimé majoritairement dans le cerveau, mais est impliqué dans le développement du carcinome rénal.
NM_012660	Stnl	1.7	*	*	Semblable à la Statine. Stnl est un clone génomique du gène spécifique de non-prolifération, présent dans les cellules en arrêt de croissance.

BF393029	Atrx	1.6	*	-1.5	<p><i>Alpha thalassaemia/mental retardation syndrome X-linked.</i></p> <p>Atrx lie l'annexine V et joue un rôle dans l'action de l'annexine V, qui lie les phospholipides membranaires de façon calcium-dépendante, et est impliquée dans les voies d'endocytose et d'exocytose.</p> <p>Elle contient un domaine ATPase/helicase, donc fait partie de la famille SWI/SNF de protéine remodelant la chromatine. Des mutations de ce gène causent des changements dans la méthylation de l'ADN, ce qui suggère un lien entre le remodelage de la chromatine, la méthylation de l'ADN, et l'expression génique au cours de processus développementaux.</p> <p>Il s'agit d'une protéine phosphorylée de façon dépendante du cycle cellulaire, ce qui régule son association à la matrice nucléaire et à la chromatine, suggérant son implication dans la régulation génique pendant l'interphase et dans la ségrégation des chromosomes pendant la mitose. Il est ubiquitaire.</p>
AI171777	Cxcl12	-1.5	*	*	<p><i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 12.</i></p> <p>Les chémokines sont une famille de protéines contrôlant des aspects de la prolifération, la migration, et l'adhésion cellulaire. Cxcl12 est une molécule chimiotactique, impliquée dans la migration cellulaire hématopoïétique et neuronale. Il joue un rôle de régulation dans le rein au cours du développement.</p>
AA998516	Ccna2	-1.3	*	*	<p><i>Cycline A2.</i></p> <p>Ccna2 régule la synthèse de l'ADN et active la mitose, en liant et activant les kinases CDC2 or CDK2 kinases, et en activant les transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire. Elle est ubiquitaire.</p>
NM_031360	Smpd2	-1.6	*	-1,3	<p><i>Neutral sphingomyelinase.</i></p> <p>Smpd2 transforme la sphingomyéline en céramide, qui est impliquée dans la différenciation et la prolifération cellulaire et l'apoptose. Il est exprimé dans plusieurs organes, dont le rein.</p>

NM_020097	Extl3	*	-1.6	*	Exostosés (multiple)-like 3. Extl3 régule positivement la croissance cellulaire, et est ubiquitaire.
B1291153	---	-1.7	*	*	Similaire à la translokine. Cette protéine lie le FGF2 (facteur de croissance des fibroblastes), et active sa translocation nucléaire et son activité mitogène. Elle est nécessaire au transport protéique du réticulum endoplasmique au Golgi, et est ubiquitaire.
NM_031317	Pdgfc	*	-1.7	*	<i>Platelet-derived growth factor, C polypeptide</i> . Pdgfc active le récepteur transmembranaire tyrosine kinase, et la prolifération cellulaire des cellules embryonnaires de la moelle épinière. Il est exprimé dans le cerveau chez l'adulte.
NM_017066	Ptn	*	-1.6	*	Pleiotrophine Chez le rat, Ptn peut agir comme un facteur de croissance. Il peut jouer un rôle dans la régénération du foie et la fibrinogénèse.
DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE					
Catégorie/G enBank	Gène	GHRH 4h	GHRH 16h	GHRH 64h	Rôle
NM_053402	Wnt4	1.3	*	1.4	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 4</i> . Une augmentation des niveaux de l'ARNm et de la protéine a été détectée dans le modèle d'insuffisance rénale. Wnt4 peut jouer un rôle en réponse à une blessure rénale. Wnt-4 agit de façon autocrine pour stimuler sa propre synthèse, et est nécessaire pour la différenciation des cellules épithéliales rénales.

NM_012959	Gfra1	1.5	*	*	<p><i>Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1.</i></p> <p>Gfra1 se lie au GDNF (<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>), qui est essentiel à la néphrogénèse, et cause la phosphorylation et l'activation du récepteur des protéines tyrosines kinases Ret. Gfra1 joue un rôle dans la survie des cellules neuronales et dans le développement des reins. Il est exprimé dans le rein.</p>
NM_053669	Aps	1.5	*	*	<p><i>Adaptor protein with pleckstrin homology and src homology 2 domains.</i></p> <p>Aps joue un rôle dans la signalisation de Trk (<i>tyrosine kinase receptor</i>), qui active la croissance cellulaire et la voie de la survie, pendant la neurogénèse. Aps se lie au Grb2 (<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>), menant à l'induction de Ras par le NGF (<i>nerve growth factor</i>), à l'activation des MAPK, et à la différenciation morphologique des neurones.</p>
BG375958	---	1.5	*	*	<p><i>Similar to Ras-like GTP-binding protein Rem.</i></p> <p>REM1 est une GTPase, membre de la famille des protéines liant le GTP semblables à RAS. REM1 est exprimé dans les cellules endothéliales, où elle active la réorganisation du cytosquelette d'actine et des changements morphologiques dans les cellules.</p>
AI556378	Cited4	1.5	*	*	<p><i>Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 4</i></p> <p>Cited4 est un facteur de transcription, et co-activateur du facteur de transcription TFAP2, qui inhibe la croissance cellulaire en induisant l'apoptose. Il joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes pendant le développement et dans la différenciation des cellules sanguines, des cellules endothéliales, et des cellules épithéliales mammaires. Il lie le facteur CREB.</p>

BF285164	Popdc2	1.8	*	*	<i>Popeye domain containing 2.</i> Popdc2 code pour un membre de la famille POP de protéines contenant 3 domaines potentiels transmembranaires. Il s'agit d'une protéine exprimée de façon prédominante dans les muscles cardiaques et squelettiques. Il joue un rôle important dans le développement du cœur, et est ubiquitaire.
AY004215	Loc192253	1.7	*	*	<i>Myosin heavy chain Myr 8.</i> Protéine exprimée à des niveaux élevés au cours du développement du système nerveux.
BG378086	Map1b	1.6	*	*	<i>Microtubule-associated protein 1b.</i> Map1b lie les microtubules et effectue des liaisons croisées entre ceux-ci. Il est impliqué dans l'assemblage des microtubules, ce qui est essentiel à la neurogénèse. Il joue un rôle dans le développement et la fonction du système nerveux.
AW252608	---	1.6	*	*	<i>Similar to iroquois homeobox protein 4.</i> Il s'agit d'un médiateur important de la différenciation ventriculaire pendant le développement cardiaque, qui est exprimé de façon prédominante dans les ventricules cardiaques.
AW523099	---	1.6	*	1.4	<i>Similar to putative WDC146.</i> WDC146 est hautement exprimé dans les testicules, surtout pendant certains stades de la spermatogénèse, suggérant un rôle dans la cyto-différenciation et/ou la recombinaison de l'ADN.

NM_130751	Fgf22	1.4	-1.4	*	Facteur de croissance des fibroblastes 22. Fgf22 possède une activité mitogène et de survie cellulaire. Il est impliqué dans plusieurs processus biologiques au cours du développement embryonnaire, tels que la morphogénèse, la croissance cellulaire, et la réparation tissulaire.
NM_021746	Mapk 12	-1.6	*	*	Mapk 12 inhibe la prolifération cellulaire et stimule la différenciation cellulaire. Il est exprimé dans plusieurs organes, dont le rein.
U68726	Neo1	-1.5	*	*	Néogénine. Neo1 est impliqué dans la survie des cellules cancéreuses de l'ovaire. Il s'agit d'une protéine régulatrice dans la transition de cellules prolifératrices non différenciées à leur état différencié. Neo1 est une molécule d'adhésion cellulaire dans plusieurs tissus.
NM_017092	Tyro3	-1.6	*	*	Protéine kinase 3 TYRO3. Tyro3 est un récepteur tyrosine kinase qui joue un rôle dans le développement ou la fonction de populations neuronales spécifiques. Il peut être impliqué dans les processus d'adhésion cellulaire, particulièrement dans le système nerveux central. Il est abondant dans le cerveau, et présent à plus faibles niveaux dans d'autres tissus.
AW920039	---	-1.6	*	*	<i>Similar to stem cell adaptor protein STAP-1.</i> STAP-1 est restreint aux cellules de la moelle épinière, et associé aux type cellulaire non différencié.
CANAUX IONIQUES ET TRANSPORTEURS					
Catégorie/G enBank	Gène	GHRH 4h	GHRH 16h	GHRH 64h	Rôle

AF273025	Slc38a3	1.5	*	*	<p><i>Solute carrier family 38, member 3, également nommé SN1.</i></p> <p>Slc38a3 est un transporteur d'acides aminés dépendant du sodium pour la glutamine, l'histidine et l'asparagine dans différents tissus. Il joue un rôle dans la régulation de l'homéostasie en réponse à un déséquilibre acide-base dans le rein.</p>
AB021970	Slc6a2	1.6	*	*	<p><i>Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2.</i></p> <p>Slc6a2 est un transporteur de norépinéphrine, présent dans le rein.</p>
AB047324	Slc16a10	1.5	*	*	<p><i>Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 10.</i></p> <p>Slc16a10 est un transporteur d'acides aminés aromatiques indépendant du Na⁺ à travers la membrane plasmique, hautement exprimé dans le foie et le rein.</p>
NM_017288	Scn1b	1.5	*	*	<p><i>Sodium channel, voltage-gated, type I, beta polypeptide.</i></p> <p>Scn1b est un canal sodique sensible au voltage exprimé abondamment dans le cerveau, le muscle et le cœur. Il joue un rôle dans l'initiation et la propagation du potentiel d'action. Il est exprimé faiblement dans d'autres tissus, dont le rein.</p>
U32497	P2rx4	*	1.3	1.5	<p><i>Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4.</i></p> <p>P2rx4 est un récepteur fonctionnant comme un canal ionique activé par le ligand, ayant une haute perméabilité au calcium, exprimé dans plusieurs tissus, dont le rein.</p>
U91449	Kcnj3	1.6	*	*	<p><i>Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3.</i></p> <p>Kcnj3 est un canal potassium à rectification entrante, contrôlé par les protéines G, qui joue un rôle important dans le battement du cœur. Il est exprimé dans quelques organes, dont le cœur et le rein.</p>

AW528917	Slack	1.7	*	*	Sous-unité du canal potassique. Slack est un canal potassique activé par le Na(+), impliqué dans la propagation du potentiel d'action neuronal. Il a été identifié dans les neurones et les cardiomyocytes, où il jouerait un rôle de protection contre l'ischémie.
NM_078619	Slc8a2	1.6	*	*	Isoforme 2 de l'échangeur sodium/calcium. Slc8a2 régule les niveaux de calcium intracellulaires, et maintient l'homéostasie du calcium. Il est détecté dans le cerveau et les muscles squelettiques. Il s'agit d'une enzyme régulée par l'ATP.
NM_032065	Slc1a6	1.6	*	*	<i>Solute carrier family 1 (high affinity aspartate/glutamate transporter).</i> Slc1a6 permet le cotransport d'une molécule de glutamate avec trois ions Na+ et un H+, avec le cotransport d'un ion K+. Il est exprimé dans le cerveau (cellules de Purkinje) et le placenta.
NM_053327	Clnk1	*	-1.4	*	Canal chlore K1. Clnk1 est un canal chlore localisé dans l'AH ascendante mince rénale, essentiel au mécanisme de concentration de l'urine.
Y09945	Ust1	-1.6	*	*	<i>Putative integral membrane transport UST1r.</i> Ust1 est une protéine de transport, membre de la famille des ASF (<i>amphiphilic solute facilitator</i>). UST-1 a été cloné dans le rein de rat, et est confiné au rein.
A1058429	---	-1.7	*	*	Similaire à OCTN3. Il s'agit d'un transporteur de la L-carnitine indépendant du Na(+), exprimé à de faibles niveaux dans le rein.

NM_019229	Slc12a4	-1.6	*	*	Solute carrier family 12, member 4, ou KCC1. Slc12a4 est un cotransporteur potassium-chlore. Il peut contribuer à l'homéostasie du volume cellulaire. Il est ubiquitaire.
AW253366	Homer3	-1.7	*	*	<i>Homer, neuronal immediate early gene, 3.</i> Homer3 peut interagir avec les récepteurs au glutamate métabotrope de type I, et régule leur couplage à des canaux ioniques membranaires calciques de type N et potassiques de type M. Il est présent dans le cerveau, et peut être impliqué dans la croissance cellulaire.
BF284523	Abca1	-1.5	*	*	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1.</i> Abca1 est un transporteur d'anions dépendant de l'AMPc et sensible à la sulfonylurée. Il influence le transport intracellulaire de cholestérol, et est largement exprimé, le plus abondamment dans les macrophages.
RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G					
Catégorie/G enBank	Gène	GHRH 4h	GHRH 16h	GHRH 64h	Rôle
NM_012717	Calcr1	1.5	*	*	Analogue du récepteur de la calcitonine (symbole précédent: CRLR). Calcr1 est un récepteur couplé aux protéines G liant le peptide relié au gène de la calcitonine ou liant l'adrénomédulline. La calcitonine régule le cotransport $\text{Na}^{(+)}\text{-K}^{(+)}\text{-Cl}^{-}$ en activant l'AMPc dans l'AH ascendante et module la croissance cellulaire, en agissant des actions vasodilatatrices, diurétiques et module la croissance cellulaire, en agissant de façon paracrine ou endocrine sur les tubules rénaux. Calcr1 est induit par plusieurs facteurs de croissance, incluant le facteur de croissance épidermique et l'angiotensine II. Calcr1 est exprimé dans plusieurs organes, dont le rein.

BF407796	Gpr135	1.7	*	*	<p><i>G protein-coupled receptor 135. Galanin receptor type 1.</i></p> <p>Gpr135 est un récepteur couplé aux protéines Gi, de la famille des GPCR de type rhodopsine. Il s'agit d'un récepteur de l'hormone galanine, présent dans plusieurs tissus, dont le rein.</p> <p>La galanine régule la sécrétion de la GH, module la sécrétion de l'insuline, et peut être impliquée dans la sécrétion adrénérgique. Elle agit sur le rein en augmentant le flux sanguin rénal, le taux de filtration glomérulaire et la concentration de glucose plasmatique.</p>
AA819795	Arhgap 4	-1.3	1.3	*	<p>Gène apparenté au récepteur 2 de l'arginine vasopressine.</p> <p>L'AVP augmente la ré-absorption de Cl⁻ par le canal CLC-K1 dans les cellules de l'AH ascendantes mince, en agissant sur les récepteurs V2 couplés aux protéines G.</p>
NM_016996	Casr	-1.5	*	*	<p><i>Calcium-sensing receptor.</i></p> <p>Casr est un récepteur couplé aux protéines G, sensible au calcium extracellulaire. Le maintien d'une concentration extracellulaire stable de calcium ionisé dépend de la fonction de cellules spécialisées, comme certaines cellules épithéliales rénales. Dans le rein de rat, ce récepteur est situé en majorité dans la médulla externe et la médulla corticale.</p>
BF398112	Smo	-1.9	*		<p><i>Smoothed homolog (Drosophila).</i></p> <p>Smo est un récepteur couplé aux protéines G. Des défauts de smo sont impliqués dans le carcinome de cellules basales (bcc). Chez l'adulte, Smo est retrouvé dans plusieurs tissus dont le cœur, le cerveau, le foie, les poumons, les muscles squelettiques, les testicules et les reins.</p>
ENZYMES					

Catégorie/ GenBank	Gène	GHRH 4h	GHRH 16h	GHRH 64h	Rôle
A1172124	Fut11	1.7	*	*	<i>Alpha3-fucosyltransferase 11.</i> Fut11 est un membre de la famille 10 des glycosyltransférases. Il s'agit d'une protéine membranaire de type II du Golgi, présente dans plusieurs organes, dont le rein.
A1411345	---	1.5	*	*	<i>Similar to proline dehydrogenase; PRODH.</i> Cette protéine est exprimée dans quelques organes, et à un niveau moins élevé dans le rein. Il s'agit d'une proline déshydrogénase mitochondriale catalysant la première étape dans le catabolisme de la proline.
NM_053498	Entpd6	1.6	*	*	<i>Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6.</i> Entpd6 peut activer des réactions de glycosylation dans le Golgi, et peut catalyser l'hydrolyse de nucléotides extracellulaires. Il est exprimé dans la plupart des tissus, mais de façon prédominante dans le cœur.
B1282349	Dci	1.5	*	1.5	<i>Dodecenoyl-coenzyme A delta isomerase.</i> Dci est impliquée dans l'oxydation des acides gras beta.
NM_021668	Cml2	2.0	*	*	<i>Putative N-acetyltransferase Camello 2.</i> Cml2 peut agir comme une N-acétyltransférase. La protéine encodée par ce gène est très similaire au produit du gène CML1, qui est une protéine spécifique au rein et au foie, homologue aux acétyltransférases bactériennes impliquées dans la résistance aux médicaments.

A1233096	---	1.6	*	*	<p>Similaire au précurseur de l'ARN polymérase ADN-dirigée mitochondriale.</p> <p>Cette protéine joue un rôle majeur dans l'expression des gènes de la mitochondrie.</p>
AB012139	Bmp1	1.9	*	*	<p><i>Bone morphogenetic protein 1.</i></p> <p>Bmp1 est une métalloprotéase, membre de la superfamille de TGF-beta, qui clive le propeptide COOH- du procollagène I, II et III.</p> <p>TGF-beta: joue un rôle critique dans le développement de fibrose tissulaire. Son expression est corrélée avec l'augmentation de la déposition de matrice extracellulaire.</p> <p>Bmp1 est ubiquitaire.</p>
NM_013143	Mep1a	-1.5	*	*	<p><i>Meprin 1 alpha.</i></p> <p>Mep1a est la sous-unité alpha de la métalloprotéase méprine A. Il s'agit d'une enzyme à la surface cellulaire hautement exprimée dans l'intestin et le rein, du côté de la membrane en brosse des cellules épithéliales du tubule proximal. Lors d'une perte aigue de la fonction rénale, la méprine est redistribuée à la membrane basolatérale, où elle dégrade la matrice extracellulaire et endommage les structures périlitubulaires adjacentes. Il s'agit d'une enzyme cytotoxique pour des cellules épithéliales tubulaires rénales en culture. L'inhibition de la méprine protège contre le dommage causé par l'hypoxie-réoxygénation.</p>
AF230096	Ald16	-1.3	*	*	<p><i>Aldehyde reductase (aldose reductase) like 6.</i></p> <p>Ald16 est exprimée de façon croissante au cours du développement dans les cellules de l'AH ascendante mince et des tubules collecteurs de la médulla interne, parallèlement à l'augmentation de l'osmolalité du milieu interstitiel, suggérant un rôle dans la concentration de l'urine. Une diminution de l'ARNm de Ald16 est observée dans l'insuffisance rénale.</p>

AI410860	Rabgta	-1.9	*	*	<i>Rab geranylgeranyl transferase alpha-subunit.</i> Rabgta est la sous-unité alpha de la Rab geranylgeranyl transférase, qui catalyse le transfert de groupements géranylgeranyle aux résidus cystéines de la protéine Rab. Elle joue un rôle dans la biosynthèse des plaquettes sanguines. Des variants de Rabgta obtenus au cours de l'épissage ont été retrouvés dans le rein.
NM_012619	Pah	-1.8	*	*	<i>Phenylalanine hydroxylase.</i> Pah catalyse la conversion de la phénylalanine en tyrosine. Elle est enrichie dans le foie, présente dans le rein.
BI304009	Lox	-1.8	*	*	<i>Lysyl oxidase.</i> Lox est une enzyme impliquée dans la catalyse de la réaction nécessaire à la liaison croisée du collagène et des fibres d'élastine, protéines de la matrice extracellulaire. Elle pourrait jouer un rôle dans la suppression des tumeurs. Sa spécificité tissulaire est : cœur, placenta, muscle squelettique, reins, poumons et pancréas.
NM_031605	Cyp4a12	-1.7	*	*	<i>Cytochrome P450, 4a12.</i> Cyp4a12 est une monooxygénase retrouvée dans les testicules, dont l'expression est induite par un traitement aux androgènes chez des rats castrés. L'ARNm est présent dans le foie et le rein.
NM_017286	Cyp11a1	-1.7	*	*	<i>Cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1.</i> Cyp11a1 est une enzyme de la superfamille du cytochrome P450. Il s'agit d'une monooxygénase qui catalyse la synthèse de cholestérol et de stéroïdes. Elle est localisée à la membrane interne mitochondriale, et catalyse la conversion du cholestérol en pregnénone, étape limitante dans la synthèse d'hormones stéroïdes.

NM_013128	Cpe	-1.5	*	*	Carboxypeptidase E. Cpe peut jouer un rôle dans le traitement post-translationnel d'hormones peptidiques. Elle est localisée dans des granules sécrétoires des îlots pancréatiques, de l'hypophyse et du cerveau.
B1274037	Ppp1r3b	-1.6	*	-1.4	Sous-unité de la protéine phosphatase-1 (PP1). Ppp1r3b est impliquée dans le métabolisme du glycogène, la division cellulaire et la synthèse protéique. Elle est exprimée dans plusieurs organes, dont le rein.
PROTEOLYSE					
Catégorie/ GenBank	Gène	GHRH 4h	GHRH 16h	GHRH 64h	Rôle
B1283106	---	1.6	*	*	<i>Similar to tripartite motif-containing 41.</i> Cette protéine joue un rôle dans l'ubiquitination des protéines.
AW921187	---	1.6	*	*	<i>Ubiquitin-activating enzyme E1.</i> Cette protéine catalyse la première étape dans la conjugaison de l'ubiquitine afin de marquer des protéines cellulaires pour la dégradation.
BE095607	---	-1.8	*	*	<i>Similar to UV excision repair protein RAD23 homolog A.</i> Cette protéine est impliquée dans la NER (<i>nucleotide excision repair</i>) : elle joue un rôle dans la reconnaissance des dommages de l'ADN dans la réparation de l'excision des bases. Elle contient un domaine N-terminal semblable à l'ubiquitine, qui interagit avec le protéasome 26S et la protéine ligase ubiquitine E6AP, suggérant une implication dans la voie protéolytique médiée par l'ubiquitine.

AI169359	---	-1.7	*	*	Cathepsine F. Les Cathepsines sont des protéinases de cystéines de la famille des Papaines, qui représentent une composante majeure du système protéolytique lysosomal. La Cathepsine F participe à la dégradation et au turnover des protéines intracellulaires. Elle a déjà été impliquée dans l'invasion de tumeurs et dans les métastases, et est exprimée de façon ubiquitaire.
BM384872	Usp48	-1.6	*	*	<i>Ubiquitin specific protease 48.</i> Usp48 est un membre de la famille C19 des peptidases, également connue sous le nom de famille 2 d'hydrolases carboxyl-terminales de l'ubiquitine. Elle hydrolyse le lien peptidique de la glycine en C-terminal de l'ubiquitine. Elle est impliquée dans la transformation des précurseurs de la polyubiquitine et des protéines ubiquitinées. Elle est largement exprimée dans plusieurs tissus.
NM_080903	Rnf28	-1.5	*	*	<i>Ring finger protein 28.</i> Rnf28 est une ubiquitine ligase régulée à la hausse lors de l'atrophie musculaire. Elle facilite la dégradation protéique, et l'atrophie musculaire.
TRANSPORT INTRACELLULAIRE					
Catégorie/ GenBank	Gène	GHRH 4h	GHRH 16h	GHRH 64h	Rôle

NM_012700	Stx1b2	1.5	*	*	Syntaxine 1B2. Stx1b2 se lie aux canaux calciques de type N, et forme un complexe synaptique central. Elle est impliquée dans la fusion des vésicules synaptiques dans les régions présynaptiques actives, la transmission synaptique dépendante du calcium et le transport vésiculaire. La famille des syntaxines est exprimée dans le rein de rat : la syntaxine-4 est localisée sur la membrane apicale des cellules principales du tubule collecteurs, suggérant un rôle dans le ciblage des vésicules contenant les canaux aquaporine 2 à la membrane. Les syntaxines-2 et -3 sont exprimées dans le cortex et la médulla. L'ARNm de la syntaxine-3 est relativement abondant dans l'AH ascendante épaisse.
NM_080689	Dnm1	1.7	*	*	<i>Dynamitin 1.</i> Dnm1 induit l'hydrolyse du GTP, et joue un rôle dans l'endocytose des récepteurs dépendante de la clathrine et le recyclage des vésicules synaptiques. Il est nécessaire à l'internalisation du récepteur du facteur de croissance épidermique induite par l'agoniste.
AF000900	Nupl1	1.6	1.5	-1.3	<i>Nucleoporin like 1.</i> Nupl1 est une composante du complexe du pore nucléaire, qui est nécessaire au transport à travers la membrane nucléaire.
BF408070	---	-1.6	*	*	Similaire à la protéine de transport Sec24B. Cette protéine est membre de la sous-famille SEC24 de la famille SEC23/SEC24, qui est impliquée dans le transport des vésicules. Cette protéine est une composante de l'enveloppe qui recouvre les vésicules dérivées du réticulum endoplasmique (RE), impliquées dans le transport du RE vers le Golgi. Elle est exprimée dans plusieurs organes, dont le rein.

AA996943	Phactr1	-1.6	*	*	<i>Phosphatase and actin regulator 1.</i> Phactr1 inhibe l'activité de la phosphatase 1. Il interagit avec l'actine <input type="checkbox"/> -cytoplasmique, ce qui suggère une régulation de la dynamique du cytosquelette. Il inhibe la polymérisation de l'actine. Chez l'humain, exprimée dans plusieurs tissus, dont le rein.
AW141858	---	-1.6	*	*	<i>Dyserferin.</i> Cette protéine est membre de la famille ferline impliqué dans la contraction musculaire. Elle contient des domaines C2, qui jouent un rôle dans les événements de fusion membranaire activés par le calcium, suggérant un rôle dans la régénération et la réparation de la membrane. Elle lie la cavéoline-3, une protéine membranaire importante dans la formation des caveolae. Elle est hautement exprimée dans le muscle squelettique, et est également présente dans d'autres organes, et à faibles niveaux dans le rein.
AI179798	---	-1.5	*	*	<i>Similar to nucleoporin 62.</i> Les nucléoporines sont les composantes principales du pore nucléaire dans les cellules eucaryotes. Cette protéine s'associe avec le complexe importine alpha/beta, qui est impliqué dans l'importation de protéines contenant des signaux de localisation nucléaire.
HORMONE					
Catégorie/ GenBank	Gène	GHRH 4h	GHRH 16h	GHRH 64h	Rôle
M12138	Trh	1.5	*	*	<i>Thyrotropin releasing hormone.</i> Trh est un facteur hypothalamique stimulant la libération de TSH hypophysaire, présent dans plusieurs organes, dont le rein.
MÉDIATEURS DE L'INFLAMMATION					

Catégorie/ GenBank	Gène	GHRH 4h	GHRH 16h	GHRH 64h	Rôle
AJ222813	Il18	*	1.7	*	Interleukine 18. Il18 est une cytokine pro-inflammatoire, qui module les fonctions immunitaires. Elle est augmentée lors de l'ischémie rénale, et marqueur pour la nécrose tubulaire ischémique dans le rein. Elle est exprimée dans plusieurs tissus, dont le rein.
NM_013195	Il2rb	1.8	*	*	Chaîne bêta du récepteur de l'interleukine 2. L'expression est lentement régulée à la hausse (après 24h) par une stimulation mitogène des lymphocytes. Il2rb est impliquée dans l'endocytose du récepteur et dans la transduction des signaux mitogènes de l'interleukine 2.
A1236455	Anxa1	*	1.4	-1.5	<i>Annexin A1</i> . Anxa1 possède une activité anti-inflammatoire. Elle inhibe la phospholipase A2, nécessaire à la biosynthèse de médiateurs de l'inflammation.
NM_031644	Ptgds2	-1.7	*	*	Synthase 2 de la Prostaglandine D2. Ptgds2 catalyse l'isomérisation de la prostaglandine H2 à la prostaglandine D2 (PGD2) lors de la biosynthèse de la prostaglandine. Les prostaglandines jouent un rôle important dans l'inflammation et le maintien des fonctions physiologiques de plusieurs organes. PGD2 est présente dans l'AH ascendante épaisse et le tubule collecteur rénal. Effet vasodilatateur dans le rein.
AF367210	Il17	-1.5	*	*	Interleukine 7. Il17 est une cytokine pouvant être produite localement par les cellules épithéliales intestinales, et servant comme facteur de régulation pour les lymphocytes de la muqueuse intestinale. Elle joue un rôle essentiel dans la survie des cellules lymphoïdes.

AF253065	Cklf1	-1.5	*	*	Facteur 1 semblable à la chémokine. Cklf1 est une cytokine jouant un rôle dans les réponses immunitaires et inflammatoires. Elle peut jouer un rôle dans la régénération du muscle squelettique. Il s'agit d'une protéine chimiotactique positive pour les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes. Elle est hautement exprimée dans les testicules, et exprimée dans plusieurs autres tissus.
AUTRES FONCTIONS					
Catégorie/G enBank	Gène	GHRH 4h	GHRH 16h	GHRH 64h	Rôle
NM_022242	Niban	1.5	*	1.3	Protéine Niban. Niban est exprimé dans des carcinomes rénaux chez le rat Eker mutant pour le gène Tsc2, mais n'est pas exprimée dans le rein normal. Il peut être un marqueur pour un stade précoce de la carcinogénèse rénale.
NM_030584	Sost	1.8	*	*	Sciérostine. Sost est un antagoniste des protéines morphogénétiques osseuses (BMP), qui diminue l'activité ostéoblaste et diminue la différenciation des ostéoprogéniteurs. Il est largement exprimée à de faibles niveaux, les plus hauts niveaux étant dans les os, le cartilage, les reins, le foie, la moelle épinière et les ostéoblastes.
BF284899	---	1.5	*	*	<i>Similar to cell death activator CIDE-A.</i> Il s'agit d'un homologue de la protéine de souris Cidea, qui active l'apoptose.
NM_012826	Azgp1	1.5	*	*	<i>Alpha-2-glycoprotein 1, zinc.</i> Azgp1 stimule la dégradation des lipides dans les adipocytes, et cause les pertes de lipides associées aux cancers avancés. Il est présent dans plusieurs organes, dont le rein.

^a Les cellules d'AHm ont été exposées une fois au rGHRH(1-29)NH₂ suite à leur mise en culture, pendant une période de 4 h ou de 16 h, ou ont été exposées de façon répétée au rGHRH(1-29)NH₂ suite à leur mise en culture et toutes les 24 h, pendant une période de 64 h. Par la suite, l'ARN total a été extrait pour les études de régulation génique. L'ARN total a été hybridé à des puces d'ADN Affymetrix, et les profils d'expression génique ont été analysés à l'aide de la méthode RMA (*Robust Multichip Average*), qui permet d'obtenir des valeurs normalisées de l'intensité de l'hybridation du gène sur la biopuce. Critère de sélection: les gènes dont l'expression différentielle est égale ou supérieure à 1,3 fois. * : L'expression du gène n'est pas affectée par le GHRH. Ces informations sont tirées d'expériences effectuées chez le rongeur (rat ou souris) et l'humain. Information triée de la plus grande à la plus petite spécificité rénale connue dans la littérature. Les gènes n'étant pas surlignés en gris sont les gènes cibles anti-sens spécifiques. Une seule préparation d'ARN a été utilisée pour chaque condition.

4. DISCUSSION

Le GHRH-R est majoritairement localisé dans les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure, où il stimule la synthèse et la sécrétion de la GH (Barinaga et coll., 1985), et joue un rôle dans la prolifération (Billestrup et coll., 1986) et la différenciation (Dean et coll., 1999) cellulaire. De faibles niveaux d'ARNm du GHRH-R ont également été détectés par RT-PCR dans plusieurs tissus extra hypophysaires de rat, suggérant de nouveaux rôles pour le système GHRH/GHRH-R (Matsubara et coll., 1995). Cependant, seule la médulla rénale renferme des niveaux d'ARNm du GHRH-R détectables sans amplification (Matsubara et coll., 1995 ; Boisvert et coll., 2002). Une identité complète a été démontrée entre la séquence d'une portion de l'ADNc du GHRH-R rénal et la séquence de l'ADNc du GHRH-R hypophysaire (nucléotides 438 à 805) (Matsubara et coll., 1995), ainsi que la présence de mêmes transcrits dans ces deux tissus (Matsubara et coll., 1995 ; Boisvert et coll., 2002). Cependant, au niveau de la protéine, une hétérogénéité de la taille moléculaire du GHRH-R spécifique au tissu et à l'espèce a été rapportée. Chez l'humain, une étude par immunobuvardage a permis d'identifier des protéines de 52 et 55 kDa (Boulanger et coll., 1999) ou 50, 52 et 55 kDa dans l'hypophyse et de 52 kDa dans le rein (Fujinaka et coll., 1996). Chez le rat, une étude de réticulation chimique a permis de mettre en évidence la présence de protéines de 28, 47 et 65 kDa dans l'hypophyse antérieure et de protéines de 38, 55 et 65 kDa dans le rein (Boulanger et coll., 2002). De hauts niveaux d'ARNm du GHRH-R sont retrouvés dans l'AHm de la médulla rénale (Boisvert et coll., 2002). Des études de co-localisation immunocytochimiques, à l'aide de marqueurs de différents types de cellules rénales, ont été effectuées sur ce segment du néphron afin de déterminer la localisation précise du GHRH-R. Le GHRH-R a été co-localisé avec le canal chlore CIC-K1, à l'aide d'un anticorps anti-CIC-K1 et CLC-K2 (Boisvert et coll., 2001). Puisque le canal CLC-K2 n'est pas exprimé dans les cellules d'AHm, le signal obtenu provient de la détection de CIC-K1, qui est exclusivement situé dans les cellules d'AH ascendante mince (AHam) (Boisvert et coll., 2001).

Grâce au développement d'une culture primaire de cellules d'AHm purifiées et d'un RT-PCR quantitatif multiplex pour le GHRH-R rénal, des études de stimulation

au GHRH ont permis de mettre en évidence la présence d'un GHRH-R fonctionnel dans cette population cellulaire. Cette culture a d'abord été caractérisée par immunocytochimie, afin de préciser sa composition cellulaire en fonction de la durée de culture. Il a été rapporté que dans les cellules médullaires en culture, les cellules endothéliales disparaissent progressivement, puisqu'elles sont transformées en fibroblastes qui se multiplient rapidement (Grupp et coll., 1997). Ainsi, les rares cellules rondes marquées avec l'Ac anti-BSL-1, durant le premier 40 h de culture étaient vraisemblablement des cellules endothéliales, et les cellules fusiformes marquées après 64 h, des fibroblastes. Ceux-ci pouvaient provenir soit de cellules contaminantes post-purification, soit de cellules de l'AHm s'étant transformées en fibroblastes, durant la période de culture. Afin de vérifier cette dernière possibilité, une étude de co-localisation de marqueurs de cellules de l'AHm et de fibroblastes pourrait être effectuée en fonction de la durée de culture. Un marquage avec le DBA-FITC, spécifique aux cellules du tubule collecteur, a démontré que les préparations cellulaires purifiées d'AHm n'étaient que faiblement contaminées par ce type cellulaire. L'ensemble de ces résultats indique que les cellules purifiées d'AHm en culture contiennent des cellules d'AHm à plus de 80%. L'Ac anti-aquaporine, spécifique aux cellules de l'AH descendante mince, a révélé qu'environ 48% des cellules étaient marquées entre 16 et 64 h de culture. De plus, l'Ac anti-CIC-K1, spécifique aux cellules de l'AHam, a résulté en un immunomarquage d'environ 49% des cellules entre 16 et 64 h de culture. La préparation est donc riche en cellules de l'AH adhérentes ayant une bonne viabilité. De plus, les présents résultats indiquent que les préparations purifiées d'AHm renferment une quantité équivalente de cellules de l'AH ascendante et descendante minces, tel que rapporté dans la littérature (Grupp et coll., 1997).

Plusieurs études ont démontré que le GHRH peut réguler à la baisse l'expression de son récepteur hypophysaire. Bilezikjian et coll. (1986) ont observé une diminution de 50% du nombre de sites de liaison du GHRH, dans des cellules hypophysaires de rat. Aleppo et coll. (1997) ont démontré qu'un traitement de 4 h

avec 0.1-1nM de GHRH(1-44)NH₂ mène à une diminution de 50% des niveaux d'ARNm du GHRH-R dans l'hypophyse. Une diminution significative des niveaux d'ARNm du GHRH-R est observée suite à une exposition de 4 h à une concentration unique de rGHRH(1-29)NH₂, (1-100 nM) de cellules de l'AH semi-purifiées en culture primaire (Boisvert et coll., 2002). La mise au point d'un RT-PCR quantitatif multiplex dans les cellules de l'AHm purifiées a permis d'obtenir une méthode sensible et fidèle de la détection des niveaux d'ARNm du GHRH-R rénal. La stimulation de ces cellules en culture avec 10 nM de rGHRH(1-29)NH₂ a provoqué une diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R de 1.5 fois, ce qui met en évidence la présence d'un récepteur fonctionnel dans les cellules de l'AHm. Il pourrait s'agir d'un phénomène de désensibilisation homologue, où le GHRH désensibilise la cellule à sa propre action, en diminuant l'ARNm de son récepteur. Cette désensibilisation pourrait impliquer l'internalisation dépendante du ligand du GHRH-R. Une étude préliminaire du processus d'internalisation du GHRH, effectuée avec le ligand fluorescent N^α-5-carboxy-fluorescéinyle-[D-Ala², Ala⁸, Ala¹⁵, Lys²²]hGHRH(1-29)NH₂(Fluo-GHRH), un agoniste du GHRH-R dans les cellules somatotropes, a montré une internalisation du Fluo-GHRH dépendante du temps et de la température dans les cellules de l'AHm semi-purifiées (Boisvert et coll., 2002) et purifiées (Dubuisson et coll., 2003). L'approche de culture primaire de cellules d'AHm purifiées permettra donc d'effectuer des études complémentaires sur la cinétique d'internalisation, l'identification des voies d'internalisation et de recyclage du GHRH-R ainsi que la compartimentalisation intracellulaire dans les cellules d'AH ascendantes mince.

La fonctionnalité du GHRH-R rénal ayant été établie dans le modèle de cellules purifiées en culture primaire, les voies de signalisation impliquées dans la régulation des niveaux d'ARNm du récepteur par son ligand ont été étudiées. Dans les cellules somatotropes, la liaison du GHRH à son récepteur stimule la production d'AMPC (Mayo et coll., 1992). Aleppo et coll. (1997) ont démontré que la diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R observée suite à un traitement de 4 h au GHRH, dans les cellules somatotropes, requiert l'activation de la voie AC. Les séquences partielles du GHRH-R hypophysaire et rénal étant identiques (Matsubara et coll., 1995), il est

possible que la voie AC soit impliquée dans les cellules de l'AHm comme dans les cellules somatotropes. Des résultats préliminaires (Paré et coll., 2001) ont montré que la stimulation du GHRH-R par le GHRH dans les cellules de l'AH semi-purifiées provoque une augmentation des niveaux d'AMPc. Le système AC-AMPc-PKA a été étudié dans les cellules d'AHm purifiées en culture. L'inhibiteur de la voie AC (2', 5'-didéoxyadénosine) a empêché la régulation à la baisse des niveaux d'ARNm du GHRH-R, suite à une stimulation de 4 h au GHRH, suggérant que l'action du GHRH, du moins en partie, implique la voie AC dans les cellules d'AHm. La voie MAPK, impliquée dans la prolifération cellulaire des cellules hypophysaires (Pombo et coll., 2000 ; Zeitler et coll., 2000), a également été étudiée dans les cellules d'AHm en culture. L'addition d'un inhibiteur spécifique de MEK1/MEK2 (U0126) empêche la régulation à la baisse des niveaux d'ARNm du GHRH-R, suite à une stimulation de 4 h au GHRH. Ces résultats indiquent donc une implication des voies AC et MAPK dans la régulation GHRH-dépendante du GHRH-R, dans les cellules de l'AHam.

D'autres voies de signalisation sont impliquées de façon accessoire dans l'action biologique du GHRH-R hypophysaire. En effet, dans les cellules somatotropes, le GHRH-R est lié à une protéine Gp qui active la phospholipase C et la PKC (Frohman et coll., 1996). Il a été montré qu'une stimulation par des activateurs de la PKC augmente la sécrétion de GH (Judd et coll., 1986). Ainsi, comme décrit pour l'hypophyse, d'autres voies de signalisation pourraient être activées en réponse au GHRH dans les cellules de l'AHam. Il sera également important d'étudier les voies PI3K/ PKB (akt), qui sont impliquées dans la survie, la croissance et la prolifération cellulaire (Fresno et coll., 2004), dans ces cellules.

Nous avons montré que le signal obtenu par RT-PCR pour l'ARNm du GHRH-R varie en fonction de la période de culture. En effet, 20 cycles d'amplification ont été suffisants pour observer un bon signal dans des cellules de l'AHm exposées 4 h au rGHRH(1-29)NH₂, immédiatement après la mise en culture, alors qu'une culture de 20 h a nécessité une amplification de 30 cycles pour générer un signal. Ce même signal était absent à 20 ou 30 cycles d'amplification après une période de culture de

64 h. La diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R, observée en fonction de la durée de culture, pourrait être due à un certain changement de phénotype cellulaire, non détecté par les études d'immunocytochimie. Malgré la détection des canaux CIC-K1 après 64 h de culture, le phénotype cellulaire pourrait se modifier en fonction de la période de culture. Les conditions de culture utilisées pourraient s'avérer sous-optimales pour maintenir toutes les caractéristiques initiales des cellules de l'AHm, bien que Grupp et coll. (1998) n'aient pas rapporté de modification de phénotypes. Une mise au point des conditions de culture devra être effectuée pour permettre des études à plus long terme du GHRH-R dans les cellules de l'AHm.

La détection du GHRH-R dans une population cellulaire spécifique comme les cellules de l'AHam suggère un rôle dans la spécialisation de cette portion du néphron. Le GHRH-R hypophysaire stimulant la prolifération et la différenciation des cellules somatotropes, le récepteur rénal pourrait jouer un rôle similaire dans les cellules de l'AHam. Afin de mieux comprendre le rôle du système GHRH / GHRH-R dans l'AHam, les gènes régulés suite à une stimulation unique (4 ou 16 h de culture) ou répétée (64 h de culture) au GHRH, ont été identifiés par une étude de régulation génique.

La quantité de gènes dont l'expression est régulée différemment suite à une stimulation au GHRH varie selon la période de culture. En effet, dans les cellules mises en culture 4 h, suite à une exposition au rGHRH(1-29)NH₂, 111 gènes ont été régulés de façon différentielle, tandis que dans les cellules mises en culture 16 h suite à une exposition au rGHRH(1-29)NH₂, seulement 13 gènes ont été régulés de façon différentielle. Dans les cellules exposées au rGHRH(1-29)NH₂ suite à leur mise en culture et de façon répétée toutes les 24 h, pendant une période de 64 h, 13 gènes ont été régulés de façon différentielle. Cette observation est concordante avec les résultats obtenus par RT-PCR, montrant que les niveaux d'ARNm du GHRH-R diminuent en fonction de la période de culture (Figure 10). Ainsi, la régulation génique observée sur biopuces est médiée par l'activation du GHRH-R, dont

l'abondance diminue en fonction de la période de culture.

La séquence partielle du gène du GHRH-R hypophysaire natif de rat et de ses isoformes, ainsi que la position des différentes sondes utilisées dans l'étude de régulation génique, sont détaillées à la Figure 14. L'ensemble de sondes 1370730_A_AT (Figure 15) a montré une augmentation de l'expression du gène du GHRH-R après 4 h de stimulation au GHRH, dans les cellules de l'AHm (Tableau 3). D'autres résultats, obtenus à l'aide d'un ensemble différent de sondes reconnaissant le GHRH-R, 1369494_A_AT (Catégorie/GenBank : NM_012850) (Figure 14), ne montrent pas d'expression différentielle suite à une stimulation au GHRH.

La divergence des résultats obtenus par les différentes sondes des biopuces et par RT-PCR pourrait être expliquée par la présence d'un épissage alternatif du GHRH-R rénal. Par exemple, un transcrite du GHRH-R hypophysaire a été décrit par l'équipe de Kacsoh (2001) (banque PUBMED nucleotide, no d'accès : AF409106), et l'amplification de ce transcrite pourrait expliquer la variation observée dans les résultats obtenus. Selon Matsubara et coll. (1995), une partie de la séquence du GHRH-R rénal est identique à celle du GHRH-R hypophysaire (nucléotides 438 à 805). Cette séquence partielle est incluse dans la séquence du récepteur hypophysaire natif de rat et de ses deux isoformes connus (Figure 14). Ainsi, dans les cellules d'AHm, un épissage alternatif pourrait être présent avant ou après cette région. Dans la médulla rénale, les transcrits d'ARNm du GHRH-R sont 1.3 fois moins abondants pour le 4 kb et 2.3 fois moins abondants pour le 2.5 kb, que dans l'hypophyse (Boisvert et coll., 2002). Les deux ensembles de sondes utilisés sur les biopuces reconnaissent différents segments de la séquence du GHRH-R hypophysaire, qui sont compris entre les nucléotides 1152 et 1380, mais 1370730_A_AT reconnaît également une partie de la séquence en 5' entre les nucléotides 28 et 79 (Figure 14), ce qui peut expliquer la différence observée dans les résultats obtenus par les deux ensembles de sondes. Les sondes de la biopuce ne s'hybrident pas à la même région du gène du GHRH-R hypophysaire que les sondes utilisées dans le RT-PCR (Figure 14).

Figure 14 : Représentation schématique de la séquence partielle du gène du GHRH-R hypophysaire de rat.

```

1      aaacagcggg ctacaggcac cactgccATG GACAGCCTGT TGTGGGCTAC CTGGGTCCTC
61     TGCTTGCTGA ACCTGTGGGG AGTTGCACTG GGTACCTCC ACCTAGAATG TGACTTCATC
121    ACTCAGCTGA GAGACGATGA GCTTGCAATG CTTCAGGCGG CAGAGGGGAC CAACAACCTCG
181    TCCATGGGAT GCCCTGGGAC CTGGGATGGG CTGCTGTGCT GGCCCCAAC TGGCTCTGGC
241    CAGTGGGTCT CCCTCCCCTG CCCTGAATC TTCTCTCAT TGGCTCAGA CCCAGGGGCT
301    GTGAAAAGGG ACTGCACCAT CACGGGTGG TCTGATCCCT TCCCACCATA TCCCGTGGCC
361    TGTCCTGTGC CCTTGGAACT GCTAACAGAG GAGAAGTCTT ACTTCTCCAC GGTGAAGATC
421    ATCTACACCA CAGGCCACAG CATCTCCATT GTAGCCCTCT GCGTGGCTAT TGCCATCCTG
481    GTTGCTCTCA GGAGGCTCCA CTGCCCCAGG AACTACATCC ACACGCAGCT GTTTGCTACT
541    TTCATCCTCA AGGCCAGTGC TGTGTTCCCTG AAGGATGCTG CTGTCTCCA GGGTGATAGC
601    ACGGACCACT GCAGCATGTC CACTATTCTG TGCAAGGCTC CTGTGGCCGT CTCACATTTT
661    GCCACCATGA CCAACCTCAG CTGGCTGCTG GCAGAAGCCG TCTACCTGAG CTGTCTGTTG
721    GCCTCCACAT CTCCTAGGTC CAAACCAGCT TTCTGGTGGC TGGTTCGCG TGGCTGGGGA
781    CTCCCTGTGC TATGCACTGG TACGTGGGTG GGCTGCAAAC TGGCTTTTGA GGACACTGCG
841    TGCTGGGACC TAGACGACAG CTCCCCCTAC TGGTGGATCA TCAAAGGGCC CATAGTCTCT
901    TCTGTTGGGG TGAACTTTGG GCTGTTTCTC AATATAATTT GCATCTGCT GAGGAAGCTG
961    GGGCCTGCAC AAGGCGGCTT ACACACACGG GCTCAGTACT GCAACTATTT ATTACCTTGG
1021   TCCTGTCCCT TTCTTCAAGT TCCTAGAGAG AGAACAGATC TGGGCCCTTC GTCCCATGAG
1081   ATTACAGTAC AGGAAAGTGG CACACGAAAC TGCCAGTTAC CATGGCGGCT TTCCAAATCA
1141   ACACTTCTCC TTATCCCGCT GTTTGGAATT CATTACATCA TCTTCAACTT CCTGCCTGAC
1201   AGTGCTGGCC TTGGCATCCG TCTACCCCTG GAGCTGGGAC TGGGGTCCCT CCAGGGTTTT
1261   GTTGTTGCTG TCCTCTACTG CTTCTCAAT CAAGAGGTGA GGACGGAGAT TTACAGCAA
1321   TGGTATGGCC ATGACCCTGA ACTTCTGCCA GCTCGGCGGA CCTGCACTGA GTGGACCACA
1381   CCTCCCCGAT CGAGAGTGAA GGTGCTCACC TCTGAGTGTCT AGGCCAGCCA TCACAAAGGC
1441   CGAGCCCCAA AACCTGCAC TCAAACAGCC ATGCCACCAA GGGCAACAAG GTCCCTCCCTT
1501   CCGTCTCAT TCTCTGCATC TGCTTCTCT AGTCCCTGT ATACCAACCT CCGACTTCT
1561   CAGTTCCTGT ATGCCCCAT CTGTTCTTTC TTCCCTATCTA GGCTATTGCC CAAGGCCAG
1621   GGAAACCAAt aaactgttac atgagtgatc tgcagttgag tcaatgtgac tctgaagggg
1681   agctcttgct agcagccatt atttgcaact ccggtgcatt cctcatcctc tggtgcagc
1741   tgctcattg cc

```

Légende :

- Lettres majuscules : cadre de lecture ouvert
- Lettres majuscules en gras : insertion de 123 nts (1001-1123), isoforme 2C
- Lettres majuscules italiques : délétion de 131 pb(1402-1531), isoforme Beta
- Région verte : région amplifiée par les amorces sélectionnées pour notre RT-PCR
- Région fuchsia : région amplifiée par les amorces décrites par Matsubara et coll. (1995). Seul segment séquencé du GHRH-R rénal. Sa séquence est identique à celle du GHRH-R hypophysaire.
- Souligné et en jaune : sondes 1370730_A_AT de l'étude de régulation génique par biopuces
- Encadré pointillé (incluant la portion soulignée et jaune de 1370730_A_AT) : sondes 1369494_A_AT de l'étude de régulation génique par biopuces
- Les régions couvertes par les ensembles de sondes 1379730_A_AT et 1369494_A_AT collent à 100% à la région 117-429 pb du transcrit rGHRH-R épissé alternativement (Pubmed nucleotide, no d'accès : AF409106), décrit par l'équipe de Kacsoh (2001).

Les sondes utilisées dans chaque technique ne se liant pas à la séquence spécifique des isoformes β (Zeitler et coll., 1998) et 2C (Mayo et coll., 1992) du GHRH-R (Figure 14), peuvent donc amplifier le récepteur natif et/ou différentes isoformes du GHRH-R rénal, qui n'ont pas encore été décrites. De plus, la séquence du transcrit rapporté dans l'hypophyse par Kacsoh (2001) contient toutes les régions reconnues par les sondes de la biopuce et non la sonde utilisée en RT-PCR, ce qui peut également expliquer les divergences observées (Figure 14). Comme la séquence complète du GHRH-R rénal est encore inconnue, des isoformes ont peut-être été reconnues par les sondes de la biopuce, mais non par celle utilisée dans le RT-PCR. Compte tenu de ces explications, les résultats obtenus par RT-PCR nous apparaissent supérieurs.

Le GHRH-R rénal pourrait être impliqué dans la prolifération de l'AHam, aidant au maintien de la capacité du rein à concentrer l'urine. En situation normale, les cellules du néphron se divisent à un rythme lent (Nadasdy et coll., 1994). Cependant, une étude chez l'humain adulte en santé démontre que la perte de cellules épithéliales tubulaires rénales dans l'urine est relativement constante (78 200 cellules/h chez l'homme, et 68 000 cellules/h chez la femme) (Prescott et coll., 1966). Cette perte cellulaire doit être compensée par une prolifération cellulaire. Une perte de la capacité du néphron ou une croissance anormale des reins pourrait être observée si ce processus n'était pas contrôlé de façon rigoureuse (Bonventre, 2003).

Plusieurs gènes de facteurs de transcription reliés à la prolifération cellulaire sont exprimés à la hausse suite à une stimulation de 4 h au GHRH (Tableau 3), par exemple le facteur de réplication C, ou RFC1 (Recc1), qui joue un rôle dans l'activation de la réplication et de la réparation de l'ADN, chez *Saccharomyces cerevisiae* (Cullmann et coll., 1995). De plus, la structure, fonction et séquence d'acides aminés de l'appareil de réplication de l'ADN sont conservées de la levure à l'humain (Cullmann et coll., 1995). Les *short stature homeobox 2* (Shox2) sont des régulateurs positifs de la transcription et de la croissance et des anomalies de SHOX causent le phénotype du syndrome de Turner, où les patients ont une petite stature

et des anomalies rénales (Clement-Jones et coll., 2000). L'*early growth response 2* (Egr2) est un facteur de transcription ayant trois doigts de zinc de type C₂H₂ en tandem et qui pourrait jouer un rôle dans la régulation positive de la prolifération cellulaire (Warner et coll., 1998).

De plus, plusieurs gènes impliqués spécifiquement dans la prolifération cellulaire sont régulés à la hausse suite à une stimulation au GHRH (Tableau 3). La cycline B1, indispensable à l'induction de la mitose, est régulée à la hausse suite à une stimulation de 4 h au GHRH. Les cyclines sont des protéines clés qui contrôlent l'entrée et la progression de la cellule dans le cycle de prolifération cellulaire (Verschuren et coll., 2004). La cycline B1 forme un complexe avec la kinase dépendante des cyclines 1 (Cdk1) et induit la progression des phases S et G2/M de la mitose (Verschuren et coll., 2004). Les Cdk sont inhibées par une phosphorylation de résidus thréonines spécifiques et sont réactivées par la phosphatase du cycle de division cellulaire 25A (Cdc25a) (Verschuren et coll., 2004). Un traitement de 4 h au GHRH augmente les niveaux d'expression de Cdc25a, qui active la prolifération cellulaire. L'ADN topoisomérase 2 alpha, une enzyme nucléaire impliquée dans la condensation des chromosomes et dans le maintien de la stabilité du génome pendant la transcription et la réplication de l'ADN (Wang, 1996), est régulée à la hausse suite à une stimulation de 4 h au GHRH. Un traitement de 4 h et 64 h au GHRH augmente l'expression de la *phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2* (Pik3r2), impliquée dans la voie de signalisation Pi3K/akt, qui résulte en la survie, la croissance et la prolifération cellulaire (Fresno et coll., 2004). Plusieurs autres gènes impliqués dans la croissance cellulaire sont régulés à la hausse suite à une stimulation au GHRH, tel que le facteur de croissance placentaire, le *multiple EGF (epidermal growth factor)-like-domain protein 3*, le *chromosome 6 open reading frame 108*, l'antigène CD53 et la *formin binding protein 2* (Tableau 3). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle du GHRH-R dans la prolifération des cellules de l'AH ascendante mince (Figure 15).

Par ailleurs, un mécanisme doit être en place afin de permettre une réaction

rapide et efficace suite à un événement causant la mortalité cellulaire, tel que l'ischémie rénale (Bonventre, 2003). En effet, le taux de prolifération des cellules épithéliales augmente drastiquement lors de la récupération, suite à une ischémie rénale (Bonventre, 2003). Les cellules tubulaires rénales peuvent récupérer complètement d'un traumatisme ischémique ou cytotoxique causant la mort cellulaire, contrairement aux cardiomyocytes ou aux neurones (Bonventre, 2003). Suite à une ischémie rénale, les cellules épithéliales survivantes se dédifférencient et prolifèrent, afin de rétablir le nombre de cellules, puis se différencient, afin de rétablir l'intégrité du néphron (Bonventre, 2003). Les cellules dédifférenciées perdent leur spécialisation, et se divisent rapidement de façon contrôlée, après un traumatisme, ou de façon non contrôlée, lors du cancer (Bonventre, 2003). L'expression génique est modifiée dans les cellules dédifférenciées, qui expriment des gènes présents au cours du développement (Bonventre, 2003).

De tels gènes, présents spécifiquement au cours du développement du rein et non dans le rein adulte, ont été modulés suite à une stimulation au GHRH dans l'AHam (Tableau 3). Le gène du facteur de transcription *Wingless-type MMTV integration site family, member 4* (Wnt-4), signal autocrine pour la formation de l'épithélium au stade prëtubulaire de formation du néphron (Sariola et coll., 1998) et impliqué dans le début de la tubulogénèse (Horster et coll., 1999), est régulé à la hausse après 4 et 64 h de stimulation au GHRH. Comme une perte du GHRH-R a été constatée suite à 64 h de culture des cellules de l'AHm, l'effet observé après cette période n'est pas totalement spécifique à l'action du GHRH. Par ailleurs, une augmentation des niveaux d'ARNm et de l'expression protéique de Wnt-4 a été détectée dans un homogénat de rein de rat, après l'induction d'une insuffisance rénale *in vivo* (Terada et coll., 2003). Les facteurs de transcription Wnt altèrent l'expression de gènes spécifiques, impliqués dans les interactions cellulaires, la prolifération et le développement, *via* les activateurs de la transcription hétérodimériques bêta-caténine et TCF4E, l'un des quatre membres de la famille TCF (T-cell factor) (Hecht et coll., 2000 ; Hecht et coll., 2003). En effet, une régulation à la hausse du facteur de transcription similaire à TCF4E est observée

suite à une stimulation de 4 h au GHRH. De plus, l'expression du *glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1* (Gfra1) a été régulée à la hausse après 4 h de stimulation au GHRH. La liaison de Gfra1 au *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) permet la formation d'un complexe avec le récepteur des protéines tyrosines kinases Ret, et induit sa phosphorylation et son activation (Treanor et coll., 1996). Gfra1 joue un rôle dans le développement des reins *via* GDNF et Ret, qui activent la prolifération cellulaire et l'induction de l'embranchement du bourgeon urétéral (Horster et coll., 1999). Plusieurs autres gènes impliqués dans la différenciation cellulaire sont modulés suite à une stimulation au GHRH (Tableau 3). La différenciation des cellules de l'AH au stade pré natal lors de la formation du rein, et/ou la dédifférenciation suite à une agression rénale, suivie d'une différenciation pour restaurer l'intégrité des cellules de l'AH ascendantes mince, pourraient donc être modulées par l'activation du GHRH-R (Figure 15).

De plus, les valeurs RMA observées, qui sont les valeurs normalisées de l'intensité de l'hybridation du gène sur la biopuce, observées pour le GHRH (RMA = 4), et différents gènes impliqués dans la spécialisation cellulaire de l'AHam, dont le récepteur V2 de la vasopressine (RMA = 4) ou le canal CIC-K1 (RMA = 7) sont semblables. Ces résultats, qui suggèrent une expression du GHRH dans les cellules de l'AHam, vont dans le même sens que ceux de Matsubara et coll. (1995), qui ont détecté l'ARNm du GHRH dans la médulla rénale par immunobuvardage Southern. Le GHRH pourrait aussi être sécrété dans la médulla rénale au cours du développement du néphron, ou suite à une agression rénale, et agir de façon paracrine ou autocrine sur le GHRH-R, situé sur les cellules de l'AHam. Suite à la stimulation du GHRH-R, les gènes de la différenciation pourraient être activés au cours du développement et/ou les gènes impliqués dans la dédifférenciation, la prolifération et la différenciation cellulaire pourraient être activés et contribuer à la réparation de ce segment du néphron, essentiel au mécanisme de concentration de l'urine. Il sera important d'identifier la localisation précise du GHRH rénal, afin de mieux comprendre le mécanisme de régulation de ce système peptidergique.

Les molécules d'adhésion cellulaire jouent un rôle important dans les processus de prolifération et la différenciation cellulaire (Bonventre, 2003). L'expression de *neural cell adhesion molecule 1* (NCAM1) est diminuée après 4 h, 16 h et 64 h de stimulation au GHRH, par deux ensembles de sondes différentes (Tableau 3). Chez le rat, NCAM est exprimée de façon transitoire au cours de la formation du néphron (Abbate et coll., 1999). Cependant, cinq jours post-ischémie, un marquage élevé de NCAM a été détecté par immunocytochimie dans les tubules proximaux du néphron (Abbate et coll., 1999). Cette augmentation de la protéine NCAM, induisant l'adhésion cellulaire, suggère un rôle important dans le processus de guérison du néphron (Abbate et coll., 1999). La baisse d'expression du gène de NCAM observée suite à une stimulation de 4 h au GHRH peut être due à une augmentation rapide de la traduction de l'ARNm en protéine, afin d'augmenter la quantité de NCAM à la membrane. Toutefois, la diminution de l'expression de NCAM observée après 16 h et 64 h n'est pas totalement spécifique à l'action du GHRH, car une perte progressive du GHRH-R a été constatée à ces temps de culture. L'ARNm de la cadhérine 6 (Cdh6), également nommée cadhérine K, est régulé à la hausse suite à une stimulation de 4 h au GHRH. Des études d'hybridation *in situ* ont permis de localiser l'ARNm de cette cadhérine dans les cellules épithéliales néphroblastiques au cours de la glomérulogénèse chez le rat, suggérant un rôle dans le développement du rein (Xiang et coll., 1994). L'expression de *stress activated protein kinase-associated protein 1* (JASP1) est augmentée après 4 h de traitement au GHRH. Une étude dans la lignée cellulaire Hela a démontré que JSAP1, un facteur de la cascade des MAPK, forme un complexe avec la *focal adhesion kinase* (FAK) et facilite la formation de fibres d'actine et l'adhésion cellulaire (Takino et coll., 2002). L'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion cellulaire par le GHRH suggère un rôle dans la prolifération et différenciation cellulaire par le GHRH-R.

Les chémokines sont des protéines contrôlant plusieurs aspects de la prolifération, la migration, et l'adhésion cellulaire (Segerer et coll., 2000). La *chemokine (C-X-C motif) ligand 12* (Cxcl12), qui est exprimée dans le rein en développement (Grone et coll., 2002), est diminuée suite à une stimulation de 4 h au

GHRH. La fonction de Cxcl12 dans le développement rénal est inconnue, mais un rôle dans l'organogénèse et le contrôle de la microvascularisation, lors de la guérison suite à une blessure et lors de l'embryogenèse, a été proposé (Grone et coll., 2002).

La modulation de gènes impliqués dans la spécialisation des cellules de l'AH ascendante mince a été observée suite à une stimulation au GHRH. Durant les deux premières semaines après la naissance, les AH ascendantes minces sont créées progressivement suite à l'apoptose des cellules de l'AH ascendante épaisse immature (Kim et coll., 1996). Cha et coll. (2001) ont démontré par immunocytochimie que les cellules de l'AH ascendante mince ne sont pas dérivées de cellules en prolifération. Jung et coll. (2002) suggèrent un rôle de l'aldose réductase dans la différenciation cellulaire et la protection des cellules de l'AHm de l'apoptose, puisqu'elles expriment l'aldose réductase, alors que les cellules apoptotiques de l'AH ascendante épaisse ne l'expriment pas. L'aldose réductase joue également un rôle dans la concentration de l'urine (Jung et coll., 2002). Suite à une insuffisance rénale, les cellules tubulaires rénales sont altérées ou nécrosées, causant une inhibition de leurs fonctions de réabsorption (Cowley et coll., 1995). En effet, le volume urinaire est augmenté et contient une grande concentration de NaCl, indiquant une déficience du mécanisme de concentration de l'urine (Cowley et coll., 1995). Une diminution des niveaux d'ARNm de l'aldose réductase, qui est fortement exprimée dans le rein mature, a été observée suite à une insuffisance rénale chez le rat (Cowley et coll., 1995). Les niveaux de l'aldose réductase se normalisent de 7 à 10 jours après l'induction de l'insuffisance rénale (Cowley et coll., 1995). Les résultats obtenus dans l'étude de régulation génique montrent une diminution de l'expression du gène de l'aldose réductase suite à une stimulation de 4 h au GHRH dans l'AHm, ce qui suggère un rôle dans la prolifération et le maintien de l'intégrité cellulaire.

Uchida et coll. (1995) ont démontré par immunocytochimie la présence de CIC-K1 exclusivement dans les cellules de l'AHm. La localisation tant au niveau de la membrane apicale que basolatérale supporte le rôle de CIC-K1 comme transporteur transépithélial du Cl⁻ (Uchida et coll., 1995). Une des principales fonctions connues de

l'AHam étant la réabsorption de Cl^- via le canal CIC-K1, ce qui permet la concentration de l'urine (Uchida et coll., 1995), le GHRH-R pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activité ou de l'expression de CIC-K1. En effet, au cours du développement, l'expression du GHRH-R (Boisvert et coll., 2002) est en corrélation avec celle de CIC-K1 (Kobayashi et coll., 2001), suggérant l'implication du GHRH-R rénal dans la régulation de la perméabilité au Cl^- dans l'AHam.

Suite à une période de culture de 16 h en présence de GHRH, les niveaux d'ARNm du canal chlore CIC-K1 sont régulés à la baisse, ce qui pourrait se traduire en une diminution de la concentration de protéine. La diminution de l'ARNm étant observée seulement après 16 h et non 4 h, elle pourrait être due à un effet indirect du GHRH, via l'activation d'un autre gène régulateur (Figure 15). Le canal CIC-K1, cloné dans le rein de rat, possède 13 domaines transmembranaires (Uchida et coll., 1994). Des résultats préliminaires ont démontré la présence d'une homodimérisation ligand-dépendante du GHRH-R humain et de rat, suite à une stimulation au GHRH (Thériault et coll., 2004). Une étude de la présence d'hétérodimérisation entre le GHRH-R et le CIC-K1 devra être entreprise afin de vérifier l'interaction potentielle entre ces deux protéines membranaires.

Plusieurs gènes de canaux ioniques et de transporteurs ont été régulés suite à une stimulation au GHRH, mais ces canaux ne sont pas tous spécifiques à l'AHam (Tableau 3).

Le récepteur V2 de la vasopressine (Avpr2) a été cloné dans le rein de rat et possède les 7 domaines transmembranaires caractéristiques des récepteurs couplés aux protéines G (Lolait et coll., 1992). Son activation par la vasopressine provoque l'augmentation de la ré-absorption de Cl^- par le canal CIC-K1. Il participe ainsi au mécanisme de concentration de l'urine dans les cellules de l'AH ascendante mince (Takahashi et coll., 1995). Les sondes reliées au gène de ce récepteur sur les biopuces reconnaissent également gène de la protéine activatrice 4 de la Rho GTPase (Arhgap4), un gène apparenté à Avpr2. Arhgap4 est retrouvé dans le

système nerveux et ne semble pas jouer de rôle dans la régulation de la fonction rénale. Toutefois, *Arhgap4* est situé sur le même chromosome qu'*Avpr2*. La série de sondes spécifiques à *Arhgap4* montre que son expression est diminuée après 4 h de stimulation au GHRH, et augmentée après 16 h de stimulation. Une deuxième la série de sondes reconnaissant les deux gènes montre une régulation à la hausse de 1.24 fois, après 4 h de stimulation au GHRH. Ce résultat n'est pas représenté dans le Tableau 3, étant inférieur à la valeur seuil sélectionnée. Par déduction, il peut être suggéré que l'expression spécifique de *Avpr2* puisse être régulée à la hausse après 4 h de stimulation au GHRH. Cette hypothèse devra être validée par PCR en temps réel, à l'aide de sondes spécifiques pour *Avpr2*. Une telle régulation à la hausse pourrait être conduire à une augmentation de la concentration d'*Avpr2* à la membrane cytoplasmique et une augmentation du transport de Cl^- par les canaux *CLC-K1* (Figure 15). Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle le GHRH-R influence l'expression de différents gènes exprimés spécifiquement dans l'AHam.

L'expression d'autres récepteurs couplés aux protéines G que *Avpr2* est modulée suite à une stimulation au GHRH (Tableau 3). Par exemple, l'analogue du récepteur de la calcitonine (symbole précédent: CRLR) (*Calcrl*), qui lie le peptide relié au gène de la calcitonine ou l'adrénomédulline (Choksi et coll., 2002), est régulé à la hausse suite à une stimulation de 4 h au GHRH. La calcitonine régule le cotransport $\text{Na}^{(+)}\text{-K}^{(+)}\text{-Cl}^-$ en activant l'AMPc dans l'AH ascendante épaisse chez le lapin (Vuillemin et coll., 1992). L'adrénomédulline exerce des actions vasodilatatrices, diurétiques et inhibe la croissance cellulaire des cellules endothéliales et mésangiales glomérulaires rénales, en agissant de façon paracrine ou endocrine sur les tubules rénaux (Mukoyama et coll., 2001). Une régulation à la hausse de l'expression de *Calcrl* a été observée suite à une agression rénale (Mukoyama et coll., 2001). Le récepteur de la galanine de type 1 (*Gpr135*) est également régulé à la hausse suite à une stimulation de 4 h au GHRH. Il a été démontré qu'une infusion de galanine augmente les niveaux plasmatiques de la GH (Bauer et coll., 1986). La galanine agit sur le rein en augmentant le flux sanguin rénal, le taux de filtration glomérulaire et la concentration de glucose plasmatique

(Premen et coll., 1989). De plus, une augmentation de l'expression du gène *regulator of G-protein signalling 19* ou *Gaip* (Rgs19) a été observée après 4 h de traitement au GHRH. Rgs19 atténue l'inhibition de la synthèse d'AMPc par la protéine Galpha i dans des cellules HEK293 (Huang et coll., 1997), ce qui suggère une plus grande activation de l'AC suite à une stimulation au GHRH, dans les cellules de l'AHam.

Plusieurs enzymes sont modulées suite à une stimulation au GHRH (Tableau 3), indiquant une augmentation de l'activité cellulaire suite à une stimulation au GHRH. Par exemple, l'expression de la méprine 1 alpha (Mep1a) est régulée à la baisse suite à une stimulation au GHRH 4 h. Mep1a, hautement exprimée dans le rein, est cytotoxique pour des cellules épithéliales tubulaires rénales en culture, et l'inhibition de la méprine protège contre le dommage causé par l'hypoxie-réoxygénation (Carmago et coll., 2002). Suite à une agression rénale, la méprine est redistribuée à la membrane basolatérale des tubules rénaux, qu'elle dégrade partiellement (Walker et coll., 1998). La régulation à la hausse de plusieurs enzymes suite à une stimulation au GHRH, dont *alpha3-fucosyltransferase 11, similar to proline dehydrogenase*; PRODH et *ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6* (Tableau 3) suggère un rôle dans le métabolisme cellulaire. De plus, plusieurs gènes impliqués dans la protéolyse sont régulés à la hausse suite à une stimulation de 4 h au GHRH, par exemple *ubiquitin-activating enzyme E1* et plusieurs sont régulées à la baisse, dont *ubiquitin specific protease 48* (Tableau 3). Ces résultats suggèrent un rôle du GHRH-R dans la régulation des mécanismes de contrôle de la dégradation des protéines.

Une stimulation au GHRH module également plusieurs gènes impliqués dans le transport intracellulaire. Par exemple, la syntaxine 1B2 (Stx1b2) est régulée à la hausse après 4 h de traitement au GHRH. La famille des syntaxines est observée dans le rein. Les syntaxines -2, -3 et -4 sont exprimées dans le cortex et la médulla rénale (Mandon et coll., 1997), mais aucune étude portant sur la Stx1b2 dans le rein n'a été rapportée. Des expériences de RT-PCR ont montré que l'ARNm de la syntaxine-3 est relativement abondant dans l'AH ascendante épaisse et dans les

cellules du tubule collecteur, et exprimé à de plus faibles niveaux dans d'autres structures, incluant l'AHm (Mandon et coll., 1997). La syntaxine-4 est localisée sur la membrane apicale des cellules principales du tubule collecteurs, suggérant un rôle dans le ciblage des vésicules contenant les canaux aquaporine 2 à la membrane (Mandon et coll., 1996). Une étude de RT-PCR a démontré la présence de l'ARNm de la syntaxine-4 dans l'AH descendante mince (Mandon et coll., 1996). Il pourrait être supposé que la *Stx1b2* jouerait un rôle analogue à la syntaxine-4, et ciblerait CIC-K1 à la membrane. La *dynamin1*, qui joue un rôle dans l'endocytose des récepteurs dépendante de la clathrine (Sever et coll., 2000), est également régulée à la hausse suite à 4 h de stimulation au GHRH. Ces résultats suggèrent un rôle du GHRH-R dans la régulation du transport intracellulaire.

L'expression de gènes de médiateurs de l'inflammation est modulée suite à une stimulation au GHRH (Tableau 3). La plupart de ceux-ci sont régulés à la baisse, suggérant que le GHRH n'exerce pas d'action pro-inflammatoire, mais possiblement de type anti-inflammatoire dans le rein.

Plusieurs gènes impliqués dans le cancer sont régulés à la hausse ou à la baisse suite à une stimulation au GHRH. Par exemple, la protéine Niban, exprimée dans des carcinomes rénaux chez le rat Eker mutant pour le gène *tuberous sclerosis 2* (*Tsc2*), mais non exprimée dans le rein normal (Adachi et coll., 2004), est régulée à la hausse suite à 4 h et 64 h de stimulation au GHRH. Toutefois, une perte du GHRH-R ayant été observée suite à 64 h de culture des cellules de l'AHm, l'effet observé après cette période n'est pas totalement spécifique à l'action du GHRH. Le gène *eukaryotic elongation factor-2 kinase* (*eEF2k*) est régulé à la baisse suite à un traitement de 4 h au GHRH. L'activité de *eEF2k* est augmentée dans plusieurs cancers, dont le cancer du sein, et peut être une cible valide pour un traitement anti-cancer (Parmer et coll., 1999).

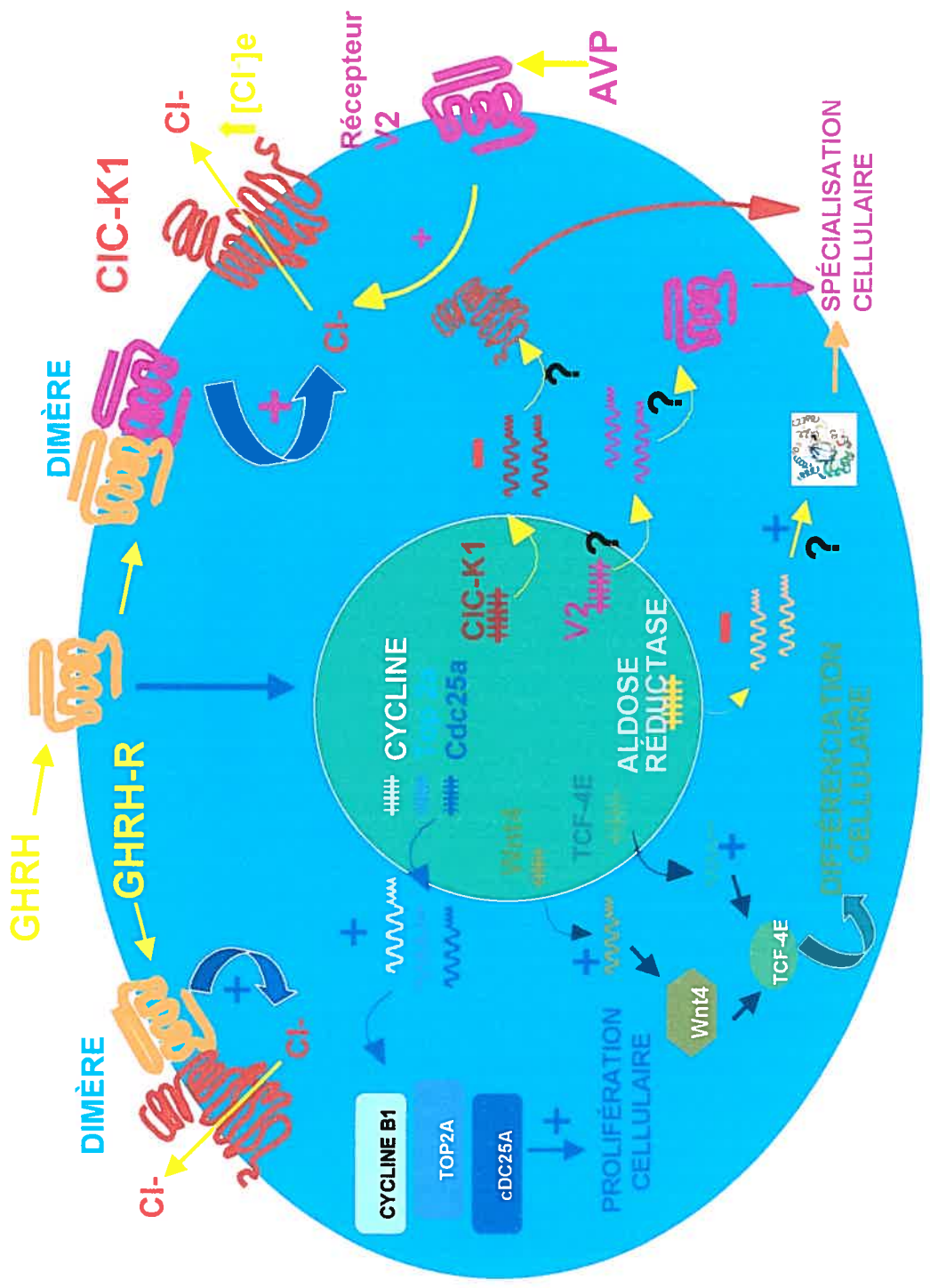
Des gènes impliqués dans le processus d'apoptose sont régulés par le GHRH. Par exemple, le gène de *similar to cell death activator* *CIDE-A*, un homologue de la

protéine de souris Cidea, qui active l'apoptose (Inohara et coll., 1998), est régulé à la hausse suite à une stimulation de 4 h au GHRH. Toutefois, l'expression du gène *multiple epidermal growth factor (EGF)-like-domain protein 3*, dont la liaison à son récepteur active les voies de signalisations PI3K/akt, Ras/MAPK et JAK/STAT de la survie cellulaire (Gibson, 2004), est augmentée après 4 h de stimulation au GHRH.

La présence de nombreuses composantes de l'axe somatotrophe dans le néphron suggère une interaction avec le GHRH-R rénal. En effet, l'AHm exprime l'IGF-I (Andersson et coll., 1988), contrairement à l'AH ascendante épaisse qui exprime l'IGF-I, l'IGF-I-R et le GH-R (Chin et coll., 1992). L'activation du GHRH-R aurait pu provoquer une augmentation des niveaux d'IGF-I dans les cellules de l'AH ascendante mince, qui aurait agi de façon paracrine sur son récepteur de l'AH ascendante épaisse. Toutefois, le gène de l'IGF-I ne semble pas modulé suite à une stimulation au GHRH des cellules de l'AHm, quelle que soit la durée d'exposition, invalidant cette hypothèse.

La régulation de l'expression des gènes, observée sur biopuces, suite à une stimulation au GHRH, devra être validée par RT-PCR dans des cultures primaires d'AHm purifiées.

Figure 15 : Représentation schématique de certains mécanismes d'action potentiels du système GHRH/GHRH-R dans la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et le transport de Cl⁻ dans les cellules de l'AH ascendante mince.



5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La présente étude a permis de mettre au point et de caractériser une culture primaire de cellules d'AHm purifiées et de mettre au point le premier RT-PCR quantitatif multiplex dans les cellules de l'AHm, afin d'étudier la régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R, suite à une stimulation au GHRH. Ces approches ont permis de déterminer la fonctionnalité du GHRH-R rénal et d'identifier deux voies de signalisation cellulaire, soit AC/PKA et MAPK, impliquées dans la réponse biologique au GHRH.

De plus, cette étude est la première permettant l'identification d'un large spectre de gènes exprimés de façon différentielle, suite à une stimulation au GHRH dans les cellules de l'AHm. Ceci permet d'élaborer de nouvelles hypothèses concernant le rôle du GHRH-R rénal. La régulation à la hausse de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération cellulaire indique un rôle possible du GHRH-R rénal dans ce processus. Plusieurs gènes impliqués spécifiquement dans la différenciation cellulaire des cellules du néphron, incluant *wnt-4*, ont été régulés à la hausse suite à un traitement au GHRH, suggérant une implication du GHRH-R dans la différenciation des cellules de l'AH, au stade de formation du néphron. Les résultats suggèrent également un rôle du GHRH-R dans la récupération suite à une agression rénale. En effet, le GHRH active l'expression de plusieurs gènes impliqués au cours du développement rénal, suggérant une dédifférenciation cellulaire, permettant une prolifération des cellules de l'AHam et un rétablissement de l'intégrité du néphron.

La régulation de gènes spécifiques au rein, comme le récepteur V2 de la vasopressine, l'aldose réductase et le canal CLC-K1, suggèrent un rôle du GHRH-R dans la spécialisation cellulaire, et le mécanisme de concentration de l'urine. Également, la régulation à la hausse de plusieurs facteurs de transcriptions, enzymes, facteurs impliqués dans la protéolyse, voies de signalisation et facteurs du transport intracellulaire suggèrent une activation de l'activité métabolique cellulaire suite à une stimulation au GHRH.

Ces résultats devront être confirmés par RT-PCR, et d'autres études seront

nécessaires afin de déterminer de façon plus directe le rôle précis du GHRH-R rénal. Il serait possible de traiter les rats *in vivo* avec le GHRH par infusion intra rénale et d'isoler ensuite les cellules de l'AH mince pour effectuer des études de régulation génique. Toutefois, une administration iv ou sc ne permettrait pas hors de tout doute discriminer un effet direct au niveau rénal d'un effet médié par l'axe somatotrope. Concernant le rôle possible du GHRH-R dans la prolifération cellulaire, une injection *in vivo* de 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU), un analogue de la thymidine qui s'incorpore à l'ADN pendant la phase S du cycle cellulaire (Cha et coll., 2001), pourrait être effectuée chez des rats traités ou non au GHRH, suivie de l'extraction des cellules de l'AHam et d'un marquage par immunocytochimie du BrdU. L'implication du GHRH-R dans la différenciation cellulaire, au cours du développement de l'AH, pourrait être vérifiée en étudiant l'expression du GHRH-R en lien avec des marqueurs de la différenciation cellulaire lors de la formation de l'AH. Afin de valider l'hypothèse d'une production de GHRH local suite à une agression rénale, les niveaux d'ARNm et l'expression protéique du GHRH rénal pourraient être mesurés dans l'AH suite à une ischémie ou une agression rénale.

Une étude de l'effet d'une stimulation au GHRH *in vivo* sur le volume urinaire et les concentrations de Na^+ et de Cl^- excrétés, présentement en cours, permettra de mettre en évidence une implication directe du GHRH-R rénal dans le mécanisme de modulation du flux transépithélial du Cl^- et de concentration de l'urine. Comme le GHRH pourrait jouer un rôle dans la concentration de l'urine et/ou l'homéostasie ionique directement au niveau de la protéine, l'interaction entre le GHRH-R et CLC-K1 pourrait être étudiée par des expériences d'hétérodimérisation entre les deux protéines transmembranaires.

Malgré toute l'information que l'étude sur biopuces a procurée, il faudra confirmer les cibles les plus intéressantes par des techniques complémentaires de biologie moléculaire. De plus, il faut garder présent à l'esprit qu'une régulation des niveaux d'ARNm ne conduit pas toujours à une régulation de la concentration des protéines bioactives.

6. BIBLIOGRAPHIE

Abbate M, Brown D, Bonventre JV. 1999 Expression of NCAM recapitulates tubulogenic development in kidneys recovering from acute ischemia. *Am J Physiol.* 277 : F454-63.

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 : 291-9.

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

Adachi H, Majima S, Kon S, Kobayashi T, Kajino K, Mitani H, Hirayama Y, Shiina H, Igawa M, Hino O. 2004 Niban gene is commonly expressed in the renal tumors: a new candidate marker for renal carcinogenesis. *Oncogene.* 23 : 3495-500.

Aleppo, G, Moska, SF 2nd, De Grandis, PA, Kineman, RD, Frohman, LA. 1997 Homologous down-regulation of growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 138 :1058-65.

Andersson GL, Skottner A, Jennische E. 1988 Immunocytochemical and biochemical localization of insulin-like growth factor I in the kidney of rats before and after uninephrectomy. *Acta Endocrinol (Copenh).* 119 : 555-60.

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 : 1-27.

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 : 1097-102.

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 : 279-81.

Bauer FE, Ginsberg L, Venetikou M, MacKay DJ, Burrin JM, Bloom SR. 1986 Growth hormone release in man induced by galanin, a new hypothalamic peptide. *Lancet.* 2 :192-5.

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.

Berry SA, Pescovitz OH. 1988 Identification of a rat GHRH-like substance and its messenger RNA in rat testis. *Endocrinology.* 123 : 661-3.

Berry SA, Srivastava CH, Rubin LR, Phipps WR, Pescovitz OH. 1992 Growth hormone-releasing hormone-like messenger ribonucleic acid and immunoreactive

peptide are present in human testis and placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 75 : 281-4.

Bertuccio C, Ibarra FR, Pignataro O, Toledo J, Arrizurieta E, Martin RS 1995 Cellular adaptation of the rat medullary thick ascending limb to chronic renal failure. *Medicina.* 54 : 329-33.

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

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 : 6854-7.

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. Et Gaudreau, P. 2002 Localization and regulation of a functional GHRH receptor in the rat renal medulla. *Endocrinology.* 143 : 1475-84.

Boisvert, Veyrat-Durebex C, Paré C, Strecko J, Gaudreau P. Localization and induction by high dietary salt intake of renal growth hormone-releasing hormone receptor in the loop of Henle. Peptide receptor 2001 International Symposium, Montreal, Canada, July 29-august 2, 2001.

Boulanger, L., Andersen, P.H., Gaudreau, P. 1999 Development of a site-directed polyclonal antibody against the adenopituitary 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 : 1187-94.

Bonventre JV. 2003 Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 14 Suppl 1:S55-61.

Brindle, P. K. et Montminy, M. R. 1992 The CREB family of transcription activators. *Curr. Opin Genet. Dev.* 2 : 199-204.

Carakushansky M, Whatmore AJ, Clayton PE, Shalet SM, Gleeson HK, Price DA, Levine MA, Salvatori R. 2003 A new missense mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor gene in familial isolated GH deficiency. *Eur J Endocrinol.* 148 : 25-30.

Carmago S, Shah SV, Walker PD. 2002 Meprin, a brush-border enzyme, plays an important role in hypoxic/ischemic acute renal tubular injury in rats. *Kidney Int.* 61 : 959-66.

Cha JH, Kim YH, Jung JY, Han KH, Madsen KM, Kim J. 2001 Cell proliferation in the loop of henle in the developing rat kidney. *J Am Soc Nephrol.* 12 : 1410-21.

Chihara K, Minamitani N, Kaji H, Arimura A, Fujita T. 1981 Intraventricularly injected growth hormone stimulates somatostatin release into rat hypophysial portal blood. *Endocrinology* 109 : 2279-81.

Chin E, Zhou J, Bondy CA. 1992 Renal growth hormone receptor gene expression: relationship to renal insulin-like growth factor system. *Endocrinology.* 131 : 3061-6.

Choksi T, Hay DL, Legon S, Poyner DR, Hagner S, Bloom SR, Smith DM. 2002 Comparison of the expression of calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) with CGRP and adrenomedullin binding in cell lines. *Br J Pharmacol.* 136 : 784-92.

Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, Robson SC, Binder G, Glass I, Strachan T, Lindsay S, Rappold GA. 2000 The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet.* 9 : 695-702.

Cowley BD, Gudapaty S. 1995 Temporal alterations in regional gene expression after nephrotoxic renal injury. *J Lab Clin Med.* 125 : 187-99.

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 : 13932-5.

Cullmann G, Fien K, Kobayashi R, Stillman B. 1995 Characterization of the five replication factor C genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 15 : 4661-71.

Cuttler, I., Glaum, S. R., Collins, B. A. Et Miller, R. 1992 Calcium signaling in single growth hormone-releasing factor-responsive pituitary cells. *Endocrinology.* 130: 945-53.

DeAlmeida, V. I. et Mayo, K. E. 1998 Identification of binding domains of the Growth hormone releasing hormone receptor by analysis of mutant and chimeric receptor proteins. *Mol. Endocrinol.* 12 : 750-65.

Dean, CE, Porter, TE 1999 Regulation of somatotroph differentiation and growth hormone (gh) secretion by corticosterone and gh-releasing hormone during embryonic development. *Endocrinology* 140 : 1104-10.

Dickson PR, Feifel D, Vaccarino FJ. 1995 Blockade of endogenous GRF at dark onset selectively suppresses protein intake. *Peptides*. 16 : 7-9.

Dickson PR, Vaccarino FJ. 1990 Characterization of feeding behavior induced by central injection of GRF. *Am J Physiol*. 259 : R651-7.

Dubuisson S, Boisvert C, Gaudreau P. Cellules d'anse de Henlé mince en culture : une approche valide pour étudier le processus d'internalisation du récepteur du GHRH. Congrès Annuel des stagiaires de recherche en santé de la Faculté de médecine, du CHUM et des Centres Hospitaliers et Instituts affiliés à l'Université de Montréal. Palais des congrès de Montréal, Montreal, Canada, 22 Janvier, 2003.

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.

Fabbi A, Ciocca DR, Ciampani T, Wang J, Dufau ML. 1995 Growth hormone-releasing hormone in testicular interstitial and germ cells: potential paracrine modulation of follicle-stimulating hormone action on Sertoli cell function. *Endocrinology*. 136 : 2303-8.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM 1998 Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*. 273 : 18623-32.

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

Firsov D, Mandon B, Morel A, Merot J, Le Maout S, Bellanger AC, de Rouffignac C, Elalouf JM, Buhler JM. 1994 Molecular analysis of vasopressin receptors in the rat nephron. Evidence for alternative splicing of the V2 receptor. *Pflugers Arch*. 429 : 79-89.

Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. 2004 PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*. 30 : 193-204.

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.

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

Fujinaka Y, Yokogoshi Y, Zhang CY, Okura T, Kitagawa K, Saito S. 1996 Tissue-specific molecular heterogeneity of human growth hormone-releasing hormone receptor protein. *Lett.* 394 : 1-4.

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 : 1864-9.

Gaylinn BD, Dealmeida VI, Lyons CE Jr, Wu KC, Mayo KE, Thorner MO. 1999 The mutant growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor of the little mouse does not bind GHRH. *Endocrinology.* 140 : 5066-74.

Gaylinn BD, Harrison JK, Zysk JR, Lyons CE, Lynch KR, Thorner MO 1993 Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing-hormone. *Mol.Endocrinol.* 7 : 77-84.

Gaylinn BD, von 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 : 193-5.

Gibson SB. 2004 Epidermal growth factor and trail interactions in epithelial-derived cells. *Vitam Horm.* 67 : 207-27.

Gick GG, Zeytin FN, Brazeau P, Ling NC, Esch FS, Bancroft C. 1984 Growth hormone-releasing factor regulates growth hormone mRNA in primary cultures of rat pituitary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81 : 1553-5.

Girard, N., Boulanger, L., Denis, S. et 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 : 2836-42.

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 : 21-29.

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.

Gougoux, A. La physiologie du rein et des liquides corporels. Gaëtan Morin éditeur, Boucherville, Québec, 1999.

Grone HJ, Cohen CD, Grone E, Schmidt C, Kretzler M, Schlondorff D, Nelson PJ. 2002 Spatial and temporally restricted expression of chemokines and chemokine receptors in the developing human kidney. *J Am Soc Nephrol.* 13 : 957-67.

- Grupp C, Begher M, Cohen D, Raghunath M, Franz HE, Muller GA. 1998 Isolation and characterization of the lower portion of the thin limb of Henle in primary culture. *Am J Physiol.* 274 : F775-82.
- Grupp, C., Lottermoser, J., Cohen, D., Begher, M., Franz, H-E et Müller, G. 1997 Transformation of rat inner medullary fibroblasts to myofibroblasts in vitro. *Kidney International.* 52 : 1279-90.
- Guarcello V, Weigent DA, Blalock JE. 1991 Growth hormone releasing hormone receptors on thymocytes and splenocytes from rats. *Cell Immunol.* 136 : 291-302.
- Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB. 1982 Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science.* 218 : 585-7.
- 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 : 2933-9.
- Hassan HA. 2001 Biological activities of two porcine growth hormone-releasing hormone receptor isoforms. *Arch Biochem Biophys.* 387 : 20-6.
- Hecht A, Kemler R. 2000 Curbing the nuclear activities of beta-catenin. Control over Wnt target gene expression. *EMBO Rep.* 1 : 24-8.
- Hecht A, Stemmler MP. 2003 Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C terminus of the Wnt effector protein T-cell factor 4. *J Biol Chem.* 278 : 3776-85.
- Holl RW, Thorner MO, Leong DA. 1989 Cytosolic free calcium in normal somatotropes: effects of forskolin and phorbol ester. *Am J Physiol.* 256 : E375-9.
- Horikawa R, Gaylinn BD, Lyons Jr CE, Thorner MO 2001 Molecular cloning of ovine and bovine growth hormone-releasing hormone receptors : the ovine receptor is C-terminally truncated. *Endocrinology* 142 : 2660-68.
- 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 : 2642-5.
- Horster MF, Braun GS, Huber SM. 1999 Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev.* 79 : 1157-91.
- Hsiung HM, Smith DP, Zhang X-Y, Bennett T, Rosteck Jr PR, Lai M-H 1993 Structure and functional expression of complementary DNA for porcine growth hormone-releasing hormone receptor. *Neuropeptide* 25 : 1-10.

Huang C, Hepler JR, Gilman AG, Mumby SM. 1997 Attenuation of Gi- and Gq-mediated signaling by expression of RGS4 or GAIP in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 : 6159-63.

Imai M, Taniguchi J, Tabei K. 1987 Function of thin loops of Henle. *Kidney Int.* 31 : 565-79.

Inohara N, Koseki T, Chen S, Wu X, Nunez G. 1998 CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J.* 17 : 2526-33.

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 : 1635-41.

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 : 811-9.

Jelinek LJ, Lok S, Rosenberg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, Bensch PA, Kuijper JL, Sheppard PO, Sprecher CA, et al. 1993 Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science.* 259 : 1614-6.

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.

Jung JY, Kim YH, Cha JH, Han KH, Kim MK, Madsen KM, Kim J. 2002 Expression of aldose reductase in developing rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283 : F481-91.

Kamegai, J., Unterman, T.G., Frohman, L.A., Kineman, R.D. 1998. Hypothalamic/pituitary-axis of the spontaneous dwarf rat: autofeedback regulation of growth hormone (GH) includes suppression of GH releasing-hormone receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology.* 139 : 3554-60.

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 : 171-89.

Kim J, Lee GS, Tisher CC, Madsen KM. 1996 Role of apoptosis in development of the ascending thin limb of the loop of Henle in rat kidney. *Am J Physiol.* 271 : F831-45.

Kobayashi K, Uchida S, Mizutani S, Sasaki S, Marumo F. 2001 Developmental expression of CLC-K1 in the postnatal rat kidney. *Histochem Cell Biol.* 116 : 49-56.

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. 1999 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 402 : 656-60.

Kolakowski, L F et Zhuang, J 1999 The G protein-coupled receptor database, World-Wide-Web site : <http://www.gcrdb.uthscsa.edu/FBintro.html>

Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K, Grossman AB. 2001 The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 86 : 881-7.

Korytko AI, Cuttler L. 1997 Thyroid hormone and glucocorticoid regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression. *J Endocrinol.* 152 : R13-7.

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 : 475-80.

Lasko, C.M., Korytko, A.I., Wehrenberg, W.B., 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.

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.

Li, C. H., Evans, H. M. et Simpson M. E. 1945 Isolation and properties of the anterior hypophyseal growth hormone. *J Biol. Chem.* 159 : 353.

Lin C, Lin S-C, Chang C-P, Rosenfeld MG 1992 Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360 : 765-8.

Lin SC, Lin CR, Gukovsky I, Luskis AJ, Sawchenko PE, Rosenfeld MG. 1993 Molecular basis of the little mouse phenotype and implications for cell type-specific growth. *Nature.* 364 : 208-13.

Lolait SJ, O'Carroll AM, McBride OW, Konig M, Morel A, Brownstein MJ. 1992 Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature.* 357 : 336-9.

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.

Luque RM, Kineman RD, Park S, Peng XD, Gracia-Navarro F, Castano JP, Malagon MM. 2004 Homologous and heterologous regulation of pituitary receptors for ghrelin and growth hormone-releasing hormone (GHRH). *Endocrinology*. Mar 24 [publié avant impression].

Lussier, B. T., French, M. B., Moore, B. O. Et Kraicer, J. 1991a Free intracellular Ca^{2+} concentration and growth hormone (GH) release from purified rat somatotrophs. III. Mechanism of action of GH-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology*. 128 : 592-603.

Lussier, B. T., French, M. B., Moore, B. O. Et Kraicer, J. 1991b Free intracellular Ca^{2+} concentration and growth hormone (GH) release from purified rat somatotrophs. I. GH-releasing factor-induced Ca^{2+} influx raises Ca^{2+} concentration. *Endocrinology*. 128 : 570-82.

Mandon B, Chou CL, Nielsen S, Knepper MA. 1996 Syntaxin-4 is localized to the apical plasma membrane of rat renal collecting duct cells: possible role in aquaporin-2 trafficking. *J Clin Invest*. 98 : 906-13.

Mandon B, Nielsen S, Kishore BK, Knepper MA. 1997 Expression of syntaxins in rat kidney. *Am J Physiol*. 273 : F718-30.

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 : 151-8.

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.

Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y, Miyazaki H, Ko SB, Hayama A, Morimoto T, Liu W, Arisawa M, Sasaki S, Marumo F. 1999 Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat Genet*. 21 : 95-8.

Mayo KE 1992 Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol*. 6 : 1734-44.

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

Mayo, KE, Hammer, RE, Swanson, LW, Brinster, RL, Rosenfeld, MG, Evans, RM. 1988 Dramatic pituitary hyperplasia in transgenic mice expressing a human growth hormone-releasing factor gene. *Mol. Endocrinol*. 2 : 606-12.

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.

Merchenthaler I, Csontos CS, Kallo I, Arimura A 1986 The hypothalamo-infundibular growth hormone-releasing hormone (GHRH) system of the rat. *Brain Res.* 378 : 297-302.

Miki N, Ono M, Murata Y, Ohsaki E, Tamitsu K, Ri T, Demura H, Yamada M. 1995 Thyroid hormone regulation of gene expression of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 217 : 1087-93.

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 : 4152-65.

Miller TL, Mayo KE. 1997 Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology.* 138 : 2458-65.

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 : 128-36.

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 : 804-8.

Mukoyama M, Sugawara A, Nagae T, Mori K, Murabe H, Itoh H, Tanaka I, Nakao K. 2001 Role of adrenomedullin and its receptor system in renal pathophysiology. *Peptides.* 22 : 1925-31.

Nadasdy T, Laszik Z, Blick KE, Johnson LD, Silva FG. 1994 Proliferative activity of intrinsic cell populations in the normal human kidney. *J Am Soc Nephrol.* 4 : 2032-9.

Nogami H, Hiraoka Y, Matsubara M, Nonobe E, Harigaya T, Katayama M, Hemmi N, Kobayashi S, Mogi K, Aiso S, Kawamura K, Hisano S. 2002 A composite hormone response element regulates transcription of the rat GHRH receptor gene. *Endocrinology.* 143 : 1318-26.

Nogami H, Matsubara M, Harigaya T, Katayama M, Kawamura K. 2000 Retinoic acids and thyroid hormone act synergistically with dexamethasone to increase growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology.* 141 : 4396-401.

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.

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 : 728-33.

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 : 1060-6.

Pandol SJ, Seifert H, Thomas MW, Rivier J, Vale W. 1984 Growth hormone-releasing factor stimulates pancreatic enzyme secretion. *Science.* 225 : 326-8.

Paré C, Gaudreau P. Regulation of growth hormone-releasing hormone receptor mRNA in the loop of Henle. *Peptide Receptor 2001 International Symposium, Montréal, Canada, 29 Juillet- 2 Août , 2001.*

Parmer, T G; Ward, M D; Yurkow, E J; Vyas, V H; Kearney, T J; Hait, W N 1999 Activity and regulation by growth factors of calmodulin-dependent protein kinase III (elongation factor 2-kinase) in human breast cancer *British Journal Of Cancer* Volume 79, Issue 1 , January, Pages 59-64.

Petersenn S, Rasch AC, Heyens M, Schulte HM. 1998 Structure and regulation of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Mol Endocrinol.* 12 : 233-47.

Petersenn, S. Et Schulte, H. M. 2000 Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. *Vitamins and hormones.* 59 : 35-68.

Pombo CM, Zalvide J, Gaylinn BD, Dieguez C. 2000 Growth hormone-releasing hormone stimulates mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology.* 141 : 2113-9.

Premen AJ. 1989 Renal hemodynamic response to galanin: importance of elevated plasma glucose. *Regul Pept.* 26 : 277-85.

Prescott LF. 1966 The normal urinary excretion rates of renal tubular cells, leucocytes and red blood cells. *Clin Sci.* 31 : 425-35.

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.

Salvatori R, Fan X, Phillips JA 3rd, Espigares-Martin R, Martin De Lara I, Freeman KL, Plotnick L, Al-Ashwal A, Levine MA. 2001 Three new mutations in the gene for the growth hormone (gh)-releasing hormone receptor in familial isolated gh deficiency type ib. *J Clin Endocrinol Metab.* 86 : 273-9.

Sariola, H. et Sainio, K. 1998 Cell lineages in the embryonic kidney : their inductive interactions and signalling molecules. *Biochem. Cell Biol.* 76 : 1009-16.

Schwander JC, Hauri C, Zapf J, Froesch ER. 1983 Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology.* 113 : 297-305.

Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D. 2000 Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol.* 11 : 152-76.

Sever S, Damke H, Schmid SL. 2000 Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* 150 : 1137-48.

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

Summers ST, Canonico PL, MacLeod RM, Rogol AD, Cronin MJ. 1985 Phorbol esters affect pituitary growth hormone (GH) and prolactin release: the interaction with GH releasing factor, somatostatin and bromocriptine. *Eur J Pharmacol.* 111 : 371-6.

Takahashi N, Kondo Y, Ito O, Igarashi Y, Omata K, Abe K. 1995 Vasopressin stimulates Cl⁻ transport in ascending thin limb of Henle's loop in hamster. *J Clin Invest.* 95 : 1623-7.

Takino T, Yoshioka K, Miyamori H, Yamada KM, Sato H. 2002 A scaffold protein in the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway is associated with focal adhesion kinase and tyrosine-phosphorylated. *Oncogene.* 21 : 6488-97.

Tang J, Lagace G, Castagne J, Collu R. 1995 Identification of human growth hormone-releasing hormone receptor splicing variants. *J Clin Endocrinol Metab.* 80 :2381-7.

Tannenbaum, GS, Ling, N 1984 The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm and GH secretion. 115: 1952-1957.

Terada Y, Tanaka H, Okado T, Shimamura H, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S. 2003 Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol* May. 14 : 1223-33.

Thériault, K. Pomerleau, L. et Gaudreau, P. Étude de dimérisation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance. 7^{me} congrès annuel des étudiants du CRCHUM, Montréal, Canada, 21 Décembre, 2004.

Tiong TS, Herington AC. 1991 Tissue distribution, characterization, and regulation of messenger ribonucleic acid for growth hormone receptor and serum binding protein in the rat. *Endocrinology*. 129 :1628-34.

Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A. 1996 Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature*. 382 : 80-3.

Uchida S, Sasaki S, Furukawa T, Hiraoka M, Imai T, Hirata Y, Marumo F. 1994 Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J Biol Chem*. 269 : 191-92.

Uchida S, Sasaki S, Nitta K, Uchida K, Horita S, Nihei H, Marumo F. 1995 Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, ClC-K1. *J Clin Invest*. 95 : 104-13.

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 : 3924-7.

VandePol CJ, Leidy JW, Finger TE, Robbins RJ 1986 Immunohistochemical localization of GRF containing neurones in rat brain. *Neuroendocrinology* 42 : 143-7.

Verschuren EW, Jones N, Evan GI. 2004 The cell cycle and how it is steered by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cyclin. *J Gen Virol*. 85 : 1347-61.

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, Gaudreau P, Coxam V, Gaumet N, Alliot J. 1999 Peripheral injection of growth hormone stimulates protein intake in aged male and female Lou rats. *Am J Physiol*. 276 : E1105-11.

Vuillemin T, Teulon J, Geniteau-Legendre M, Baudouin B, Estrade S, Cassingena R, Ronco P, Vandewalle A. 1992 Regulation by calcitonin of Na(+)-K(+)-Cl⁻ cotransport in a rabbit thick ascending limb cell line. *Am J Physiol*. 263 : C563-72.

Wajnrajch MP, Chua SC, Green ED, Leibel RL. 1994 Human growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) maps to a YAC at chromosome 7p15. *Mamm Genome*. 5 : 595.

Walker PD, Kaushal GP, Shah SV. 1998 Meprin A, the major matrix degrading enzyme in renal tubules, produces a novel nidogen fragment in vitro and in vivo. *Kidney Int*. 53 : 1673-80.

Wang JC. 1996 DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*. 65 : 635-92.

Warner LE, Mancias P, Butler IJ, McDonald CM, Keppen L, Koob KG, Lupski JR. 1998 Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet.* 18 : 382-4.

Xiang YY, Tanaka M, Suzuki M, Igarashi H, Kiyokawa E, Naito Y, Ohtawara Y, Shen Q, Sugimura H, Kino I. 1994 Isolation of complementary DNA encoding K-cadherin, a novel rat cadherin preferentially expressed in fetal kidney and kidney carcinoma. *Cancer Res.* 54 : 3034-41.

Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S. 1992 Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 : 251-5

Yamashita S, Weiss M, Melmed S. 1986 Insulin-like growth factor I regulates growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels in human pituitary tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 63 : 730-5.

Zeitler P, Stevens P, Siriwardana G. 1998 Functional GHRH receptor carboxyl terminal isoforms in normal and dwarf (dw) rats. *J Mol Endocrinol.* 21 : 363-71.

Zysk JR, Cronin MJ, Anderson JM, Thomer MO. 1986 Cross-linking of a growth hormone releasing factor-binding protein in anterior pituitary cells. *J Biol Chem.* 261 : 16781-4.



