

Université de Montréal

Régulation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance
au cours du vieillissement : effet de la restriction calorique
et de l'apport protéique.

par

Karin Robinette

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 2001

© Karin Robinette, 2001



w
4
U58
2002
v.076

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Régulation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance
au cours du vieillissement: effet de la restriction calorique
et de l'apport protéique.

Présenté par:
Karin Robinette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Réjean Couture: président-rapporteur
Dr Pierrette Gaudreau: directrice de recherche
Dr Huy Ong: membre du jury

Mémoire accepté le:

I. RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS FRANÇAIS

Le vieillissement est caractérisé par une diminution de la sensibilité des cellules somatotropes au facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH) ainsi que des taux circulants d'hormone de croissance (GH) et de facteur insulinique de croissance de type I (IGF-I), conduisant à une augmentation de la masse adipeuse, une diminution de la masse musculaire et à la détérioration de plusieurs tissus et organes. Des altérations du récepteur adénohypophysaire du GHRH (GHRH-R) contribuent à ce phénomène. Bien que plusieurs facteurs favorisent un vieillissement réussi, la restriction calorique modérée de longue durée (RC) est considérée comme l'une des interventions les plus bénéfiques chez les mammifères, en partie grâce au maintien des profils de sécrétion de GH et des paramètres de liaison du GHRH.

La présente étude rapporte les résultats de l'impact d'une RC de 40% implantée à l'âge de 8 mois, combinée à un apport protéique de 22% (normal) ou de 13.2% chez le rat mâle Sprague Dawley, au cours du vieillissement. Les effets les plus drastiques et diversifiés ont été observés chez les rats de 18 mois. Ceux soumis à une RC présentent un ratio 4 kb/2.5 kb des transcrits d'ARNm du GHRH-R hypophysaire similaire à celui des rats jeunes, se traduisant par le maintien des paramètres de liaison du GHRH. En comparaison, les niveaux d'ARNm du GHRH-R rénal demeurent similaires à ceux des rats jeunes uniquement si la RC est combinée à un apport protéique de 22%. L'étude de plusieurs paramètres hormonaux et biochimiques sériques suggèrent que le changement de leurs niveaux constitue une partie du mécanisme complexe par lequel la régulation nutritionnelle du GHRH-R s'effectue au cours du vieillissement.

Mots clés: GHRH-R, rat, hypophyse, rein, hypothalamus, IGF-I, testostérone, leptine, T4, corticostérone, insuline

II. RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS ANGLAIS

Aging is characterized by a decreased of somatotroph cell sensitivity to growth hormone-releasing hormone (GHRH) and, growth hormone (GH) and insulin-like growth factor 1 (IGF-I) serum levels, contributing to an increase of adipose tissue, a decrease in muscular mass and a deterioration of several tissue and organ functions. Alterations of the anterior pituitary GHRH receptor (GHRH-R) contribute to this phenomenon. Although several factors contribute to successful aging, long-term moderate calorie restriction (CR) is considered as one of the most powerful interventions in mammals, partly because of a maintenance of youthful GH secretory patterns and GHRH binding parameters.

The present study reports the impact of a 40% CR, started at 8 months of age and combined with a protein intake of 22% (normal) or 13.2% in male Sprague Dawley rat in course of aging. The most drastic and diversified effects were observed in 18-month-old rats. Those submitted to CR had a 4 kb/2.5 kb pituitary GHRH-R mRNA transcripts ratio similar to those of young rats and a maintenance of youthful GHRH binding parameters. In contrast, renal GHRH-R mRNA levels were similar to those of young rats only when CR was combined with a 22% protein intake. Analysis of several biochemical and hormonal serum parameters suggest that changes in their levels constitute parts of the complex mechanism by which GHRH-R nutritional regulation is operating in the course of aging.

Key words: GHRH-R, rat, pituitary, kidney, hypothalamus, IGF-I, testosterone, leptin, T4, corticosterone, insulin

III. TABLE DES MATIÈRES

I. Résumé et mots titres français.....	i
II. Résumé et mots titres anglais.....	ii
III. Table des matières.....	iii
IV. Liste des tableaux.....	v
V. Liste des figures.....	vii
VI. Liste des abréviations.....	ix
VII. Remerciements.....	xii
VIII. Dédicace.....	xiii
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Hormone de croissance.....	2
1.2 Régulation de l'hormone de croissance.....	2
1.2.1 Régulation hypothalamique et hypophysaire de la GH.....	4
1.2.2 Régulation hormonale périphérique de la GH.....	4
1.2.3 Régulation multifactorielle de la GH.....	5
1.3 Facteur de libération de l'hormone de croissance.....	7
1.4 Récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	8
1.4.1 Caractéristiques du GHRH-R.....	8
1.4.2 Gène du GHRH-R.....	10
1.4.3 Expression du GHRH-R.....	11
1.4.4 Régulation de l'expression du GHRH-R.....	12
1.4.5 Localisation du GHRH-R.....	14
1.4.6 Voies de signalisation intracellulaires du GHRH-R.....	15
1.5 Axe somatotrope et vieillissement.....	16
1.5.1 GHRH-R et vieillissement.....	19
1.6 Modulation nutritionnelle de l'axe somatotrope et du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	21
1.6.1 Restriction calorique modérée.....	21

1.6.2 Apport protéique.....	23
1.7 Hypothèse et objectifs.....	25
2. MANUSCRITS.....	27
2.1 Robinette K, Robert A, Boisvert C, Paré C, Ferland G, Gaudreau P 2001 Nutritional regulation of the pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in the aging rat : effects of central and peripheral factors. Endocrinology, soumis.	28
2.2 Robert A, Robinette K, Ferland G, Gaudreau P 2001 Nutritional regulation of the leptin axis in the aging rat. Endocrinology, soumis.	77
3. DISCUSSION.....	94
3.1 Régulation du GHRH-R hypophysaire et rénal: effets des facteurs centraux et périphériques influencés par la RC et l'apport protéique au cours du vieillissement.	96
3.2 Régulation de l'axe leptine : effets de la RC et l'apport protéique au cours du vieillissement.	103
4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	106
5. BIBLIOGRAPHIE.....	110
IX. ANNEXE.....	xiv
1. Liste des publications-Articles originaux.....	xv
2. Liste des communications-Présentations par affichage.....	xvi

IV. LISTE DES TABLEAUX

2. MANUSCRITS

2.1 Nutritional regulation of the pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in the aging rat : effects of central and peripheral factors.

Table 1	Body weight and wet organ weight: effect of age and dietary protein and energy intakes.	58
Table 2	Estimates of GHRH binding parameters in anterior pituitary homogenates : effect of age and dietary and energy intakes.	61
Table 3	Serum concentration of total IGF-I and free fatty acid (FFA): effect of age and dietary protein and energy intakes.	63
Table 4	Serum concentration of free T4 and T3 and total testosterone and corticosterone : effect of age and dietary protein and energy intakes.	66

2.2 Nutritional regulation of the leptin axis in the aging rat.

Table 1 Serum concentration of leptin, glucose and insulin: effect of age and dietary protein and energy intakes.

..... 93

V. LISTE DES FIGURES

1. INTRODUCTION

Figure 1 Structure schématique du GHRH-R hypophysaire de rat.....9

2. MANUSCRITS

2.1 Nutritional regulation of the pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in the aging rat: effects of central and peripheral factors.

Figure 1	Effects of long-term caloric restriction and protein intake on anterior pituitary GHRH-R mRNA transcript levels in 12-, 18- and 22-month-old rats compared to 2-month-old rats.	69
Figure 2	Effects of long-term caloric restriction and protein intake on renal medulla GHRH-R mRNA levels in 12-, 18- and 22-month-old rats compared to 2-month-old rats.	72
Figure 3	Effects of long-term caloric restriction and protein intake on hypothalamic preproGHRH mRNA levels in 18-month-old rats compared to 2-month-old rats.	74
Figure 4	Representative [¹²⁵ I]GHRH binding profiles in anterior pituitary homogenates from 2- (■) and 18- (▲) month-old <i>ad libitum</i> /22% protein-fed and 18- month-old calorie-restricted rats (●).	76

2.2 Nutritional regulation on the leptin axis in the aging rat.

Figure 1 Effects of long-term caloric restriction and protein intake on hypothalamic Ob-Rb mRNA levels in 18-month-old rats compared to 2-month-old rats.

.....91

VI. LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	Acide aminé
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AGNE	Acide gras non-estérifié
AP-1	Facteur de transcription "Activator protein-1"
AP-4	Facteur de transcription "Activator protein-4"
AMPc	Adénosine 3'-5'-cyclique monophosphate
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
B _{max}	Capacité maximale de liaison
Brn-2	Facteur de transcription "brain-2"
Ca ²⁺	Calcium
Cdkn 2c	Inhibiteur 2c de la kinase cyclique dépendante
Ctsl	Cathepsin L
COS	Lignée de cellules fibroblastiques rénales de singe
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
EGR 1	Early growth response 1
G _i	Protéine G de type inhibitrice de l'adénylate cyclase
G _s	Protéine G de type stimulatrice de l'adénylate cyclase
GH	Hormone de croissance
GH4	Lignée cellulaire somatotrope de rat
GHRH	Facteur de libération de l'hormone de croissance
GHRH-R	Récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance
GHRP	Growth hormone-releasing peptide

GHS	Sécrétagogues de la GH
GHS-R	Récepteur de sécrétagogues de la GH
GIP	Peptide inhibiteur gastrique
GLP-1	"Glucagon-like peptide" de type 1
IGF-I	Facteur insulinique de croissance de type I
¹²⁵ I-GHRH	[¹²⁵ I-Tyr ¹⁰]hGHRH(1-44)NH ₂
IP ₃	1,4,5-inositol-phosphate
kb	Kilobase
Kd	Constante de dissociation à l'équilibre
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MtT/S	Lignée cellulaire clonale de GH dérivée d'une tumeur somatotropique de rat induite par des estrogènes
NF-1	Facteur nucléaire 1
NF-κB	Facteur nucléaire κB
NO	Oxide nitrique
NPY	Neuropeptide Y
ObR	Récepteur de la leptine
ObRL	Forme longue du récepteur de la leptine
PACAP	Peptide stimulateur de l'adénylate cyclase
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
RC	Restriction calorique
RPA	Protection à la RNase
RT-PCR	Amplification en chaîne par une polymérase précédée d'une étape de transcription réverse
SRIF	Somatostatine
T ₃	Triiodothyronine
T ₄	Thyroxine

TRE	Élément de réponse des récepteurs des hormones thyroïdiennes
Ttf 1	Transcription termination factor 1
UFS	Upstream stimulatory factor
UTR	Région 5' non-traduite
VIP	Peptide intestinal vasoactif

VII. REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier le Dr. Pierrette Gaudreau de m'avoir accueillie dans son laboratoire en tant que stagiaire au baccalauréat puis en tant qu'étudiante à la maîtrise. Sa passion contagieuse pour la science et la recherche, son extrême disponibilité de même que ses précieux conseils et encouragements ont grandement contribué à ce mémoire et aux articles qu'il contient. Un grand merci donc à cette directrice hors pair, mais surtout à cette femme attentionnée, généreuse et compréhensive qui m'a permis une si grande latitude... Mes remerciements s'adressent aussi au Dr. Réjean Couture et au Dr. Huy Ong, qui ont corrigé mon mémoire, pour leurs précieux commentaires et suggestions qui ont enrichis la version finale de mon mémoire.

Je tiens aussi à remercier tous les étudiants et assistants de recherche du laboratoire de NEV présents et passés qui ont collaboré à certaines expériences de mon projet, ont permis de nourrir certaines discussions, ont répondu à mes nombreuses questions ou qui ont tout simplement rendu agréable mon séjour au laboratoire. Des remerciements plus particuliers à Alma Robert à qui je suis très reconnaissante pour ses enseignements, son étroite collaboration et son immense expertise en biologie moléculaire, et à Isabelle Dion et Daniel Langlois pour leur aide en début de projet, ainsi que pour leur amitié et encouragements tout au long du parcours de ce mémoire. Merci aussi à Julie, Sophie, Alain et Dominique d'avoir partagés et égayés mes dîners.

Mes remerciements s'adressent aussi au Réseau provincial thématique du FRSQ en Géro-nto-Gériatrie, à la Faculté des études supérieures et au Programme de Sciences biomédicales pour les bourses qu'ils m'ont accordés.

Finalement, des remerciements plus personnels sont dédiés à tout mon entourage familial, amical et amoureux qui m'a entourée et encouragée avant et tout au long de ce mémoire... Un gros merci à Denis et Mariette, mes parents pour leur appui et leur confiance en mes choix, à Nicole pour son oreille attentive depuis si longtemps et à Luis et David pour avoir partagé ma vie d'étudiante à temps plus que plein avec tout l'appui, le soutien et l'amour qu'ils m'ont donnés...
MERCII...

..... *À Maman*

en hommage à ton courage et à ton amour de la vie
qui sont une grande source d'inspiration

1. INTRODUCTION

1.1 Hormone de croissance

L'hormone de croissance (GH) est une protéine de 191 acides aminés (aa), synthétisée et sécrétée principalement par les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure. Elle exerce ses effets physiologiques directement par la stimulation de récepteurs membranaires ou indirectement par l'intermédiaire du facteur insulinoïque de croissance de type I (IGF-I) (1).

La GH est une hormone anabolique qui provoque la prolifération et la division cellulaire dans plusieurs tissus et organes incluant les os, les muscles et les viscères. Elle stimule principalement la synthèse des protéines en augmentant l'incorporation cellulaire d'acides aminés et en accélérant la transcription et la traduction (1). La GH inhibe le catabolisme protéique et stimule la lipolyse, de sorte que les acides gras sont utilisés comme source d'énergie (1). Elle agit également sur le métabolisme phospho-calcique afin de maintenir l'équilibre de ces ions (1). Chez l'enfant, la GH s'avère particulièrement importante pour le développement et la croissance staturale alors que chez l'adulte, elle joue un rôle important au niveau du maintien des fonctions métaboliques et de l'intégrité tissulaire et cellulaire (1).

1.2 Régulation de l'hormone de croissance

Chez les mammifères, la sécrétion de GH est épisodique. Cette pulsativité, caractérisée par une alternance de concentrations sériques de GH élevées et très basses, est nécessaire à l'induction optimale de ses effets physiologiques (2). La sécrétion de GH suit de plus un rythme circadien qui se caractérise par une amplitude accrue des pics de sécrétion durant le sommeil (3, 4). Chez le rat mâle, le profil de sécrétion de GH le plus élevé se produit plutôt le jour où les pics de GH de grande amplitude se succèdent à intervalle de 3-4 heures, intercalés de trophes (5). Le profil journalier de sécrétion de cette hormone change avec l'âge chez les animaux et les humains. Le niveau sérique de GH est élevé chez le fœtus,

comparativement aux niveaux postnataux, chez la plupart des mammifères incluant l'homme (6). Chez le rat, on observe une augmentation sérique de GH immédiatement avant la naissance et une diminution vers l'âge adulte (7). Le vieillissement conduit à une diminution de la sécrétion de GH chez les mammifères (8). [Voir section 1.5]

La sécrétion épisodique de GH est contrôlée par deux hormones hypothalamiques. Le facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH), un peptide de 43 ou 44 acides aminés, stimule la synthèse et la sécrétion de GH alors que la somatostatine (SRIF), un peptide de 14 acides aminés, inhibe sa sécrétion (1). Récemment, il a été démontré que dans la lignée cellulaire hypophysaire AtT-20 qui exprime 4 des 5 sous-types des récepteurs de la SRIF, la SRIF exerce également un effet inhibiteur sur la synthèse de GH *via* l'internalisation d'un complexe ligand-récepteur SRIF, sans inhibition de l'adénylate cyclase (9). Le GHRH impliqué dans la sécrétion de GH est principalement synthétisé dans les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus et la SRIF, dans ceux du noyau périventriculaire rostral. Ces deux peptides stimulent leurs récepteurs membranaires sur les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure, couplés respectivement à une protéine G stimulatrice (G_s) et G inhibitrice (G_i) (10, 11). L'activation de l'adénylate cyclase et l'augmentation de la concentration d'AMPc intracellulaire résultant de ces actions opposées constituent le premier événement menant à la sécrétion de GH (1). L'activation de la protéine kinase A (PKA) permet la phosphorylation de cibles protéiques, y compris des canaux calciques, ce qui permet leur ouverture et l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire, nécessaire à l'exocytose de la GH (12). Dans l'hypophyse et l'hypothalamus, plusieurs facteurs hormonaux, neuronaux, métaboliques et nutritionnels agissent comme agents de régulation de l'expression génique de la GH, du GHRH et de la SRIF, de la réponse somatotrope stimulée par le GHRH ainsi que de la sécrétion de GH (1).

1.2.1 Régulation hypothalamique et hypophysaire de la GH

Au niveau hypothalamique, des boucles de rétrocontrôle ont été décrites où le GHRH et la SRIF sécrétés inhibent leur propre synthèse et sécrétion (1, 13). La GH exerce un rétrocontrôle positif en stimulant la synthèse et la sécrétion de la SRIF (1). La GH exerce un rétrocontrôle négatif non seulement en inhibant la sécrétion du GHRH et sa propre sécrétion, mais en stimulant celle de la SRIF (1). Au niveau hypophysaire, la présence du récepteur de la GH ainsi que de son ARNm suggèrent un mécanisme de rétrocontrôle négatif direct de la GH sur sa propre sécrétion (14, 15, 16). De plus, l'IGF-I produit par le foie sous l'action de la GH inhibe la sécrétion de GH (1), principalement en agissant au niveau hypophysaire en supprimant la sécrétion et l'expression du gène de la GH (17, 18). Récemment, le clonage d'un récepteur de sécrétagogues de la GH (GHS-R) de même que la purification et l'identification de la structure de la ghreline, un peptide gastrique de 28aa qui est le ligand endogène du récepteur de GHS, ont été accomplis et ont permis de mettre en évidence la régulation de la sécrétion de GH par un autre peptide que le GHRH (18A, 18B). Au niveau hypothalamique, l'IGF-I stimule directement la libération de la SRIF (19) et inhibe la libération de GHRH (20).

1.2.2 Régulation hormonale périphérique de la GH

Plusieurs hormones périphériques régulent la GH. L'insuline agit comme inhibiteur de l'expression génique de la GH (21, 22). Les hormones thyroïdiennes influencent positivement la transcription du gène de la GH grâce à la présence d'éléments de réponse (TRE) pour leurs récepteurs sur ce gène (23-27). De plus, les hormones thyroïdiennes régulent la sécrétion de GH en modulant la réponse somatotrope au GHRH. Les cellules d'hypophyse antérieure d'animaux hypothyroïdiens ont une réponse diminuée au GHRH (28), qui résulte d'une diminution de l'abondance de récepteurs fonctionnels du GHRH (29). Les

glucocorticoïdes augmentent également le niveau de sécrétion de GH stimulée par le GHRH en accroissant le nombre de GHRH-R hypophysaires (30, 31). Par contre, ils inhibent les neurones hypothalamiques du GHRH, spécialement à dose élevée, et lors de stimulation soutenue que ce soit *in vitro* (32) ou *in vivo* (33). Finalement, les glucocorticoïdes exerceraient un effet inhibiteur en stimulant la sécrétion hypothalamique de SRIF (34-36). Par ailleurs, les stéroïdes sexuels exercent des effets opposés sur la régulation de la sécrétion de SRIF. En effet, les estrogènes inhibent la sécrétion hypothalamique de SRIF ce qui résulte en une augmentation de celle de la GH alors que la testostérone active la sécrétion de SRIF (36-38).

1.2.3 Régulation multifactorielle de la GH

Le glucose est un important régulateur de la sécrétion de GH bien que la réponse à l'hypo ou l'hyperglycémie diffère selon les espèces. Chez l'humain, l'hypoglycémie induite par l'insuline stimule la sécrétion de GH (39) tandis que chez le rat, l'hypoglycémie induite par l'insuline ou la glucopénie intracellulaire inhibe la sécrétion pulsée de GH (40). Cet effet inhibiteur résulte de la stimulation de la sécrétion de SRIF (41, 42).

Les acides aminés stimulent la sécrétion de GH que se soit en macronutriments sélectionnés ou inclus dans un repas riche en protéines animales (43-45). L'administration parentérale d'une solution d'acides aminés entraîne une augmentation de la sécrétion de GH en agissant sur la pulsatilité et l'amplitude des pics de sécrétion, un effet qui est probablement produit par l'augmentation de la sécrétion de GHRH (46). L'arginine constitue le plus puissant stimulant, même si la lysine, l'ornithine, la tyrosine, la glycine et le tryptophane stimulent la sécrétion de GH (47). Des études suggèrent que l'effet de l'arginine sur la sécrétion de GH résulterait de la suppression de la sécrétion de SRIF hypothalamique (48-50). Par ailleurs, l'effet de l'arginine sur la sécrétion de GH et d'autres hormones

hypophysaires pourrait dépendre de sa conversion en oxyde nitrique (NO) (51).

Les acides gras non-estérifiés (AGNE) sont d'importants facteurs périphériques contrôlant la sécrétion de GH. Une réduction pharmacologique des niveaux d'AGNE circulants fait augmenter la sécrétion basale de GH, mais une élévation d'AGNE induite par une combinaison exogène d'intralipides et d'héparine entraîne une réduction spontanée de la sécrétion de GH chez différentes espèces animales (52, 53) et abolit la réponse en GH suite à divers stimuli (53-55). Chez le rat, l'effet inhibiteur des AGNE est exercé au niveau hypophysaire (54, 56), mais un site d'action hypothalamique a également été suggéré (57).

La leptine, un produit du gène *ob* est une hormone sécrétée par les adipocytes (58) qui régule la prise alimentaire et la dépense énergétique (59). La leptine modifie la sécrétion de GH qui diminue après l'administration d'un antisérum anti-leptine chez le rat (60). Son effet est présumément produit *via* par la forme longue du récepteur *ob* qui est localisé principalement dans le noyau arqué et à plus faible concentration dans les noyaux ventromédian et dorsomédian de l'hypothalamus (61, 62). Chez le rat, une injection de leptine entraîne une augmentation de niveau hypophysaire d'ARNm de la GH et du niveau hypothalamique d'ARNm du GHRH ainsi qu'une diminution du niveau hypothalamique d'ARNm de la SRIF (63). Le neuropeptide Y (NPY) a été suggéré comme étant un médiateur hypothalamique de l'effet stimulateur de la leptine sur la GH (64-67).

La prise alimentaire a également un effet sur la sécrétion de GH induite par le GHRH chez le rat et l'humain. Chez les rats (68) et les humains (69) obèses, une diminution de la sécrétion de GH est observée en réponse à une variété d'agents sécrétagogues. Chez le rat, un jeûne de 24 à 72h inhibe la sécrétion épisodique de GH (70) sans altérer le rythme ultradien (71). Inversement, le jeûne induit une augmentation des niveaux de GH chez l'humain (72). Le niveau d'apport protéique

est aussi un facteur important de la sécrétion de GH particulièrement dans la période postnatale chez le rat (73) et dans l'enfance chez l'humain (74).

1.3 Facteur de libération de l'hormone de croissance

Le GHRH est un peptide appartenant à la grande famille des peptides de type sécrétine-glucagon-polypeptide intestinal vasoactif (VIP) qui inclut également le "glucagon-like" peptide I (GLP-I), le peptide inhibiteur gastrique (GIP) et le peptide hypophysaire stimulateur de l'adénylate cyclase (PACAP) (78). Le gène du GHRH est localisé dans la région de la bande p12 du chromosome 20 chez l'humain (75-77) et du chromosome 2 chez la souris (79). Dans l'hypothalamus humain, deux formes principales ont été isolées, la forme 1-44NH₂ (carboxamide) et la forme 1-40OH (carboxylique libre), cette dernière étant un produit de protéolyse (80-81).

Des études de localisation par hybridation *in situ* ont montré que l'ARNm du preproGHRH est exprimé dans les régions basales médiales de l'hypothalamus et de façon prépondérante dans le noyau arqué. Des études immunocytochimiques ont permis de mettre en évidence un réseau dense de fibres dans l'éminence médiane où les axones des neurones GHRH projettent pour se terminer dans des capillaires de la circulation portale (82-84). La sécrétion du GHRH dans les vaisseaux porte est épisodique, ce qui rythme la sécrétion de GH dans l'hypophyse (85). La présence de l'ARNm du preproGHRH ou du peptide a été rapportée dans plusieurs tissus extra-hypothalamiques (86) tel que le placenta (87, 88), l'ovaire (89), le testicule (90), les lymphocytes (91), le pancréas et le tractus gastro-intestinal (92, 93).

La régulation de l'expression du gène du GHRH est peu connue, mais la GH semble être le plus important facteur hormonal de sa régulation. Il y a une activation rapide de l'expression du gène du GHRH en réponse à une diminution

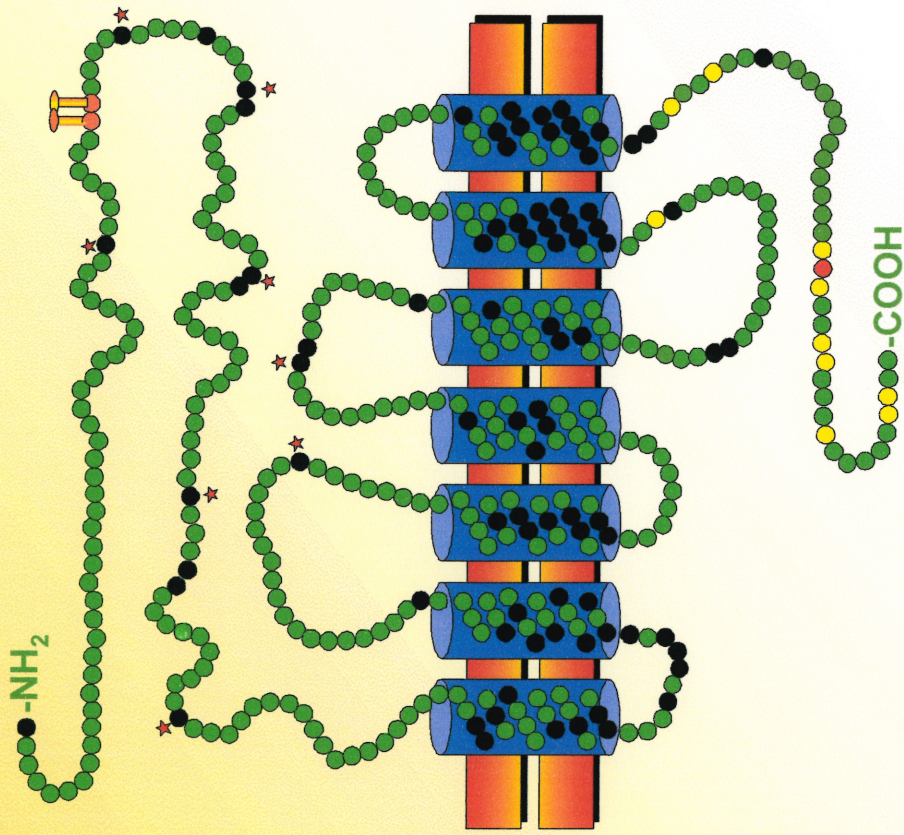
des niveaux de GH (94). Les stéroïdes sexuels joueraient également un rôle puisque chez le rat mâle, la testostérone augmente l'expression du gène alors que l'estrogène la diminue (95, 96). Les états nutritionnel et métabolique modulent également l'expression du gène du GHRH (94, 97, 98).

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

1.4.1 Caractéristiques du GHRH-R

Dans l'hypophyse antérieure, la stimulation de la GH par le GHRH est initiée par sa liaison à un récepteur membranaire (GHRH-R), localisé exclusivement sur les cellules somatotropes (99). Des études de liaison ont mis en évidence la présence de 2 sites de liaison pour le GHRH, soit un premier de haute affinité et basse capacité et un deuxième de basse affinité et haute capacité (100). Le GHRH-R a été cloné de l'hypophyse humaine (10, 101-103), de rat (10, 104), de souris (78, 104), de porc (105), de bœuf et de mouton (106) et des adénomes hypophysaires humains (102, 103). La traduction des ADNc montre que le GHRH-R est une protéine de 423 aa chez l'humain, le rat, la souris, le porc et le bœuf et de 407 aa chez le mouton. Il existe 94% d'identité de séquence entre les GHRH-R des rongeurs et 82% d'identité entre ceux-ci et le récepteur humain. Chez l'humain et le rat, la taille moléculaire prédite du GHRH-R est de 47 kDa (10, 107).

Le clonage a permis de déterminer que le GHRH-R appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et plus spécifiquement à la sous-famille B-III (108, 109) à laquelle appartiennent les récepteurs sécrétine-glucagon-VIP (111-115). Ce récepteur est composé de 7 domaines transmembranaires liés par trois boucles intracytoplasmiques et trois boucles extracellulaires. La partie N-terminale du GHRH-R comporte 150 aa, contient 6 cystéines, un ou deux sites potentiels de glycosylation et participe à la liaison du GHRH (10, 116). La troisième boucle intracellulaire et la partie C-terminale contiennent des sites potentiels de phosphorylation alors que la



 : site potentiel de N-glycosylation

 : résidus de Cys conservés

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

 : site potentiel de palmitoylation

 : sites potentiels de phosphorylation

Figure 1 Structure du GHRH-R hypophysaire de rat.

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

(réf. 116)

partie C-terminale contient une cystéine qui pourrait être palmitoylée. Deux résidus cystéines présents dans les deuxième et troisième domaines extracellulaires pourraient être impliqués dans la formation de ponts disulfures (10, 116). De telles modifications post-traductionnelles sont connues pour influencer les processus de désensibilisation et d'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G (117-121). Des études récentes à l'aide d'un agoniste fluorescent du GHRH indiquent que dans les somatotropes de rat, l'internalisation du GHRH-R nécessite une acylation par des acides gras comme pré-requis à une internalisation *via* une voie cavéoline-dépendante de la cavéoline (122).

1.4.2 Gène du GHRH-R

Le gène du GHRH-R est localisé sur le chromosome 7p14 (123) ou 7p15 (124) chez l'humain et est constitué d'au moins 10 exons répartis sur plus de 8 kb (125). Une autre étude a démontré que le gène du GHRH-R s'étendrait sur au moins 12 kb et consisterait en 13 exons (126). La longueur moyenne de ces exons est de 100pb sauf pour l'exon 1 qui est composé d'une région 5' non-traduite (UTR) et code pour les 19 premiers aa de la protéine (125). Chez la souris, le gène du GHRH-R a été localisé sur le chromosome 2 (78). Le gène du GHRH-R de rat contient 14 exons répartis sur environ 15 kb d'ADN génomique (116, 127). Le promoteur de ce gène ne contient pas de boîtes TATA, CCAAT ou d'autres séquences initiatrices consensus. Seul un motif de boîte GC localisé en -210 est présent. Plusieurs sites mineurs et un site majeur d'initiation de la transcription, à 40 nucléotides en amont du codon initiateur ATG, ont été identifiés (125). Le séquençage des premiers 2 kb du promoteur humain démontre que la portion minimale du promoteur requise pour l'expression du GHRH-R, dans une lignée cellulaire hypophysaire, est de 202 paires de bases (pb) mais qu'un promoteur de 1456 pb est requis pour induire un niveau d'expression élevé (125). Plusieurs sites potentiels de liaison de facteurs de transcription ont été identifiés dans la séquence du promoteur tels que les sites pour les facteurs de transcription de base (NF-1, Sp1, USF), les facteurs de transcription

spécifiques au tissu (Pit-1, Oct-2, Brn-2) et les facteurs de transcription régulés par les hormones (glucocorticoïdes, estrogènes) (126). Plus spécifiquement, cette région contiendrait deux sites de liaison pour les séquences activatrices AP-1 (activator protein-1) aux positions -991 et -609 et AP-4 (activator protein-4) à la position -28 (125). Des séquences consensus pour le facteur nucléaire NF-1 (nuclear factor-1) à -355, -294 et -107 et un site de liaison pour l'USF (upstream stimulatory factor) à -1406 ont été trouvés (125). Des sites de liaison pour des facteurs de transcription spécifiques au tissu tels les facteurs possédant des domaines POU, comme Pit-1, ont été identifiés aux positions -1009, -799, -127 (125). Cette dernière position pourrait être la plus importante pour une expression spécifique dans l'hypophyse. De plus, l'activité du promoteur est augmentée s'il y a co-transfection de Pit-1 dans des cellules COS-7, une lignée cellulaire n'exprimant pas Pit-1 (15). Le facteur de transcription Brn-2 (brain-2) a été identifié à la position -700. La région promotrice contient également des motifs consensus correspondant à des éléments inductibles par la machinerie impliquée dans la transmission des signaux extracellulaires tels un motif CREB (cAMP-response element (CRE)-binding protein) à la position -483 et un motif NF- κ B à -429 (125).

1.4.3 Expression du GHRH-R

L'ARNm du récepteur du GHRH dans l'hypophyse antérieure de rat est présent sous forme de deux transcrits de 2.5 et 4.0 kb (10, 75). Le transcrit de 2.5 kb génère un récepteur fonctionnel de ~47 kDa (10, 75) alors que la structure du récepteur issu du transcrit de 4.0 kb demeure encore inconnue. Lors du clonage du GHRH-R de rat, deux cDNA complets ont été identifiés (10). Ils diffèrent par la présence ou l'absence de 123 pb, codant pour 41 aa additionnels dans la troisième boucle intracytoplasmique (10). La forme courte de 423 acides aminés est prédominante dans l'hypophyse antérieure de rat et est de taille identique au GHRH-R humain et de souris (10, 75). La forme longue a récemment été étudiée et elle lie le GHRH, cependant seulement la forme courte active la voie de signalisation de

l'adénylate cyclase (127). Un autre isoforme de GHRH-R, nommé GHRH-R β , a été identifié dans l'hypophyse de rat normal et nain. Il renferme l'insertion de 123pb et en plus une délétion de 131 nucléotides dans la région 3' de la région codante, générant un codon stop (127A). La séquence en aa prédite diffèrerait à l'extrémité C-terminale où les 5 derniers aa sont substitués et où une extension de 17 aa est présente (127A). Dans l'hypophyse humaine normale, des transcrits de 2, 2.8 et 4.5 kb, le premier étant la forme la plus abondante, ont été décrits (102). Par contre, dans les adénomes hypophysaires, les transcrits de 2.8 et 4.5 kb sont prédominants. Le GHRH-R fonctionnel est encodé par le transcrit de 2 kb alors que les deux autres transcrits codent pour des isoformes du récepteur générés par épissage alternatif (102, 103). Des études de co-expression ont montré que l'isoforme a une fonction de modulateur dominant-négatif, puisqu'il inhibe la production d'AMPc stimulée par le GHRH, en présence du récepteur natif (128). Chez la souris, on retrouve un doublet de transcrits à 2 et 2.1 kb avec une abondance relative de 4:1 (104). Chez le mouton, deux transcrits de 2 et 3.5 kb ont été retrouvés (101).

1.4.4 Régulation de l'expression du GHRH-R

Plusieurs hormones peuvent moduler l'expression du gène du GHRH-R dont le GHRH. Une incubation de quatre heures en présence de GHRH résulte en une diminution concentration-dépendante des niveaux d'ARNm du GHRH-R, dans des cultures primaires de cellules hypophysaires de rat (129). Récemment, une étude similaire a été effectuée en utilisant différents temps d'incubation avec le GHRH; un traitement de 24h au GHRH permet une restauration des niveaux d'ARNm du récepteur alors qu'un traitement de 72h provoque sa surexpression (130). Une immunoneutralisation du GHRH chez le rat nouveau-né entraîne une diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R (131). Par contre, chez le rat jeune, une immunoneutralisation du GHRH entraîne une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH-R dans l'hypophyse (132).

Les glucocorticoïdes influencent l'expression du GHRH-R. Un élément de réponse positif aux glucocorticoïdes a été localisé dans la région entre -1456 et -1181pb (125). Une régulation à la baisse du nombre de sites de liaison du GHRH a été observée dans des cellules adénohypophysaires en culture provenant de rats surrénalectomisés. Une thérapie de remplacement à la dexaméthasone restaure la concentration de sites de liaison (133). Les niveaux d'ARNm du GHRH-R sont également diminués chez les rats surrénalectomisés et augmentés suite à un traitement à la corticostérone (134). Dans des cellules adénohypophysaires en culture, une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH-R a été observée suite à un traitement à la dexaméthasone (134) ou à l'hydrocortisone (135).

Les hormones thyroïdiennes contrôlent également l'expression du gène du GHRH-R. Il a été montré qu'elles augmentent, *in vitro*, la sensibilité des cellules somatotropes au GHRH. L'hypothyroïdie provoquée chez le rat par une thyroïdectomie (136) ou le blocage chimique de la synthèse des hormones thyroïdiennes (137, 29) entraîne une diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R (136, 137), de la concentration des sites de liaison à haute et à basse affinité du GHRH (29) ainsi que de la concentration de GHRH-R immunoréactif (29). La diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R est renversée par une thérapie de remplacement à la thyroxine (T_4) (136, 137). Une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH-R a été observée dans des cellules hypophysaires de rats en culture incubées 24h avec de la T_3 (135). Malgré ces effets, aucun élément de réponse pour le récepteur des hormones thyroïdiennes n'a été identifié dans la région de 2 kb adjacente à la région codante du gène (125). Cependant, il pourrait être présent dans une région 5' plus distale.

Récemment, une étude de l'effet des glucocorticoïdes combinés aux hormones thyroïdiennes et à l'acide rétinoïque a été effectuée dans des cellules MtT/S, une lignée cellulaire clonale de GH dérivée d'une tumeur somatotropique de rat induite par des estrogènes, et dans des cellules hypophysaires fœtales de rat (138). Dans

ces deux modèles, les hormones thyroïdiennes et rétinoïques n'ont eu que peu d'effet sur l'expression de l'ARNm du GHRH-R, mais agissent en synergie avec la dexaméthasone et de façon concentration-dépendante pour augmenter spécifiquement l'expression de l'ARNm du GHRH-R (138).

Quant aux hormones sexuelles, un élément de réponse négatif a été trouvé pour le β -estradiol entre les positions -202 et -108 pb et pour les oestrogènes entre -317 et -888 du gène du GHRH-R (125). Les niveaux d'ARNm du GHRH-R sont augmentés chez les rates ovariectomisées, mais diminuent lors d'un traitement aux estrogènes (139). Cette régulation à la baisse du GHRH-R par les estrogènes pourrait expliquer la différence entre les niveaux d'ARNm entre les sexes. Le niveau d'ARNm chez la rate ne représente que 15-30% de celui exprimé chez le rat (140, 141). Parallèlement, les femelles ont un taux de libération de GHRH 33% plus faible que celui des mâles (140). Donc, chez la femelle, la réduction de l'expression du GHRH-R pourrait expliquer une plus faible amplitude des pics de sécrétion de GH stimulée par le GHRH (140).

Le GHRH-R est régulé différemment durant le développement. Par exemple, les hypophyses de mammifères aux stades fœtal et néonatal sont plus sensibles à l'effet du GHRH, sur la sécrétion de GH, que les hypophyses matures (6, 142, 143). Ceci suggère la possibilité d'un contrôle différentiel de l'expression de l'ARNm du GHRH-R par le GHRH au cours du développement. Chez les rats nouveau-nés, une immunoneutralisation du GHRH entraîne une diminution de plus de 50% des niveaux d'ARNm du GHRH-R (131). Au cours du développement, l'expression génique du GHRH-R chez le rat est la plus élevée au jour 19.5 de la gestation et durant la période périnatale, puis décline jusqu'à atteindre un nadir à l'âge de 12 jours (144). Les niveaux d'ARNm du GHRH-R augmentent à nouveau à l'âge de 30 jours, soit à l'âge de la maturité sexuelle, et diminuent jusqu'à l'âge d'un an, correspondant à l'âge le plus avancé de l'étude (144).

1.4.5 Localisation du GHRH-R

Dans l'hypophyse, l'ARNm du GHRH-R est localisé par hybridation *in situ* dans le lobe antérieur (10). Une hybridation *in situ* avec double marquage chez l'humain et le rat met en évidence une co-localisation des ARNm de la GH et du GHRH-R (145) indiquant l'expression du récepteur dans les cellules somatotropes. Chez le rat et l'humain, une étude d'immunoréactivité a démontré que le GHRH-R est limité aux cellules somatotropes et colocalisé avec la GH (99).

Le GHRH-R a également été détecté dans plusieurs tissus extrahypophysaires. Dans le SNC, des évidences indirectes ont montré l'existence du GHRH-R dans le noyau arqué de l'hypothalamus. Celui-ci participerait au rétrocontrôle négatif du GHRH sur sa propre neurosécrétion (13). Récemment, l'ARNm du GHRH-R a été détecté dans ce noyau (145). De plus, la présence et/ou l'action du GHRH (146, 147) et la présence de l'ARNm du GHRH-R (145) dans d'autres structures du cerveau, qui ne sont pas impliquées dans la fonction hypophysiotropique du GHRH, suggèrent de nouveaux rôles neuromodulateurs pour ce peptide. L'ARNm du GHRH-R a été détecté par RT-PCR dans le cortex et le tronc cérébral ainsi que dans le cervelet (86).

En dehors du SNC, la technique de RT-PCR a permis la détection des gènes du GHRH et du GHRH-R, chez le rat, dans une variété de tissus incluant la glande thyroïde, le cœur, le poumon, le duodénum, l'intestin grêle, la rate, la glande surrénalienne, le rein (cortex, médulla et pelvis), l'épididyme et le muscle squelettique (86). La présence de l'ARNm du GHRH-R a également été détectée dans le testicule, l'ovaire et le placenta (75), mais non dans le foie, l'estomac et le tissu adipeux. (75,86). Parmi ces tissus, la médulla rénale représente le seul tissu renfermant une concentration suffisante d'ARNm pour permettre sa détection par Northern blotting (86). Les plus hauts niveaux d'expression du récepteur et de son ARNm ont été détectés dans les anses de Henlé (148). Sur la base d'étude de structure-affinité et

de réticulation chimique, il est suggéré que le GHRH-R de l'hypophyse antérieure et de la médulla de rein soient différents (149). De plus, le profil de niveaux d'expression d'ARNm du GHRH-R rénal au cours du développement est différent de celui du récepteur hypophysaire, bien qu'un dimorphisme sexuel soit observé dans les deux tissus (148). L'importance physiologique des ces GHRH-R extrahypophysaires n'est pas encore connue.

1.4.6 Voies de signalisation intracellulaires du GHRH-R

Suite à la liaison du GHRH à son récepteur, plusieurs voies de signalisation intracellulaires sont activées pour produire les effets du GHRH. Le système adénylate cyclase (AC)-AMPc-protéine kinase A (PKA) est la voie de signalisation intracellulaire la plus importante (2, 10, 101, 150-156). Lors de la liaison du GHRH à son récepteur, la sous-unité Gs- α stimule l'activité adénylate cyclase qui résulte en une augmentation concentration-dépendante d'AMPc intracellulaire qui permet la phosphorylation de la PKA cytosolique (157). Cette dernière phosphoryle à son tour plusieurs protéines dont les canaux calciques : ceci entraîne une dépolarisation de la membrane cytoplasmique des somatotropes provoquant ainsi l'ouverture des canaux Ca²⁺ voltage-dépendants et un influx de Ca²⁺ extracellulaire (157-166). La calmoduline lie alors le Ca²⁺ pour former un complexe actif. Celui-ci active la protéine kinase calmoduline-dépendante qui, en modifiant les propriétés des membranes de vésicules de sécrétion et/ou la fonction de peptides à la surface cytoplasmique des membranes cellulaires, permet l'exocytose de la GH.

Le système inositol phosphate-diacylglycérol-protéine kinase C (PKC) est également impliqué dans la réponse au GHRH via l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂), mais à un degré moindre (2, 150, 151, 153, 154, 158, 162, 167-169).

Récemment, il a été montré que le GHRH peut activer une voie MAP kinase

(MAPK) dans des cellules hypophysaires et dans une lignée cellulaire surexprimant le GHRH-R (170). L'activation des MAPK par le GHRH est concentration-dépendante dans la lignée cellulaire somatotrope de rat GH4 et est bloquée par un traitement avec un analogue de la somatostatine (171).

1.5 Axe somatotrope et vieillissement

Le vieillissement biologique peut être caractérisé par une défaillance et une perte de coordination entre plusieurs systèmes de contrôle de l'intégration des processus physiologiques. Ceci amène des perturbations de l'homéostasie des cellules et organes et une perte de capacité d'adaptation de l'organisme face aux agressions internes et externes (172).

Il est maintenant admis que la diminution du GH contribue au processus de vieillissement chez les mammifères (173). Ainsi, chez les humains et les rongeurs, une diminution de la sensibilité de l'axe somatotrope au GHRH (174-176) et conséquemment des niveaux plasmatiques de GH et d'IGF-I entraînent une diminution de la masse musculaire, une augmentation de la masse adipeuse et une détérioration de plusieurs tissus et organes (177-180). Ainsi, chez les hommes en santé, il a été démontré que dans l'intervalle d'âges de 21 à 71 ans, les concentrations circulantes de GH diminuent de 14% à chaque décennie et la demi-vie de GH chute de 6% (172). Une réduction du nombre et de l'amplitude des pics de sécrétion spontanée de GH au cours du sommeil a également été rapportée chez des adultes de 50 ans et plus (181).

Il existe plusieurs similarités entre les modifications endocriniennes et métaboliques qui se produisent au cours du vieillissement et celles décrites chez les adultes déficients en GH. Les deux conditions sont caractérisées par une réduction de la masse musculaire, une augmentation de la masse adipeuse, une diminution de la fonction rénale, une diminution du taux de division cellulaire de même qu'une réduction de la masse et de la densité osseuse, l'apparition de déficits dentaires et

une diminution de l'absorption de Ca^{2+} et de la synthèse protéique globale (182). De plus, l'administration de GH à des personnes âgées reverse certains de ces phénomènes, incluant une amélioration de la balance azotée (183), une augmentation de la masse musculaire, une diminution de leur masse adipeuse et une augmentation de la densité osseuse (184).

Chez le rat, des réductions des niveaux de GH et d'IGF-1 sont également observées (174). Par contre, chez le rat mâle et femelle, la fréquence des pics de sécrétion ne change pas avec l'âge (175). Les premières évidences de modification de la sécrétion de GH apparaissent à l'âge de 12 mois où une diminution significative de la sécrétion stimulée par le GHRH a été observée *in vitro* et *in vivo* (174). Elle est accompagnée d'une diminution d'environ 15% de la concentration d'ARNm de la GH (175) qui ne se traduit pas en une diminution significative de son contenu immunoréactif (174).

Chez le rat de 18 et 20 mois, la sécrétion de GH en réponse au GHRH est réduite de façon drastique (174), la concentration hypophysaire d'ARNm de la GH est diminuée de 50% (185) et son contenu immunoréactif de 30% (174). De plus, des études immunocytochimiques ont démontré une réduction du nombre et de la taille des cellules somatotropes (186). Ces modifications ont un impact négatif sur la concentration de GH sécrétée à chaque épisode. Par ailleurs, la sécrétion basale de GH a été rapportée comme étant augmentée (174), inchangée (187,188) ou diminuée (189, 190). Chez le rat de 24 mois, l'état de vieillissement a été partiellement attribué à une diminution du contenu hypothalamique de GHRH (191, 192) et des concentrations de l'ARNm du préproGHRH (192), mais non à la perte des neurones GHRHergiques (191).

La contribution de la SRIF hypothalamique à ce processus demeure controversée puisque que des résultats divergents ont été rapportés. Chez le rat de 18 et 20 mois, les niveaux d'ARNm de la preproSRIF et les contenus immunoréactifs

en SRIF ont été rapportés inchangés (191), augmentés (193,194) ou diminués (174-176, 185, 195). Récemment, il a été démontré que les niveaux des sous-types 2 et 5 des récepteurs de la SRIF déclinent après l'âge de 16 mois chez le rat (196). Au niveau hypothalamique, une diminution de l'activité de la norépinéphrine, de la dopamine et de l'acétylcholine a été détectée chez le rat âgé (197, 198). Comme ces neurotransmetteurs sont impliqués dans le contrôle de la sécrétion de la GH (la norépinéphrine et l'acétylcholine stimulant les neurones GHRHergiques et inhibant les neurones SRIFergiques, et le système dopaminergique exerçant une modulation de l'activité noradrénergique) (197, 197A), leur déclin pourrait contribuer à une diminution de la libération de GHRH et à une augmentation de la libération de SRIF (194).

Il semble, par contre, que la machinerie intracellulaire impliquée dans la sécrétion de GH ne soit pas altérée chez le rat âgé, puisqu'une administration combinée de GHRH et de growth hormone-releasing peptide (GHRP) provoque une forte stimulation chez les rats de 3 et de 19 mois (199). La diminution de la sécrétion de GH au cours du vieillissement, et par conséquent d'IGF-I, pourrait donc résulter davantage d'une stimulation inappropriée des cellules somatotropes, due plus à des altérations du GHRH-R que d'un défaut des mécanismes de sécrétion de la GH (199, 200).

1.5.1 GHRH-R et vieillissement

Dans des homogénats d'hypophyses antérieures de rat Sprague Dawley de 2 mois, des études de liaison avec le [125 I-Tyr 10]GHRH(1-44)NH $_2$ (125 I-GHRH) ont mis en évidence la présence de deux classes de sites de liaison pour le GHRH (201). Ces sites de liaison à haute et à basse affinité subissent plusieurs altérations au cours du vieillissement (201, 202). D'abord, une diminution du nombre de sites à haute affinité est observée chez les rats de 8 mois. Puis, à l'âge de 14 mois, une augmentation transitoire du nombre de sites à basse affinité est détectée, suivie à 18

mois d'une disparition du site à haute affinité et d'une diminution apparente du nombre total de sites de liaison. Il en résulte donc la présence d'une seule classe de sites possédant une affinité intermédiaire et un nombre de sites de liaison inférieure à celui observé dans l'hypophyse des rats de 2 mois (201, 202). Comme la réduction de capacité du site à haute affinité est en corrélation avec la diminution de la sécrétion de GH se produisant au cours du vieillissement (174, 201), ces résultats suggèrent que cette entité représente le récepteur fonctionnel qui permet les actions biologiques du GHRH dans les somatotropes (200).

Chez le rat de 20-24 mois, ces changements entraînent une réduction d'environ 45% de la production d'AMPc stimulée par le GHRH, mais non par d'autres agents tels que le VIP, la forskoline et les nucléotides guanylés (203). Par ailleurs, les paramètres de liaison des récepteurs hypophysaires de la SRIF ne sont pas altérés chez le rat âgé (190).

Comme les altérations du GHRH-R débutent vers 8 mois, soit à un âge auquel aucune anomalie centrale ou périphérique connue pourrait influencer la sensibilité des somatotropes au GHRH, il a été proposé que les changements des caractéristiques du GHRH-R et/ou de sa concentration pourraient représenter un des facteurs initiateurs, conduisant à la diminution de production d'AMPc (201-203) stimulée par le GHRH et conséquemment à la diminution de la sécrétion de GH. Des résultats d'essais de liaison, en présence et en absence de nucléotides guanylés non-hydrolysables et/ou d'agents réducteurs, suggèrent que des changements de caractéristiques moléculaires du GHRH-R entraînent une diminution de la capacité du récepteur à se lier à ses ligands spécifiques ou à sa protéine G_s , une stimulation inadéquate de l'adénylate cyclase et une diminution de la production d'AMPc (202). En plus de son rôle important dans les mécanismes intracellulaires impliqués dans la sécrétion de la GH, l'AMPc est essentielle à la transcription des gènes de la GH et du GHRH-R (204, 116). Par conséquent, une diminution d'AMPc dans l'hypophyse de rat âgé pourrait mener à une diminution de la concentration de la GH et du GHRH-

R. Des résultats récents ont de plus démontré que les deux transcrits d'ARNm du GHRH-R de 2.5 et 4.0 kb sont régulés différemment au cours du vieillissement. À l'âge de 14 et 18 mois, une augmentation de 1.5 à 1.8 du ratio des transcrits de 4.0/2.5 kb est observée. À l'âge de 18 mois, une diminution de 30% du niveau du transcrit de 2.5 kb est observé dans environ 50% des hypophyses tandis que celui du transcrit de 4.0 kb est augmenté de 1.5 à 2 fois dans toutes les hypophyses (205). Une diminution progressive des niveaux de l'ARNm GHRH-R, a également été détectée par RT-PCR semi-quantitatif, récemment chez des rats de 6 à 24 mois (196).

Comme un apport central en catécholamines (206) ou un traitement par des agonistes muscariniques (197A) n'affectent pas ou ne restaurent que partiellement la sécrétion de GH induite par le GHRH chez le rat âgé, il a été suggéré que l'augmentation de GHRH endogène ou la diminution de la SRIF endogène ne soit ni suffisante pour réjuvener la sécrétion de GH.

1.6 Modulation nutritionnelle de l'axe somatotrope et du GHRH-R

Même si plusieurs facteurs contribuent à un vieillissement réussi, la nutrition représente un des plus puissants régulateurs (207, 208). Il a été démontré que le statut nutritionnel à long terme de l'organisme joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Les effets négatifs de la surnutrition sont évidents dans des conditions dégénératives majeures telles l'obésité, le cancer, le diabète et l'athérosclérose. Une consommation excessive de calories au cours d'une vie entière semble donc accélérer la sénescence (208).

1.6.1 Restriction calorique modérée

La restriction calorique (RC), c'est-à-dire une diminution de la consommation calorique sans malnutrition, a émergé au cours des dernières années comme étant

l'intervention anti-vieillessement la plus bénéfique chez les mammifères (172, 209-211). Chez les rongeurs, la prévention de la détérioration des tissus et organes liés au vieillissement, le ralentissement du début ou de la progression de plusieurs maladies liées à l'âge et donc l'extension de la durée de vie moyenne et maximale peuvent être atteints par une restriction calorique de longue durée (208).

Les mécanismes biologiques impliqués dans ces processus demeurent inconnus bien qu'il y ait plusieurs hypothèses. Une des hypothèses la plus souvent présentée étant que la RC atténuerait les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres qui entraînent des pertes de fonctions et des pathologies au cours du vieillissement (212, 213). La RC permet de plus une modulation de certains taux hormonaux, activités sensorielles et permet l'augmentation de l'expression génétique et des taux de synthèse protéique. (208) La RC pourrait également agir en modulant la glycémie et l'insulinémie, qui causent des dommages liés au vieillissement (214). De plus, il a été proposé que l'hormesis, défini comme étant les actions bénéfiques résultant de la réponse d'un organisme à un stress de faible intensité, soit un des mécanismes d'action de la RC (215).

Récemment, l'analyse des niveaux d'expression de plusieurs gènes à l'aide de puces biologiques a révélé qu'un grand nombre de gènes, parmi les 6347 gènes étudiés, est influencé par la RC de longue durée, dans le muscle squelettique de souris (216). La RC a permis de prévenir partiellement ou en totalité les altérations de gènes de réponse au stress et ceux impliqués dans le métabolisme et la biosynthèse observés chez la souris âgée nourrie *ad libitum*. Les profils transcriptionnels de muscles des animaux en RC suggèrent que cette approche nutritionnelle agit en causant une diminution des dommages macromoléculaires et une augmentation du turnover protéique (216). Cette dernière hypothèse est soutenue par une nouvelle étude montrant que la RC diminue l'expression de plusieurs chaperonnes moléculaires du foie et augmente le taux et l'efficacité de la sécrétion protéique (217). Par ailleurs, une étude de l'expression de 588 gènes du

foie de souris a permis d'identifier des différences de niveaux de 6 gènes au cours du vieillissement dont un seul, le Cdkn 2c (inhibiteur 2c de la kinase cycline dépendante), un gène mitogénique, était régulé à la baisse par la RC (218). Quatre gènes additionnels, dont les niveaux n'étaient pas modifiés au cours du vieillissement, étaient régulés par la RC. Le niveau d'expression du gène Ybx 1 (un répresseur de l'activation de l'interféron gamma du complexe de gènes d'histocompatibilité majeur de classe II) était diminué alors que ceux de Ttf 1 (transcription termination factor 1), EGR 1 (early growth response 1) et Ctstl (cathepsin L) étaient augmentés (218).

Il a également été suggéré que les effets bénéfiques de la restriction calorique seraient en partie modulés par un maintien de la fonctionnalité de l'axe somatotrope puisque chez les rats âgés soumis à une RC, un profil de sécrétion de la GH similaire à celui des rats jeunes a été observé (219). De plus, une restriction calorique modérée, débutée à l'âge de 8 mois, permet la prévention des altérations des sites de liaison du GHRH-R, normalement observées dans l'hypophyse antérieure de rats de 18 mois (220). Récemment, il a été rapporté que la RC tend à augmenter, mais de façon non-significative, les niveaux d'ARNm du GHRH-R par rapport à ceux des rats âgés nourris *ad libitum*, mais non ceux des sous-types 2 et 5 du récepteur de la SRIF (196). De plus, la RC prévient la diminution des niveaux d'ARNm de la GH observée dans l'hypophyse antérieure des rats âgés (221).

1.6.2 Apport protéique

Chez les rats jeunes, il a été démontré que la sensibilité de l'axe somatotrope (GHRH/GH/IGF-I) est modulée par l'apport protéique. En effet, la sécrétion de GH induite par le GHRH est significativement diminuée chez les rats nourris avec une diète faible en protéines (4%) comparativement à ceux nourris avec une diète standard de 23% (222). Par contre, aucune atténuation significative n'a été observée chez les rats nourris avec une diète renfermant 23% de protéines, mais équivalente

en calories à une diète de 4% de protéines. L'apport protéique apparaît donc indispensable à la régulation optimale de la sécrétion de GH (222). Chez le rat soumis à un jeûne de 72 h, la sécrétion épisodique de GH est restaurée par un repas contenant un apport protéique adéquat (71). Chez le rat privé de protéines pendant 72 h, une réduction spécifique de 80% de la concentration hypothalamique d'ARNm du préproGHRH est observée (223). La réalimentation protéique permet une restauration des taux d'ARNm du préproGHRH en 48 h (98, 223). Chez les rats de 2 mois soumis à un jeûne de 24 ou 72h, la sécrétion pulsée de SRIF est préservée (224). Des évidences indirectes suggèrent que le taux de SRIF est élevé chez les rats jeunes soumis à un jeûne puisqu'une immuno-neutralisation *in vivo* de la SRIF restaure la sécrétion de GH (225). L'ensemble de ces résultats indique qu'une réduction de l'apport protéique induit des altérations de l'axe somatotrope qui semblent résulter d'une diminution du taux de GHRH et d'une augmentation du taux de SRIF (226). Chez les humains et les moutons, les acides aminés et les protéines semblent aussi jouer un rôle critique dans la sensibilité de l'axe somatotrope (227, 228). Par exemple, les acides aminés essentiels influencent la restauration optimale des niveaux d'IGF-I circulants après un repas (227). Les effets à long terme de la modulation de l'axe somatotrope par l'apport protéique n'ont toutefois pas été étudiés jusqu'à présent.

Il a cependant été démontré qu'une restriction protéique de 21% à 12%, sans restriction énergétique, permet une faible augmentation de la longévité (15%) chez le rat (208). Par ailleurs, une restriction énergétique couplée à une diète protéique de 21% ou 35% entraînent une augmentation de 50% de la longévité (208). Finalement, il a été observé que les taux de GH plasmatiques sont significativement plus élevés chez les rats Wistar âgés nourris, à long terme, avec une diète renfermant 20% de protéines comparativement à 14% de protéines (229).

En résumé, la sensibilité et la fonctionnalité de l'axe somatotrope diminuent au cours du vieillissement chez les humains et les rongeurs, résultant en une

diminution des fonctions des tissus et des organes. Même si plusieurs facteurs contribuent à un vieillissement réussi, la nutrition est vue comme étant un régulateur très puissant (207). Chez les personnes âgées, l'état de santé est particulièrement sensible à la diminution de l'apport protéique (207). De plus, de récentes hypothèses proposent que même si les besoins énergétiques diminuent avec l'âge, l'apport protéique doit être maintenu afin de prévenir la fragilité (207). Ces hypothèses sont supportées par des données épidémiologiques révélant que la dénutrition protéique augmente la susceptibilité aux maladies chez les personnes âgées et diminue la longévité tandis qu'un apport calorique modéré couplé à un apport protéique optimal retarde ces phénomènes (229).

1.7 Hypothèse et objectifs

Nous avons donc émis l'hypothèse que la combinaison de ces deux facteurs, soit la restriction énergétique modérée de longue durée et l'apport protéique optimal, pourrait être bénéfique au cours du vieillissement, en modulant positivement l'axe somatotrope, principalement en maintenant l'intégrité fonctionnelle du récepteur hypophysaire du GHRH.

Afin de vérifier cette hypothèse et dans le but d'identifier certains des mécanismes qui régissent les effets de la restriction calorique et de l'apport protéique, au niveau de l'axe somatotrope, au cours du vieillissement, et plus particulièrement au niveau du GHRH-R, une étude a été entreprise chez le rat mâle Sprague Dawley. Cette souche a été utilisée puisque les modifications de son métabolisme et de son système endocrinien sont documentés dans la littérature et que le vieillissement de l'axe somatotrope est semblable chez le rat et chez l'humain.

Une colonie de rats a été soumise à l'une des quatre diètes suivantes:

Groupe 1, témoin: alimentation *ad libitum*, apport protéique de 22%,
implantation de la diète à l'âge de 2 mois,

Groupe 2: alimentation *ad libitum*, apport protéique de 13.2%, implantation de la diète à l'âge de 2 mois,

Groupe 3: restriction calorique de 40% par rapport à la prise alimentaire du groupe témoin, implantation de la diète à l'âge de 8 mois,

Groupe 4: restriction calorique de 40% par rapport à la prise alimentaire du groupe témoin avec enrichissement protéique à 22%, implantation de la diète à l'âge de 8 mois.

La diète de chaque groupe contenait une quantité identique de vitamines et de minéraux. La régulation de l'axe somatotrope a été évaluée chez ces rats à l'âge de 12, 18 et 22 mois, en comparaison à des rats témoins de 2 mois nourris à satiété avec une diète standard. Ces âges de sacrifices ont été choisis parce qu'ils représentent des points cruciaux pour la mise en évidence d'altérations de l'axe hypothalamo-hypophysaire, incluant celles du GHRH-R.

Les résultats de cette étude ont permis la rédaction de deux manuscrits qui sont présentés dans ce mémoire. Plusieurs aspects de l'axe somatotrope ont été étudiés, soit la caractérisation du GHRH-R hypophysaire et rénal et l'étude des niveaux hormonaux pouvant l'influencer sa régulation. Les résultats en regard de ces objectifs se retrouvent dans le premier manuscrit, soumis en 2001 dans la revue *Endocrinology* et intitulé "Nutritional regulation of the pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in the aging rat: effects of central and peripheral factors". Le deuxième article intitulé "Nutritional regulation of the leptin axis in the aging rat" et co-soumis avec le premier rapporte la contribution de la leptine et de son récepteur hypothalamique à la régulation nutritionnelle de l'axe somatotrope au cours du vieillissement.


2. MANUSCRITS

Titre de l'article : « Nutritional regulation of the pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in the aging rat: effects of central and peripheral factors. »

Auteurs : Karin Robinette, Alma Robert, Chantale Boisvert, Caroline Paré, Guylaine Ferland et Pierrette Gaudreau.

Participation : L'ensemble des expériences de dosages hormonaux RIA et d'essais de liaison de même que tous les traitements statistiques ainsi que l'interprétation des résultats de cet article ont été effectués par Karin Robinette. Les expériences de Northern Blotting pour la quantification de l'ARNm hypophysaire du GHRH-R ont été effectuées par Karin Robinette assistée d'Alma Robert, assistante de recherche au laboratoire de Neuroendocrinologie du Vieillessement. Les expériences de protection à la RNase, pour la quantification des niveaux d'ARNm du preproGHRH hypothalamique ont été effectuées par Alma Robert. Les expériences de protection à la RNase, pour la quantification des niveaux d'ARNm du GHRH-R rénal, ont été effectuées par Chantale Boisvert, étudiante au doctorat et Caroline Paré, étudiante à la maîtrise sous la direction de P Gaudreau et dont les projets se rapportent au GHRH-R rénal. Pierrette Gaudreau et Guylaine Ferland, département du Nutrition, Université de Montréal étaient responsables du design et du suivi de la colonie. Pierrette Gaudreau a également supervisé les étapes de réalisation de l'étude.


Karin Robinette


Alma Robert


Chantale Boisvert


Caroline Paré


Guylaine Ferland


Pierrette Gaudreau

Le 20 décembre 2001, à titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'accepte que Karin Robinette inclut cet article soumis à la revue Endocrinology dans son mémoire de maîtrise en Sciences biomédicales intitulé « Régulation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance au cours du vieillissement: effet de la restriction calorique et de l'apport protéique. »

Nutritional regulation of the pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in the aging rat: contribution of central and peripheral factors

Karin Robinette, Alma Robert, Chantale Boisvert, Caroline Paré, Guylaine Ferland and Pierrette Gaudreau

Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital and Departments of Medicine and Nutrition, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence and request for reprints should be addressed to:

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

Tel: (514) 890-8000 extension 27159

Fax: (514) 412-7661

e-mail : pierrette.gaudreau@umontreal.ca

Running title: Nutritional regulation of GHRH receptor in the aging rat

Key words: growth hormone-releasing hormone, GHRH receptor, anterior pituitary, renal medulla, aging, caloric restriction, protein intake, steroid hormones, thyroid hormones.

ABSTRACT

Aging is characterized by a decreased functionality of the somatotroph axis and alterations of the anterior pituitary GHRH receptor (GHRH-R). Long-term moderate caloric restriction (CR) is recognized as the most powerful intervention in animals to prevent or delay age-related deterioration and diseases and to extend both mean and maximum life span. Beneficial effects of CR have been related, at least in part, to the maintenance of youthful GH secretory patterns and GHRH binding sites.

The objective of this study was to assess the impact of long-term moderate caloric and protein restrictions on the pituitary and renal GHRH-R of 12-, 18- and 22-month-old male Sprague Dawley rats and, to identify peripheral and central factors by which CR exerts its action. Caloric and protein restrictions were started at 8 and 2 months of age, respectively. The most drastic and diversified regulatory effects on GHRH-R were observed in 18-month-old rats. In the pituitary of these rats, only CR could rejuvenate GHRH-R mRNA transcripts levels and GHRH binding sites. In their renal medulla, only CR combined with a 22% protein intake could rejuvenate GHRH-R mRNA levels. Among hormonal regulators of GHRH-R, modified by caloric or protein restriction, GHRH, testosterone and glucocorticoids represent the most promising molecules to investigate, in order to better understand the complex mechanism of action of these dietary interventions.

INTRODUCTION

In the anterior pituitary, growth hormone (GH) pulsatility is regulated by the opposite action of two hypothalamic peptides, GH-releasing hormone (GHRH) and somatostatin (SRIF) (1). They respectively stimulate and inhibit GH secretion and synthesis (2-4) by triggering specific G_s and G_i protein-coupled plasma membrane receptors (5, 6).

The GHRH receptor (GHRH-R) has been cloned in rat (5, 7), mouse (7), porcine (8), bovine (9), ovine (9) and human pituitaries (5, 10, 11) and in human pituitary adenomas (10, 11, 12). It belongs to the subfamily B-III of G-protein coupled receptors (5). In rat and mouse pituitaries, the presence of 2-2.5-kb and 3.1-4-kb GHRH-R mRNA transcripts has been reported (5, 7). While the former likely generate the 423 amino acid (aa) functional GHRH-R (13), the structure and role of the latter has not been reported. In the rat, GHRH-R mRNA has been detected in several tissues, however the renal medulla represents the sole extrapituitary tissue containing a sufficient concentration of GHRH-R mRNA to allow its detection without amplification (14).

In aging human and rats, decreased responsiveness to GHRH and reduced GH and insulin-like growth factor I (IGF-I) serum levels result in an increase of body fat, diminution of muscle mass and a deterioration of several tissue and organ functions (15-19). In the rat pituitary, changes in the abundance of GHRH-R mRNA transcripts and GHRH-R binding sites (20-23) have been proposed as important events, resulting in the alteration of GHRH responsiveness and somatotroph functionality (24, 19).

Although multiple factors contribute to successful aging, nutrition is considered as one of the most potent regulators. Long-term moderate caloric restriction (CR) in rats and monkeys is recognized as the most powerful intervention to prevent or delay age-related deterioration and diseases and

consequently to extend both mean and maximum life span (25-27). The beneficial effects of CR have been related, at least in part, to the maintenance of youthful GH secretory patterns (28) and GHRH binding sites (29). The level of dietary protein has also been found to regulate the somatotroph axis. A short-term reduction of protein intake to 4% was shown to impair GH responsiveness to GHRH in 2-month-old rats (30) and to specifically diminish by 80% the level of hypothalamic preproGHRH mRNA (31). Protein or selective amino acid refeeding could normalize preproGHRH mRNA levels (31, 32).

Since energy and protein intakes exert a regulation of the somatotroph axis, in part through GHRH-R regulation, the first objective of the present study was to assess the effects of long-term CR combined to an optimal protein intake on pituitary and renal GHRH-R of aging male Sprague Dawley rats. The second objective was to identify peripheral and central factors, modified by caloric or protein restriction, and contributing to the regulation of GHRH-R.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Two-month-old male Sprague Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, CA) were individually housed in wire-bottom cages, in rooms under controlled temperature (22°C), humidity and lighting (12-h cycles: lights on at 07:00 h). Animals were fed to a semi-synthetic powdered diet prepared according to the Teklad control diet TD89248 (Teklad Test Diets, Madison, Wisc, USA) consisting of 22% casein (vitamin-free), 48.5% sucrose, 15% corn starch, 5% corn oil, 4.6% fiber (cellulose), 3.9% mineral mix and 1% vitamin mix (ICN Pharmaceuticals, Montreal, QC, CA) containing either 22% (control group) or 13.2% protein (40% protein restriction). At eight months of age the control *ad libitum*-fed group was randomized in three groups: 1) *ad libitum*-fed (22% protein intake), 2) 40% CR in comparison to *ad libitum*-fed (equivalent to 13.2% protein intake) and, 3) 40% CR in comparison to *ad libitum*-fed rats using a diet supplemented to 37% protein, to maintain a 22% total protein intake. In the latter group, sucrose was reduced to maintain identical amounts of calories among the two calorie-restricted groups. CR was implemented gradually: the rats were submitted to a 20% caloric reduction for two weeks and to 40% until death. All rats received equal amounts of minerals and vitamins and had free access to water. Body weight (BW) and food intake was recorded regularly. Rats were killed by decapitation between 09:30-11:30 at 12, 18 and 22 months of age along with 2-month-old *ad libitum*-fed control rats. The animal protocol was approved by the animal Care Committee of CHUM Research Center in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Macroscopic evaluation indicated no gross pathology in 12- and 18-month-old rats. In 22-month-old rats, 25% of rats submitted to *ad libitum*-feeding/22% protein intake had pituitary tumors and hydronephrosis, 38% of rats submitted to *ad libitum*-feeding/13.2% protein intake had pituitary tumors while 25% of them had hydronephrosis, 13% of the rats submitted to CR had pituitary tumors and no rat submitted to CR/22%

protein intake had pituitary or renal diseases. Twenty-two-month-old unhealthy rats were not used in any of the studies reported here. The percentage of survival from 18 to 22 months of age was 63% (5/8 animals) in rats submitted to *ad libitum*-feeding/13.2% protein intake, 63% (5/8 animals) in rats submitted to *ad libitum*-feeding/22% protein intake, 87% (1/8 animals) in rats submitted to CR and 86% (1/7 animals) in rats submitted to CR/22% protein intake. The total percentage of survival from 2 to 22 months of age was 79% in rats submitted to *ad libitum*-feeding/13.2% protein intake or to *ad libitum*-feeding/22% protein intake, 88% in rats submitted to CR and 73% in rats submitted to CR/22% protein intake.

Tissue handling

For binding assays, anterior pituitaries from each group were collected in ice-cold 50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.4 containing 5 mM MgCl₂ and 5 mM EDTA and used within 30 min. For Northern blotting and RNase protection assay, anterior pituitaries, renal medullas, hypothalami and livers were snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until RNA extraction, to quantify GHRH-R and preproGHRH mRNA levels. For determination of free thyroid hormones (T4 and T3), total IGF-I, total testosterone and total corticosterone immunoreactive levels and free fatty acid concentrations, trunk blood was collected and sera were kept at -80°C. BW at sacrifice and heart, liver and right kidney wet weights were determined.

Northern blot hybridization of pituitary GHRH-R mRNA

Total RNA was isolated from each anterior pituitary using a single step acid guanidinium-phenol/chloroform procedure with TRIzol (Invitrogen/Canada Life Technologies, Burlington, ON, CA). Aliquots of 12 µg total RNA were denatured by heating (65°C, 10 min) in a 50% formamide/17.5% formaldehyde/15 mM MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) buffer (pH

7.0), containing 5 mM sodium acetate and 1 mM EDTA. They were subjected to electrophoresis on 1.2% agarose gels containing 17.5% formaldehyde, using a 33 mM MOPS buffer. RNA was transferred by capillary elution to a nylon membrane (Hybond-NX, Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, CA) and covalently attached by UV cross-linking (Stratagene, La Jolla, CA) and heating (80°C, 2 h). Prehybridization was performed in Robbins' hybridization solution (7% SDS containing 0.25 M Na₂HPO₄ (pH 7.4), 1 mM EDTA (pH 8.0) and 1% bovine serum albumin) at 65°C, 2 h. Blots were hybridized with the RPR64 cDNA probe corresponding to the 3' segment of the rat GHRH-R cDNA (nucleotide positions, 1044-1611; accession number, NM_012850) (5). It was labeled with α -[³²P]dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech), using random hexamer primers and the Klenow fragment of E coli DNA polymerase (Invitrogen/Canada Life Technologies) and purified by chromatography, using a G-50 column (Amersham Pharmacia Biotech). Hybridization was performed in fresh Robbins' solution at 65°C, 16-18 h, in presence of 10X10⁶ cpm/ml [³²P]RPR64. Membranes were subsequently washed (2XSSC (standard saline citrate (SSC) (1X SSC: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate), pH 7.0)/0.1% SDS, 23°C, 2x10 min; 1XSSC/0.1% SDS, 65°C, 1-2x10 min; 0.5XSSC/0.1% SDS, 65°C, 1-2x10 min, if needed) and exposed to Biomax Ms-1 films (Eastman Kodak, Rochester, NY) at -80°C with an intensifying screen. Membranes were then stripped in a boiling aqueous solution of 0.1% SDS (60 min) and sequentially rehybridized with rat GAPDH and 28S rRNA probes (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Amounts of GHRH-R mRNA were normalized in each lane with 28S mRNA, as it was more stable than GAPDH mRNA in the physiological conditions studied. Quantification of each GHRH-R mRNA transcripts (2.5 and 4 kb), GAPDH mRNA and 28S rRNA levels were performed by densitometry, using an IS1000 digital imaging system (Alpha Innotech Corp/Canberra Packard Montreal, QC, CA). The intra-assay coefficient of variation of normalized GHRH-R mRNA signals was \leq 10% in all experiments. Specificity of the [³²P]RPR64 cDNA probe was assessed in each experiment using a negative control (12 μ g liver total RNA). In addition, linearity of protected

signals was verified in each experiment using 6-18 μg pituitary total RNA from 2-month-old rats. Results were expressed in percentage of relative density to those of 2-month-old rats, using a fixed amount of total RNA.

Ribonuclease protection assays of renal GHRH-R and hypothalamic preproGHRH mRNA

Total RNA was isolated from left renal medullas and hypothalami using a single step acid guanidinium-phenol/chloroform method with TRIzol (Invitrogen Life Technologies). Medullary GHRH-R mRNA levels were assessed using the RPR64 probe (5). The antisense GHRH-R [^{32}P]-labeled riboprobe was generated by *in vitro* transcription of the BamH I linearized RPR64-pGEM3z plasmid, using T7 RNA polymerase (MAXIscript transcription kit, Ambion, Austin, TX), in the presence of α -[^{32}P]UTP (800 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech). The riboprobe was purified on 5% denaturing polyacrylamide gel and eluted using the buffer supplied with the ribonuclease protection assay kit (RPA) (Ambion). Its specific activity was determined after trichloroacetic acid precipitation onto GF/B Whatman filters (Fisher Scientific Ltd, Montreal, QC, CA) and was $275\text{-}325 \times 10^6$ cpm/ μg RNA with 67-75% of α -[^{32}P]UTP incorporation. RPA was performed using the RPA II kit (Ambion). Twenty μg total RNA from renal medulla was hybridized for 16-18h at 50°C, after denaturation at 95°C for 3 min, with 1 pM [^{32}P]GHRH-R riboprobe. To normalize GHRH-R mRNA levels for experimental variations, 40 pg of an external standard, originating from the *in vitro* transcription of the sense sequence 1044-1203 of RPR64 cDNA, were added to each RNA sample before hybridization. Non annealed nucleic acids were digested with RNase A (1 U/ml) and RNase T (40 U/ml) at 37°C for 30 min. Stable hybrids were resolved on 1.5 mm 5% polyacrylamide-8 M urea denaturing gels. Autoradiography was performed at -80°C using Biomax MS-1 films (Eastman Kodak) and an intensifying screen. Bands were quantified by densitometry, using an IS1000 digital imaging system (Alpha Innotech Corp/Canberra Packard). The intra-assay coefficient of variation of normalized

GHRH-R mRNA levels was $\leq 10\%$ in all experiments. Specificity of the [^{32}P]RPR64 riboprobe was assessed in each experiment using positive (5 μg pituitary total RNA) and negative (20 μg of liver total RNA) controls. In addition, the linearity of protected signals was verified in each experiment, using 10-30 μg of total medulla RNA from 2-month-old rats. Results were expressed in percentage of relative density to those of 2-month-old-rats, using a fixed amount of total RNA.

Hypothalamic preproGHRH mRNA levels were also assessed by RPA, using a preproGHRH cDNA probe corresponding to the nucleotides 1-205 of the coding sequence (nucleotides, 285-490; accession number, M73486) (33). The antisense preproGHRH [^{32}P]-labeled riboprobe was generated by *in vitro* transcription of EcoRI linearized preproGHRH-pBlueScriptSK(+) plasmid, using T7 RNA polymerase (MAXIscript transcription kit, Ambion). Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) mRNA levels were determined, using a probe spanning the region of exons 5-8 of the rat GAPDH cDNA (nucleotide position, 369-685). The antisense-labeled probe was generated by *in vitro* transcription of the Xba I-linearized p-TRI-GAPDH plasmid (Ambion), using T7 RNA polymerase. The *in vitro* transcription conditions for preproGHRH and GAPDH cDNA were similar to those used in the RPA for GHRH-R mRNA. The specific activity of the [^{32}P]preproGHRH and GAPDH riboprobes were 870×10^6 cpm/ μg RNA and 11.5×10^6 cpm/ μg RNA, respectively with 85% and 67-75% of α -[^{32}P]UTP incorporation. Two and a half μg total RNA from each hypothalamus were hybridized for 16h at 42°C , after denaturing at 95°C for 3 min, with 2 pM [^{32}P]preproGHRH and [^{32}P]GAPDH riboprobes. An external standard (6.25 pg), originating from an *in vitro* transcription of the sense sequence of the preproGHRH cDNA, and corresponding to nucleotides 1-77 of the coding sequence (nucleotides 285-362), was added to each RNA sample before hybridization. Procedure for the RPA assay was as described above. Liver total RNA was used as negative control and the linearity of the assay was verified in

each experiment with 1.25-5 μg of hypothalamic total RNA from 2-month-old rats. Results were expressed in percentage of relative density to those of 2-month-old-rats, using a fixed amount of total RNA.

Binding assay of [^{125}I -Tyr 10]hGHRH(1-44)NH $_2$

Tissue preparation and cold saturation studies were performed as previously reported (21-23), using [^{125}I -Tyr 10]hGHRH(1-44)NH $_2$ (2000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) as radioligand. For each saturation curve, two anterior pituitaries from 12- and 18-month-old or three anterior pituitaries from 2-month-old rats were homogenized 8-10 sec, using a micro ultrasonic cell disrupter (Kontes, Vineland, NJ), in 1.5 and 0.7 ml/pituitary, respectively, in ice-cold 50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.4, containing 5mM MgCl $_2$ and 5mM EDTA. Fifty μL of homogenate were use in each assay tube (62-89 μg and 41-101 μg protein for pituitaries from 12- and 18-month-old rats, respectively) with 35-50 pM [^{125}I -Tyr 10]hGHRH (1-44)NH $_2$ and increasing concentrations of [^{127}I -Tyr 10]hGHRH(1-44)NH $_2$ (0.1-1000 nM) in a total volume of 300 μL of homogenization buffer, containing 0.42% BSA. Incubations were carried out at 23C for 60 min and stopped by centrifugation (12000 X g, 5min, 4°C). Nonspecific binding was determined in the presence of 1.0 μM rat GHRH (1-29)NH $_2$. Percentages of specific binding were 70, 60 and 62% for 2-month-old *ad libitum*-fed, 12-month-old *ad libitum*/22% protein-fed and 12-month-old *ad libitum*/13.2% protein-fed rats, respectively. They were 70, 69, 69, 69 and 69% for the 2-month-old *ad libitum*-fed, 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed and 18-month-old *ad libitum*/13.2% protein-fed, 18-month-old calorie-restricted and 18-month-old calorie-restricted/22% protein-fed rats, respectively. [^{127}I -Tyr 10]hGHRH(1-44)NH $_2$ and rat GHRH(1-29)NH $_2$ were synthesized in our laboratory (34).

Radioimmunoassays and determination of free fatty acid concentration

Serum concentration of free T4 and T3 and total IGF-I, testosterone and corticosterone were determined using commercial RIA kits (Incstar Corp, Stillwater, Min, Diagnostic Systems Laboratories Inc, Webster, Tex and ICN). For each RIA, all samples from each age group were analyzed in duplicate in a single assay. Intra-assay coefficients of variation were 6.1%, 5.4%, 6.2%, 7.3% and 6.6 %, respectively. The sensitivity of assays was 0.08 ng/mL, 0.05pg/mL, 21ng/mL, 0.1ng/mL and 20 ng/mL, respectively.

Serum concentrations of free fatty acids were determined as previously reported (29) using a methyl red colorimetric assay (35). The intra-assay coefficient of variation was 6.7% and the sensitivity of the assay was 50 μ mol/L.

Data analysis

Results were expressed as the mean \pm SEM. Statistical significance of differences was determined by the unpaired Student's *t* test and was established at $P < 0.05$. They were analyzed in order to determine: 1) the effect of aging (2-month-old were compared to 12-, 18- or 22-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats); 2) the effect of CR (2-month-old were compared to 18- or 22-month-old calorie-restricted rats); 3) the effect of CR in comparison to age-matched *ad libitum*-fed rats; 4) the effect of protein restriction in *ad libitum*-fed rats (12-, 18- or 22-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats were compared to age-matched *ad libitum*/13.2% protein-fed rats) and finally, 5) the effect of protein supplementation in calorie-restricted rats to maintain a 22% total protein intake (18- and 22-month-old calorie-restricted rats compared to age-matched CR/22% protein-fed rats). The LIGAND program was used to analyze cold saturation studies (36).

RESULTS

Body weight and organ wet weight

As shown in Table 1A, the BW of 12-month-old *ad libitum*-fed/22% protein rats was 2.4 times higher than that of 2-month-old *ad-libitum*-fed rats ($P < 0.001$). Similarly, heart, liver and kidney wet weights were 1.7-2 times greater ($P < 0.001$) in aged rats. Protein restriction had no significant effect on these parameters. BW of 18-month-old *ad-libitum*/22% protein-fed rats was 2.8 times higher than that of 2-month-old *ad libitum*-fed rats ($P < 0.001$) while that of 18-month-old rats submitted to a 40% CR was 1.8 times lower than that of 18-month-old *ad libitum*-fed rats ($P < 0.001$) and only 1.5 times higher than that of 2-month-old rats ($P < 0.001$). The level of protein intake had no significant effect on body weight of 18-month-old rats. Organ wet weights of 18-month-old *ad libitum*-fed rats were 1.5-2.4 higher than that of 2-month-old *ad libitum*-fed rats while that of CR rats were unchanged (liver) or 1.3-1.5 higher than that of 2-month-old rats ($P < 0.01-0.001$). A decrease of protein intake from 22 to 13.2% reduced kidney weight by 9% in *ad libitum*-fed rats ($P < 0.05$) while an increase of protein intake from 13.2 to 22% augmented kidney weight by 13% in CR rats ($P < 0.001$). Similar results to those observed in 18-month-old rats were seen in 22-month-old rats, except that the protein effect was not seen in calorie-restricted/22% protein-fed rats (Table 1C).

[Position of Table 1 A, B, C]

Anterior pituitary GHRH-R mRNA levels

In the anterior pituitary, GHRH-R mRNA transcript levels were analyzed by Northern blotting. The presence of ≈ 2.5 - and ≈ 4 -kb GHRH-R mRNA transcripts (doublets) was detected in the gland of all animals (Fig. 1B), as previously reported (5, 21). Levels of GHRH-R mRNA transcripts, expressed per

12 µg total RNA (Figs. 1A, 1C, 1D), changed according to the length and nature of the dietary intervention in the course of aging. As shown in Fig. 1A, the 2.5 and 4 kb GHRH-R transcripts, their combined density and the 4/2.5 kb ratio were increased (1.5-2.1 times higher, $P < 0.05$) in 12-month-old *ad libitum*-fed rats compared to 2-month-old rats. Protein restriction had no significant effect on these parameters. In 18-month-old rats (Fig 1C), combined levels of GHRH-R mRNA transcripts were not significantly affected by aging. However, they were 1.6-1.7 times higher in 18-month-old calorie-restricted rats ($P < 0.001$) than in 2-month-old *ad libitum*-fed rats. No significant effect of protein intake level was observed either in *ad libitum*-fed or in calorie-restricted rats. Levels of the 2.5-kb transcript were not affected by age or protein intake but were increased 1.7 times in calorie-restricted rats ($P < 0.05$). Levels of the 4-kb transcript were 3 times higher in aged *ad libitum*-fed rats ($P < 0.05$) and normalized by CR. A reduction of protein intake had no beneficial effect in 18-month-old *ad libitum*-fed rats, however an increase of protein intake in calorie-restricted aged rats reverted the beneficial effect of CR (2.8 times increase, $P < 0.001$). The 4 kb/2.5-kb ratio had a similar behavior to that of the 4-kb transcript and only CR allowed maintaining a ratio of transcripts comparable to that observed in 2-month-old rats. In 22-month-old rats (Fig. 1D), GHRH-R mRNA transcript levels were similar in all groups.

[Position of Figure 1 A, B, C, D]

Renal medulla GHRH-R mRNA levels

Because of the lower concentration of medullary GHRH-R mRNA than that of anterior pituitary, RPA is required for accurate quantification (Fig. 2B). Levels of GHRH-R mRNA, expressed per 20 µg of total RNA (Figs. 2A, 2C, 2D), changed according to the length and nature of the dietary intervention in the course of aging. As shown in Fig 2A, medullary GHRH-R mRNA levels were 1.4 times lower in 12-month-old *ad libitum*-fed rats compared to those of 2-month-

old rats. Protein restriction had no significant effect. They were 1.5-1.8 times lower in 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed ($P < 0.05$) and calorie-restricted rats ($P < 0.05$) compared to those of 2-month-old rats. Protein intake level exerts an effect only in calorie-restricted rats where a 22% protein intake normalized GHRH-R mRNA levels to those of 2-month-old rats. In 22-month-old rats (Fig. 2D), GHRH-R mRNA levels were similar in all groups, as in the anterior pituitary.

[Position of Figure 2 A, B, C, D]

Hypothalamic preproGHRH mRNA levels

Levels of hypothalamic preproGHRH mRNA levels were not altered with aging or protein intake level but were 1.4 times lower ($P < 0.01$) in 18-month-old calorie-restricted rats compared to 2-month-old rats (Fig. 3). They were normalized when CR was combined to a 22%-protein intake.

[Position of Figure 3 A, B]

Anterior pituitary GHRH binding parameters

Effects of protein and energy intakes, on GHRH-R binding parameters, were studied in 12- and 18-month-old rats (Table 2 A and B, Fig. 4). Coanalysis of binding data derived from cold saturation studies revealed the presence of high and low affinity classes of GHRH binding sites in 2-month-old rats. In the pituitary from 12-month-old *ad libitum*-fed rats (Table 2 A), a single class of sites was detected with a 47 times lower affinity ($P < 0.05$) than the K_{d1} from 2-month-old rats and an apparent capacity 74 times lower than B_{max1} ($P < 0.05$) but similar to B_{max2} from 2-month-old rats. No significant effect of protein intake level was seen on GHRH binding parameters. In the pituitary from 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats (Table 2 B), a single class of binding sites was

detected, exhibiting a 23 times lower affinity ($P < 0.001$) than the K_{d1} from 2-month-old rats and an apparent capacity 31 times lower than B_{max1} ($P < 0.05$) and 5.6 times lower than B_{max2} from 2-month-old rats ($P < 0.001$). No significant effect of protein intake level was seen on GHRH binding parameters. CR had a beneficial effect on GHRH binding parameters, reverting the deleterious effects of aging. However, when CR was combined to a 22%-protein intake, its beneficial effect was blunted.

[Position of Table 2 A, B]

[Position of Figure 4]

Serum concentrations of immunoreactive total IGF-I and free fatty acids.

Immunoreactive serum concentrations of total IGF-I were 1.5 times ($P < 0.001$) lower in *ad libitum*/22% protein-fed 12-month-old rats compared to 2-month-old rats (Table 3 A). No significant effect of protein intake was observed. They were 1.3 times ($P < 0.05$) lower in *ad libitum*/22% protein-fed 18-month-old rats compared to 2-month-old rats (Table 3 B). No significant effect of protein intake was observed in *ad libitum*-fed rats. Calorie restriction induced an additional decreased of IGF-I levels (2.3 and 1.8 times compared to 2- and 18-month-old *ad libitum*-fed rats, $P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively). However, an increase of protein intake to 22% partially reverted the effect of CR and increased IGF-I levels 1.3 times ($P < 0.05$). In 22-month-old rats, a pattern of IGF-I levels similar to that observed in 18-month-old rats was present.

No significant effect of age or diet was observed on serum free fatty acid (FFA) levels.

[Position of Table 3 A, B, C]

Serum concentrations of immunoreactive free T4 and T3, testosterone and corticosterone.

Aging and dietary modulation also affected peripheral hormones (Table 4 A, B, C). Levels of free T4 were 1.4-1.5 times lower in 12-, 18- and 22-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats compared to 2-month-old rats ($P < 0.001$). Protein restriction induced a 1.2-1.3 times additional decrease in 12- and 22-month-old rats *ad-libitum*-fed rats ($P < 0.05$). In calorie-restricted rats, restoration of protein intake to 22%, increased free T4 levels 1.4-1.5 times in 18- and 22-month-old rats ($P < 0.01$), normalizing them to those of *ad libitum*-fed rats.

Serum levels of free T3 were reduced in aging. A trend, seen in 18-month-old rats, became significant in 22-month-old rats (1.5 times decrease, $P < 0.01$). CR induced a significant diminution of T3 levels in 18- month-old rats compared to 2-month-old rats (2.6 times decrease, $P < 0.001$) and compared to *ad-libitum*/22% protein-fed 18- month-old rats (2 times decrease, $P < 0.001$). No effect of protein intake level was detected.

Serum levels of total testosterone were 2.2, 6.4 and 3.5 times lower in 12, 18- and 22-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats compared to 2-month-old rats ($P < 0.001$). In 18-month-old rats, protein restriction exerted a 2 times increase of testosterone levels and, CR partially restored testosterone levels (2.8 times higher than those of 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed ($P < 0.01$) and 2.3 times lower than those of 2-month-old rats ($P < 0.05$)). This effect could not be seen in 22-month-old rats.

Serum levels of total corticosterone were not changed in 18- and 22-month-old rat compared to those of 2-month-old rats. However, they were increased 5.1-7.4 times and 3.5-5.1 times in 18- and 22-month-old calorie-

restricted rats compared to those of 2-month-old rats and aged-matched *ad libitum*/22% protein-fed rats, respectively ($P < 0.01$).

[Position of Table 4 A, B, C]

DISCUSSION

Caloric and protein restrictions have been shown to regulate the somatotroph axis (28-32). However, data on the effects of a long-term moderate caloric and/or protein restriction are still sparse. As we previously reported that a long-term CR protected anterior pituitary GHRH binding sites from age-related alterations (29) and, that a GHRH treatment rejuvenates GHRH binding parameters in 18-month-old rats (21), we intend in the present study to define potential pathways by which optimal energy and protein intakes could operate to maintain GHRH-R functionality.

As previously documented, long-term 40% CR (10-12 months) was started in 8-month-old rats to avoid interference with their period of rapid growth and to help predict the benefits of adult-onset CR, on the GHRH somatotroph sensitivity in longer-lived mammals (29). The general health condition of the calorie-restricted rats was consistent with our previous study (29), showing no sign of malnutrition. Although CR had a significant impact on organ and body weights, ratios of organ weight/BW were not modified by changes in energy or protein intakes.

At the level of the anterior pituitary, GHRH-R mRNA transcript levels and GHRH binding characteristics were affected by aging. In 12-month-old rats, both transcripts were increased, resulting in a significant elevation of the 4/2.5-kb ratio, which was correlated to a loss of the high affinity binding site. No beneficial effect of the protein restriction was observed neither at the mRNA nor at the protein level. In 18-month-old rats, the effect of aging was apparent on the increase of the 4-kb transcript and the 4/2.5-kb ratio. No gain was obtained by protein restriction. However, CR exerted an important rejuvenating effect on GHRH-R mRNA transcripts, which was abolished when protein intake was increased to 22%. Interestingly, these effects of CR seen at mRNA level were also detected at the protein level, allowing the preservation of GHRH-R receptor

functionality. In 22-month-old rats, no effect of aging or diet was observed at the mRNA level and the number of healthy animals was insufficient to perform binding studies. Altogether, our results suggest that CR can efficiently protect GHRH-R from aging, by a mechanism allowing the maintenance of optimal ratio of GHRH-R mRNA transcripts in the somatotroph. In the 22-month-old groups, as we were left with a colony of successfully aging rats for the study, this may have resulted in a confounding variable, masking the effect of CR at least at the level of GHRH-R receptor regulation. Presently, as the identity of the 4-kb GHRH-R mRNA transcript is unknown, the precise mechanism by which it induces changes in GHRH binding parameters can not be assessed. Nevertheless, it might be proposed that this entity could be translated in a GHRH-R isoform, possibly acting as a dominant-negative, such as reported for higher molecular weight GHRH-R transcripts found in human normal pituitary and pituitary adenoma (37). A recent study showed no effect of CR on the regulation of GHRH-R mRNA levels, as determined by semi-quantitative RT-PCR (38). However, since the CR was started at 6-week-old rats and the feeding schedule (feeding on alternate days, 3/7 days/week, to achieve a weekly CR of 30%), we cannot discriminate whether or not diverging results are related to the model of CR or to the method of quantifying GHRH-R mRNA. As binding data from our present and previous studies are consistent across colonies (29), it strengthens the validity of our results, on the positive effect of CR on maintenance of GHRH-R functionality.

Since pituitary and renal medulla GHRH-R mRNA levels are differentially regulated in the developing and aging rat (39-40) and decreased in the course of aging (39), it was of interest to determine whether or not the nutritional status could also regulate renal GHRH-R. The diminution of GHRH-R mRNA levels, observed with aging, was not modulated by the level of protein or caloric intake alone. However, in 18-month-old rats, a positive effect was seen when CR was combined with a 22% protein intake. This regulation was not observable in the 22-month-old rats, such as described for the pituitary GHRH-R. Since GHRH

binding data are not yet available, in semi purified Henle's loop cells which bear a functional GHRH-R in the medulla (39), we can not determine the magnitude of the impact of a dietary intervention on GHRH-R functionality.

To identify elements of the complex mechanism by which GHRH-R nutritional regulation is operating in the course of aging, analysis of several biochemical and hormonal parameters was performed. A GHRH stimulation is known to regulate the level of its own receptor *in vitro* (39, 41) and *in vivo* (21) and could explain some of the effects seen at the level of pituitary and medullary GHRH-R. Hypothalamic preproGHRH mRNA levels were measured in 18-month-old rats because the most drastic and diversified regulatory effects were observed on GHRH-R, in this age group. PreproGHRH mRNA levels did not vary as a function of age or protein intake alone, however a decrease of energy and protein intake such as seen in CR decreased them and, restoration of protein intake to 22% in calorie-restricted rats, normalized them. These results stress the importance of optimal protein intake in the regulation of preproGHRH mRNA levels as previously reported in short-term experiments with young rats (31, 32). They also suggest that CR may positively regulate preproGHRH mRNA translation, thus stimulating *de novo* synthesis of functional pituitary GHRH-R. Alternately, preproGHRH mRNA levels could reflect hypothalamic peptide content and therefore may not represent a major element of pituitary GHRH-R regulation but a potential contributor to GHRH-R regulation in the renal medulla, assuming that the peptide is still bioactive when reaching Henle's loop cells. Intramedullary preproGHRH mRNA (14) and GHRH levels will have to be quantified to precise its potential contribution on renal GHRH-R regulation, in relation to aging and dietary interventions.

Circulating IGF-I has been shown to decrease with aging (29) and long-term CR exerted no beneficial effect (29 and this study). Nevertheless, preliminary observations from our laboratory indicate that serum levels of several IGF-I binding proteins were increased with aging and normalized by CR.

This situation could not explain, however, the regulatory effects of CR on pituitary GHRH-R. It was recently shown that IGF-I decreases GHRH-R mRNA levels in adult rat pituitary cell cultures (42) and does not modulate preproGHRH mRNA levels (43). In the renal medulla, effects of IGF-I on GHRH-R expression are currently unknown.

Levels of circulating thyroid and steroid hormones, known to regulate GHRH-R gene expression in the anterior pituitary and which are affected by CR, could also represent leads in the elucidate of the mechanism. Thyroid hormones are important positive regulator of pituitary GHRH-R mRNA in young rats (44-46), even though no response element has been found in the promoter region of the GHRH-R gene (47). As previously documented for T4 in this model of CR (29), free T4 and T3 serum levels were not ameliorated by long-term caloric or protein restriction in the aging rat, indicating that they are not likely an important component of GHRH-R regulatory processes in CR. Sex hormones have been shown to affect GHRH-R gene regulation. A negative response element was identified for estrogens on GHRH-R gene promoter (47) and, ovariectomy was shown to increase pituitary GHRH-R mRNA levels while estrogen treatment decreased them (48). Although the regulatory effects of an *in vitro* testosterone treatment, on pituitary GHRH-R mRNA levels have not been documented, a partial restoration of testosterone levels by long-term CR may represent a potential mechanism by which GHRH-R is regulated. Finally, as glucocorticoids positively regulate GHRH-R (49-51), a sustained increase of their circulating levels in long-term CR, as reported after 2 months of CR (52), could be beneficial to the GHRH-R. Thyroid and steroid receptors are present in both somatotroph and Henle's loop cells, thus it may be postulated that according to cell type, optimal levels of hormones may be different or nuclear receptors may be differentially regulated by CR. Finally, a decrease of cellular lipotoxicity and glucotoxicity can not be excluded as additional benefits of the CR on the integrity and functionality of the GHRH-R (53). In the present study no drastic

change in serum FFA was detected, however CR normalized serum glucose levels (data not shown).

In conclusion, the present findings indicate that in male Sprague Dawley rats, a long-term moderate CR represents the best dietary manoeuvre to rejuvenate pituitary GHRH-R while an optimal combination of energy and protein intakes appears to be necessary to positively affect renal GHRH-R. Among hormonal regulators of GHRH-R, modified by caloric or protein restriction, GHRH, testosterone and glucocorticoids represent the most promising molecules to investigate, in order to better understand the complex mechanism of action of these dietary interventions.

ACKNOWLEDGMENTS

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

This work was supported by the Dairy Farmers of Canada and the Canadian Institutes of Health Research. KR and CB are recipients of studentships from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and CB and CP, from the Faculty of Graduate Studies of the University of Montreal. PG is recipient of a scholarship chercheur-boursier national from FRSQ.

REFERENCES

1. Tannenbaum GS, Ling N 1984 The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 115:1952-1957
2. Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale WW, Rosenfeld MG, Evans RM 1985 Independent effects of growth hormone-releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314:279-281
3. Brazeau P, Vale W, Burgus R, et al. 1973 Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 170:77-79
4. Sarret P, Nouel D, Dal Farra C, Vincent JP, Beaudet A, Mazella J 1999 Receptor-mediated internalization is critical for the inhibition of the expression of growth hormone by somatostatin in the pituitary cell line AtT-20. *J Biol Chem*, 274:19294-19300
5. Mayo KE 1992 Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 6:1734-1744
6. Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S 1992 Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:251-255
7. Lin C, Lin SC, Chang CP, Rosenfeld MG 1992 Pit-1 dependent expression of the receptor for growth hormone-releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360:765-768
8. Hsiung HM, Smith DP, Zhang XY, Bennett T, Rosteck PR Jr, Lai MH 1993 Structure and functional expression of a complementary DNA for porcine growth hormone-releasing hormone receptor. *Neuropeptides* 25:1-10
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: 2660-2668
10. Tang J, Lagacé G, Castagné J, Collu R 1995 Identification of human growth hormone-releasing hormone receptor splicing variants. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2381-2387
 11. Hashimoto K, Koga M, Motomura T, Kasayama S, Kouhara H, Ohnishi T, Arita N, Hayakawa T, Sato B, Kishimoto T 1995 Identification of alternatively spliced messenger ribonucleic acid encoding truncated growth hormone-releasing hormone receptor in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2933-2939
 12. Gaylinn BD, Harrison JK, Zysk JR, Lyons CE, Lynch KR, Thorner MO 1993 Molecular cloning and expression of human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 7:77-84
 13. Miller TL, Godfrey PA, Dealmeida VI, Mayo KE 1999 The rat growth hormone-releasing hormone receptor gene: structure, regulation, and generation of receptor isoforms with different signaling properties. *Endocrinology* 140:4152-4165
 14. Matsubara S, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Takahara J 1995 Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology* 136:4147-4150
 15. Corpas E, Harman M, Blackman MR 1993 Human growth hormone and human aging. *Endocrine Rev* 14:20-39
 16. Rudman D 1985 Growth hormone, body composition and aging. *J Am Geriatr Soc* 33:800-807
 17. Borst SE, Millard WJ, Lowenthal DT 1994 Growth hormone, exercise and aging, The future therapy for the frail elderly. *J Am Geriatr Soc* 42:528-535
 18. Meites J, Goya RG, Takahasi S. 1987 Why the neuroendocrine system is important in aging processes. *Exp Gerontol* 22:1-15
 19. Deslauriers N, Gaudreau P, Aribat T, Renier G, Petitclerc D, Brazeau P 1991 Dynamics of growth response to growth hormone-releasing factor in

- aging rats: peripheral and central influences. *Neuroendocrinology* 53:439-446
20. Gaudreau P, Boulanger L, Morel G 1999 Axe somatotrope et vieillissement: importance du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance. *Médecine Science* 15:VII-IX
 21. Girard N, Boulanger L, Denis S, Gaudreau P 1999 Differential *in vivo* regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor by GHRH in young and aged rats. *Endocrinology* 140:2836-2842
 22. Lefrançois L, Boulanger L, Gaudreau P 1995 Effects on aging of pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites: *in vitro* mimicry by guanyl nucleotides and reducing agents. *Brain Res* 673:39-46
 23. Abribat T, Deslauriers N, Brazeau P, Gaudreau P 1991 Alterations of pituitary growth hormone-releasing factor binding sites in aging rats. *Endocrinology* 128:633-635
 24. Robberecht P, Gillard M, Waelbroeck M, Camus JC, DeNeff P, Christophe J. 1986 Decreased stimulation of adenylate cyclase by growth hormone-releasing factor in the anterior pituitary of old rats. *Neuroendocrinology* 44:429-432
 25. Yu BP. 1994 How diet influence the aging process of the rat. *Proceedings of the Society for experimental biology and medicine* 205:97-105
 26. Lane MA, Baer DJ, Rumpler WV, Weindruch R, Ingram DK, Tilmont EM, Cutler RG, Ross GS 1996 Calorie restriction lowers body temperature in rhesus monkeys, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4159-4164
 27. Weindruch R, Walford RL 1988 The retardation of aging and disease by dietary restriction. *Springfield, Thomas*, pp. 7-215
 28. D'Costa AP, Ingram RL, Lehnem JE, Sonntag WE 1993 The regulation and mechanisms of action of growth hormone and insulin-like growth factor 1 during aging. *J Reprod Fert* 46:87-98

29. Girard N, G Ferland, L Boulanger, P Gaudreau 1998 Long-term calorie restriction protects rat pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites from age-related alterations. *Neuroendocrinology* 68:21-29
30. Harel Z, Tannenbaum GS 1993 Dietary protein restriction impairs both spontaneous and growth hormone-releasing factor-stimulated growth hormone release in the rat. *Endocrinology* 133:1035-1043
31. Bruno JF, Olchovsky D, White JD, Leidy JW, Song J, Berelowitz M 1990 Influence of food deprivation in the rat on hypothalamic expression of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 127:2111-2116
32. Bruno JF, Song J, Xu Y, Berelowitz M 1993 Regulation of hypothalamic growth hormone-releasing factor messenger ribonucleic acid expression in food-deprived rats: a role for histaminergic neurotransmission. *Endocrinology* 133:1377-1381
33. Mayo KE, Cerelli GM, Rosenfeld MG, Evans RM 1985 Characterization of cDNA and genomic clones encoding the precursor to rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature* 314:464-467
34. Gaudreau P, Boulanger L, Abribat T 1992 Affinity of human growth hormone-releasing factor (1-29)NH₂ analogues for GRF binding sites in rat adenopituitary. *J Med Chem* 35:1864-1869
35. Dole VP, Meinertz H 1960 Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J Biol Chem* 235: 2595-2599.
36. Munson PJ, Rodbard D 1980 LIGAND: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 107: 220-239
37. Motomura T, Hashimoto K, Koga M, Arita N, Hayakawa T, Kishimoto T, Kasayama S 1998 Inhibition of signal transduction by a splice variant of the growth hormone-releasing hormone receptor expressed in human pituitary adenomas. *Metabolism* 47:804-808
38. Shimokawa I, Yanagihara K, Higami Y, Okimoto T, Tomita M, Ikeda T, Lee S 2000 Effects of aging and dietary restriction on mRNA levels of

- receptors for growth hormone-releasing hormone and somatostatin in the rat pituitary. *Gerontol Biol Sci* 6:B274-B279
39. Boisvert C, C Paré, C Veyrat-Durebex, A Robert, S Dubuisson, G Morel and P Gaudreau 2002 Localization and regulation of a functional growth hormone-releasing hormone receptor in the rat kidney. *Endocrinology*, in press.
 40. Korytko AI, Zeitler P, Cuttler L 1996 Developmental regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression in the rat. *Endocrinology* 137:1326-1331
 41. Horikawa R, Hellmann P, Cella SG, Torsello A, Day RN, Muller EE, Thorner MO 1996 Growth hormone-releasing factor (GRF) regulates expression of its own receptor. *Endocrinology* 137:2642-2645
 42. Korytko AI, Cuttler L 2001 Regulation of GHRH receptor gene expression in the neonatal and adult rat pituitary. *Growth Horm IGF Res* 11:282-288
 43. Kamegai J, Unterman TG, Frohman LA, Kineman RD 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* 139:3554-3560
 44. Miki N, Ono M, Murata Y, Tamitsu K, Ri T, Demura H, Yamada M 1995 Thyroid hormone regulation of gene expression of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 217, 1087-1093
 45. Tam SP, Lam KSL, Srivastava G 1996 Gene expression of hypothalamic somatostatin, growth hormone releasing factor and their pituitary receptors in hypothyroidism. *Endocrinology* 137:418-424
 46. Boulanger L, Andersen PH, Gaudreau P 1999 Development of a site-directed polyclonal antibody against the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its use to estimate GHRH receptor concentration in normal and hypothyroid rats. *Neuroendocrinology* 70:117-127

47. Petersenn S, Rasch AC, Heyens M, Schulte HM 1998 Structure and regulation of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Mol Endocrinol* 12:233-247
48. Lam KSL, Lee MF, Tam SP, Srivasta G (1996) Gene expression of the receptor for growth hormone-releasing hormone is physiologically regulated by glucocorticoids and estrogen. *Neuroendocrinology* 63 : 475-480
49. Seifert H, Perrin M, Rivier J, Vale W 1985 Growth hormone-releasing factor binding sites in anterior pituitary membrane homogenates : modulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 117:424-426
50. Korytko AI, Cuttler L 1997 Thyroid hormone and glucocorticoid regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression. *J Endocrinol* 152: R13-R17
51. Miller TL, Mayo K 1997 Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 138: 2458-2465
52. Gursoy E, Cardounel A, Hu Y, Kalimi M 2001 Biological effects of long-term caloric restriction: adaptation with simultaneous administration of caloric stress plus repeated immobilization stress in rats. *Exp Biol Med* 226: 97-102
53. Stern JS, Gades MD, Wheeldon CM, Borchers AT 2001 Calorie restriction in obesity : prevention of kidney disease in rodents. *J Nutr* 131:913S-917S

TABLE 1. Body weight and organ wet weight: effect of age, long-term caloric restriction and protein intake level

A) In 12- and 2-month-old rats

Group	BW (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidney (g)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	314 ± 11	1.13 ± 0.05	12.10 ± 0.37	1.07 ± 0.13
12-month-old <i>ad libitum</i> /22% protein-fed	759 ± 21 ^a	1.93 ± 0.07 ^a	24.14 ± 1.22 ^a	1.88 ± 0.05 ^a
12-month-old <i>ad libitum</i> /13.2% protein-fed	756 ± 23	1.97 ± 0.09	24.40 ± 1.18	1.78 ± 0.05

Values represent the mean ± SEM of 14-20 rats.

^a $P < 0.001$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

B) In 18- and 2-month-old rats

Group	BW (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidney (g)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	318 ± 10	1.17 ± 0.04	12.65 ± 0.31	1.10 ± 0.12
18-month-old <i>ad libitum</i> /22% protein-fed	883 ± 21 ^a	1.95 ± 0.08 ^a	27.37 ± 1.27 ^a	2.24 ± 0.06 ^a
18-month-old <i>ad libitum</i> /13.2% protein-fed	907 ± 28	1.82 ± 0.04	30.04 ± 1.55	2.05 ± 0.07 ^d
18-month-old calorie-restricted	481 ± 9 ^{a, b}	1.47 ± 0.08 ^{b, c}	13.35 ± 0.35 ^b	1.61 ± 0.03 ^{a, b}
18-month-old calorie-restricted/22% protein-fed	509 ± 13	1.36 ± 0.03	13.69 ± 0.30	1.82 ± 0.04 ^e

Values represent the mean ± SEM of 20-22 rats.

^a $P < 0.001$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^b $P < 0.001$ when compared to 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

^c $P < 0.01$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^d $P < 0.05$ when compared to 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

^e $P < 0.001$ when compared to 18-month-old calorie-restricted rats.

C) In 22- and 2-month-old rats

Group	BW (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidney (g)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	308 ± 12	1.09 ± 0.04	11.98 ± 0.32	1.01 ± 0.11
22-month-old <i>ad libitum</i> /22% protein-fed	826 ± 44 ^a	1.93 ± 0.06 ^a	24.47 ± 2.34 ^a	2.59 ± 0.15 ^a
22-month-old <i>ad libitum</i> /13.2% protein-fed	884 ± 33	1.91 ± 0.09	29.75 ± 3.70	2.22 ± 0.14
22-month-old calorie-restricted	492 ± 15 ^{a,b}	1.37 ± 0.01 ^{a,b}	13.31 ± 0.40 ^{b,c}	1.65 ± 0.08 ^{b,d}
22-month-old calorie-restricted/22% protein-fed	450 ± 16	1.37 ± 0.05	12.40 ± 0.24	1.72 ± 0.05

Values represent the mean ± SEM of 7-20 rats.

^a $P < 0.001$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^b $P < 0.001$ when compared to 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

^c $P < 0.05$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^d $P < 0.01$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

TABLE 2. Estimates of GHRH binding parameters in anterior pituitary homogenates: effect of age, long-term caloric restriction and protein intake level

A) In 12- and 2-month old rats

Group	K_{d1} (nM)	K_d (nM)	K_{d2} (nM)	B_{max1} (fmol/mg prot)	B_{max2} (pmol/mg prot)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	0.18 ± 0.07		51 ± 11	28 ± 9	2.83 ± 0.40
12-month-old <i>ad libitum</i> /22% protein-fed		8.45 ± 1.99 ^{a, b}			2.09 ± 0.50 ^c
12-month-old <i>ad libitum</i> /13.2% protein-fed		4.73 ± 2.31			1.41 ± 0.71

Estimates of binding parameters were derived from cold saturation studies. Values represent mean ± SEM of 4 independent experiments performed in triplicate.

^a $P < 0.05$ when compared to K_{d1} in pituitaries from 2-month-old rats.

^b $P < 0.05$ when compared to K_{d2} in pituitaries from 2-month-old rats.

^c $P < 0.05$ when compared to B_{max1} in pituitaries from 2-month-old rats.

B) In 18- and 2-month old rats

Group	K _{d1} (nM)	K _d (nM)	K _{d2} (nM)	B _{max1} (fmol/mg prot)	B _{max2} (pmol/mg prot)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	0.12 ± 0.03		28.8 ± 12.7	14.9 ± 3.3	2.56 ± 0.89
18-month-old <i>ad libitum</i> /22% protein-fed		2.76 ± 0.63 ^a			0.46 ± 0.11 ^d
18-month-old <i>ad libitum</i> /13.2% protein-fed		3.04 ± 1.06			0.47 ± 0.16
18-month-old calorie-restricted	0.23 ± 0.18 ^b		9.43 ± 4.05	24.2 ± 20.0 ^e	0.98 ± 0.30
18-month-old calorie-restricted/22% protein-fed		3.54 ± 1.00 ^c			0.80 ± 0.23 ^f

Estimates of binding parameters were derived from cold saturation studies.

Values represent mean ± SEM of 8 (2-month-old) and 3 (18-month-old) independent experiments performed in triplicate.

^a*P* < 0.001 when compared to K_{d1} in pituitaries from 2-month-old rats.

^b*P* < 0.05 when compared to K_{d1} in pituitaries from 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

^c*P* < 0.05 when compared to K_d in pituitaries from 18-month-old calorie-restricted rats.

^d*P* < 0.001 when compared to B_{max1} in pituitaries from 2-month-old rats.

^e*P* < 0.05 when compared to B_{max} in pituitaries from 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

^f*P* < 0.05 when compared to B_{max1} in pituitaries from 18-month-old calorie-restricted rats.

TABLE 3. Serum concentration of total IGF-I and free fatty acid (FFA): effect of age, long-term caloric restriction and protein intake level

A) In 12- et 2-month-old rats

Group	Total IGF-I (ng/mL)	FFA (μ mol/L)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	1741 \pm 81	318.0 \pm 30.4
12-month-old <i>ad libitum</i> /22% protein-fed	1041 \pm 54 ^a	418.0 \pm 42.3
12-month-old <i>ad libitum</i> /13.2% protein-fed	1178 \pm 85	348.9 \pm 41.9

Values represent the mean \pm SEM of 11-16 individual samples tested in duplicate.

^a p < 0.001 when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

B) In 18- and 2-month-old rats

Group	Total IGF-I (ng/mL)	FFA (μ mol/L)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	2647 \pm 152	326.4 \pm 35.5
18-month-old <i>ad libitum</i> /22% protein-fed	2059 \pm 212 ^a	431.5 \pm 79.1
18-month-old <i>ad libitum</i> /13.2% protein-fed	1963 \pm 210	475.3 \pm 94.6
18-month-old calorie-restricted	1175 \pm 81 ^{b, c}	378.1 \pm 73.5
18-month-old calorie-restricted/22% protein-fed	1567 \pm 123 ^d	400.5 \pm 33.3

Values represent the mean \pm SEM of 5-8 individual samples tested in duplicate.

^a $P < 0.05$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^b $P < 0.001$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^c $P < 0.01$ when compared to 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

^d $P < 0.05$ when compared to 18-month-old calorie-restricted rats.

C) In 22- and 2-month-old rats

Group	Total IGF-I (ng/mL)	FFA (μ mol/L)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	2134 \pm 169	309.6 \pm 35.0
22-month-old <i>ad libitum</i> /22% protein-fed	1294 \pm 164 ^a	407.3 \pm 101.4
22-month-old <i>ad libitum</i> /13.2% protein -fed	1579 \pm 195	305.2 \pm 35.2
22-month-old calorie-restricted	626 \pm 63 ^{b, c}	447.8 \pm 64.9
22-month-old calorie-restricted/22% protein-fed	869 \pm 60 ^d	489.9 \pm 47.1

Values represent the mean \pm SEM of 5-8 individual samples tested in duplicate for IGF-I.

^a $P < 0.01$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^b $P < 0.001$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^c $P < 0.01$ when compared to 22-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

^d $P < 0.05$ when compared to 22-month-old calorie-restricted rats.

TABLE 4. Serum concentration of free T4 and T3 and total testosterone and corticosterone: effect of age, long-term caloric restriction and protein intake level

A) In 12- and 2-month-old rats

Group	Free T4 (pmol/L)	Free T3 (ng/mL)	Testosterone (ng/mL)	Corticosterone (ng/mL)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	41.0 ± 1.2	ND	1.75 ± 0.39	ND
12-month-old <i>ad libitum</i> /22% protein-fed	28.2 ± 1.2 ^a	ND	0.81 ± 0.12 ^c	ND
12-month-old <i>ad libitum</i> /13.2% protein-fed	23.6 ± 1.3 ^b	ND	0.82 ± 0.14	ND

Values represent the mean ± SEM 13-16 individual samples tested in duplicate.
 ND : not determined.

^a $P < 0.001$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^b $P < 0.05$ when compared to 12-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

^c $P < 0.05$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

B) In 18- and 2-month-old rats

Group	Free T4 (pmol/L)	Free T3 (ng/mL)	Testosterone (ng/mL)	Corticosterone (ng/mL)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	38.7 ± 1.5	3.9 ± 0.4	3.2 ± 0.5	27.6 ± 9.4
18-month-old <i>ad libitum</i> /22% protein-fed	25.7 ± 2.5 ^a	3.1 ± 0.3	0.5 ± 0.1 ^a	39.7 ± 16.3
18-month-old <i>ad libitum</i> /13.2% protein-fed	28.0 ± 1.6	3.1 ± 0.2	1.0 ± 0.1 ^e	ND
18-month-old calorie-restricted	17.4 ± 2.1 ^{a, b}	1.5 ± 0.2 ^{a, d}	1.4 ± 0.4 ^{b, f}	142.3 ± 28.1 ^{e, g}
18-month-old calorie-restricted/22% protein-fed	25.6 ± 1.5 ^c	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.2	ND

Values represent the mean ± SEM of 7-8 individual samples tested in duplicate.

^a $P < 0.001$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^b $P < 0.05$ when compared to 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

^c $P < 0.01$ when compared to 18-month-old calorie-restricted rats.

^d $P < 0.001$ when compared to 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

^e $P < 0.01$ when compared to 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

^f $P < 0.05$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^g $P < 0.01$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

C) 22- and 2-month-old rats

Group	Free T4 (pmol/L)	Free T3 (ng/mL)	Testosterone (ng/mL)	Corticosterone (ng/mL)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	37.5 ± 1.9	3.2 ± 0.2	2.16 ± 0.32	26.9 ± 6.5
22-month-old <i>ad libitum</i> /22% protein-fed	26.3 ± 0.8 ^a	2.1 ± 0.2 ^e	0.62 ± 0.12 ^e	38.4 ± 6.9
22-month-old <i>ad libitum</i> /13.2% protein-fed	20.2 ± 1.9 ^b	2.1 ± 0.3	0.73 ± 0.14	ND
22-month-old calorie-restricted	19.5 ± 1.2 ^{a,c}	1.9 ± 0.2 ^a	1.22 ± 0.26 ^f	200 ± 38 ^{e,g}
22-month-old calorie-restricted/22% protein-fed	27.8 ± 2.0 ^d	2.0 ± 0.2	0.77 ± 0.10	ND

Values represent the mean ± SEM of 6-8 individual samples tested in duplicate.

^a $P < 0.001$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^b $P < 0.05$ when compared to 22-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

^c $P < 0.001$ when compared to 2-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

^d $P < 0.01$ when compared to 22-month-old calorie-restricted rats.

^e $P < 0.01$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^f $P < 0.05$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^g $P < 0.01$ when compared to 2-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

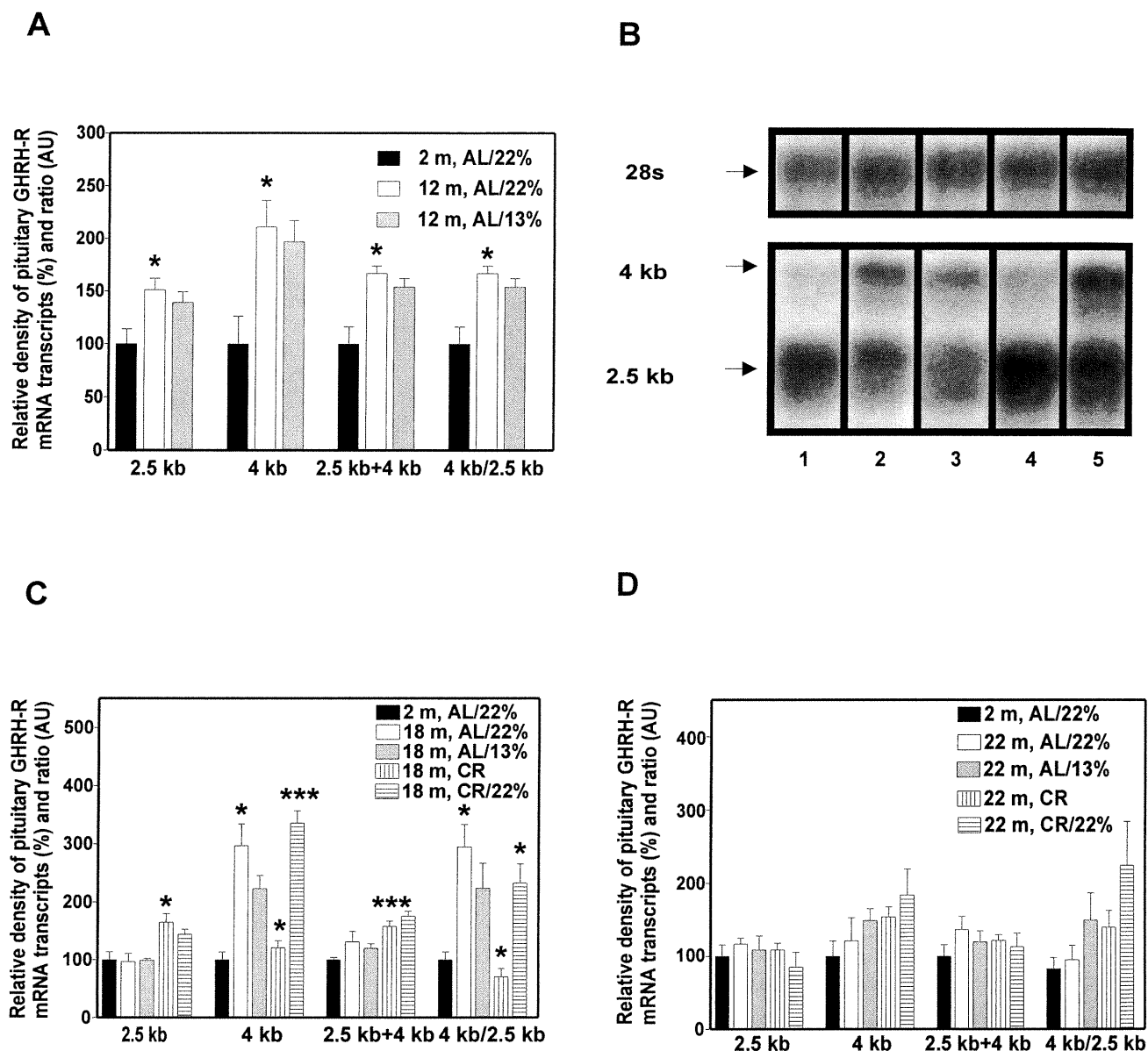


Figure 1. Effects of long-term caloric restriction and protein intake level on anterior pituitary GHRH-R mRNA transcript levels in 2, 12-, 18- or 22-month-old rats.

Twelve μ g of total RNA were analyzed by Northern Blotting for each group. Relative densities of pituitary GHRH-R mRNA transcript and ratio were expressed in % to that obtained in 2-month-old rats and arbitrary unit (AU), respectively.

A) In 12-month-old rats, results represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments, using 8 rats per group.

* $P < 0.05$ when levels of transcripts and 4 kb/2.5 kb ratio from 12-month-old *ad libitum*(AL)/22% protein-fed rats were compared to those of 2-month-old rats.

B) Autoradiographic representation of GHRH-R mRNA transcripts in 1) 2-month-old, 2) 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats, 3) 18-month-old *ad libitum*/13.2% protein-fed rats, 4) 18-month-old calorie-restricted (CR) rats and, 5) 18-month-old calorie-restricted/22% protein-fed rats.

C) In 18-month-old rats, results represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments, using 5-8 rats per group.

* $P < 0.05$ when levels of the 2.5 kb transcript from 18-month-old calorie-restricted rats were compared to those of 2-month-old rats or to those of 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

* $P < 0.05$ when levels of the 4 kb transcript from 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats were compared to those of 2-month-old rats.

* $P < 0.05$ when levels of the 4 kb transcript from 18-month-old calorie-restricted rats were compared to those of 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

*** $P < 0.001$ when levels of the 4 kb transcript from 18-month-old calorie-restricted/22% protein-fed rats were compared to those of 18-month-old calorie-restricted rats.

*** $P < 0.001$ when combined levels of 2.5 kb+4 kb transcripts from 18-month-old calorie-restricted rats were compared to those of 2-month-old rats.

* $P < 0.05$ when the 4 kb/2.5 kb ratio from 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats was compared to those of 2-month-old rats.

* $P < 0.05$ when the 4 kb/2.5 kb ratio from 18-month-old calorie-restricted rats was compared to that of 2-month-old rats.

* $P < 0.05$ when the 4 kb/2.5 kb ratio from 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats was compared to that of 18-month-old calorie-restricted rats.

D) In 22-month-old rats, results represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments, using 5-8 rats per group.

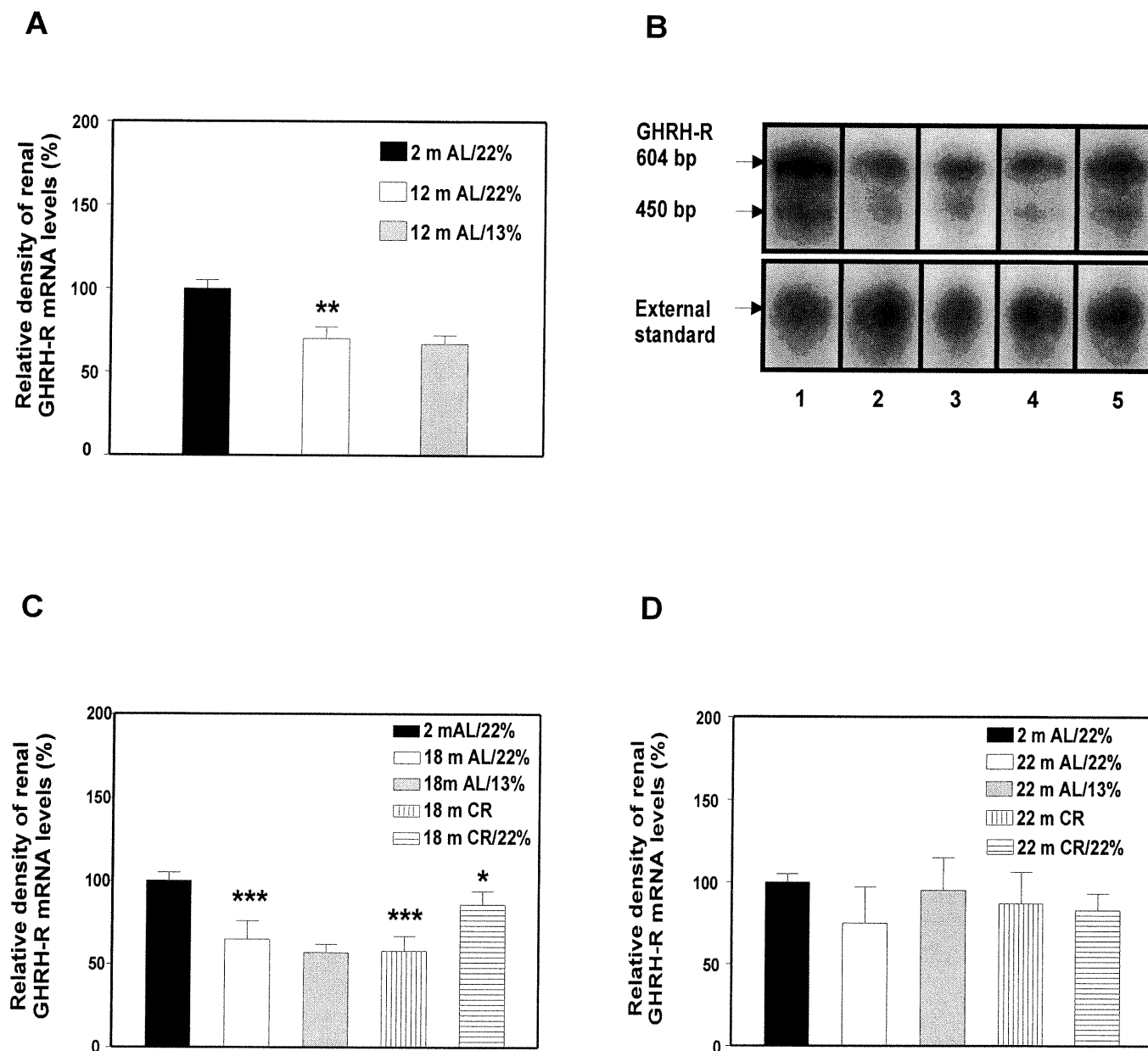


Figure 2. Effects of long-term caloric restriction and protein intake level on renal medulla GHRH-R mRNA levels in 2, 12-, 18- and 22-month-old rats.

Twenty μ g of total RNA were analyzed by RPA for each group. Relative densities of medullary GHRH-R mRNA levels were expressed in % to that obtained in 2-month-old rats.

A) In 12-month-old rats, results represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments, in triplicate, using 8 rats per group.

** $P < 0.01$ when mRNA levels from 12-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats were compared to those of 2-month-old rats.

B) Autoradiographic representation of GHRH-R mRNA levels in 1) 2-month-old, 2) 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats, 3) 18-month-old *ad libitum*/13.2% protein-fed rats, 4) 18-month-old calorie-restricted (CR) rats and, 5) 18-month-old calorie-restricted/22% protein-fed rats.

C) In 18-month-old rats, results represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments, in triplicate, using 6-8 rats per group.

*** $P < 0.001$ when mRNA levels from 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats and 18-month-old calorie-restricted rats were compared to those of 2-month-old rats.

* $P < 0.05$ when mRNA levels from 18-month-old calorie-restricted/22% protein-fed rats were compared to those of 18-month-old calorie-restricted rats.

D) In 22-month-old rats, results represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments, in triplicate, using 3-8 rats per group.

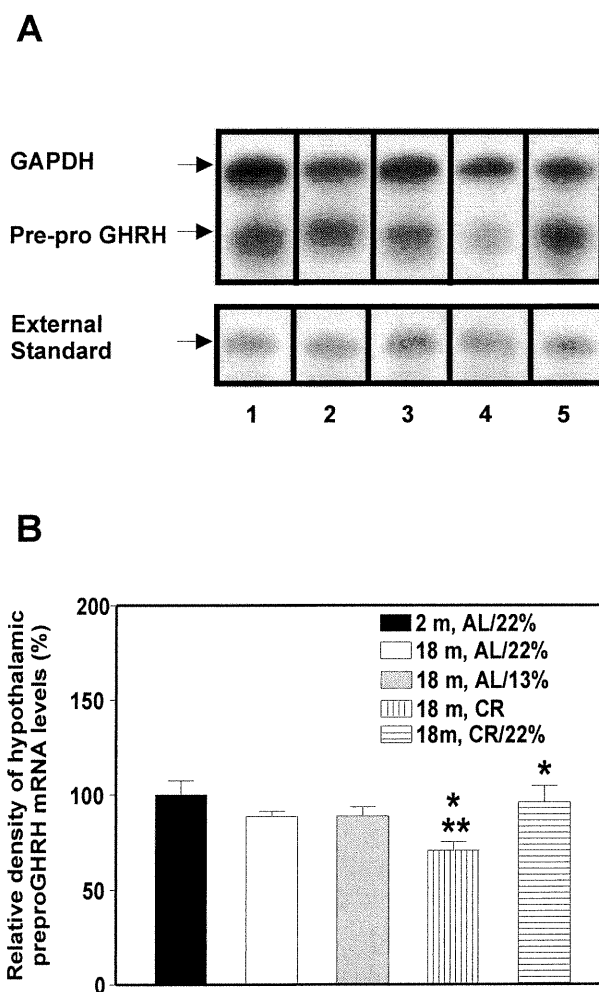


Figure 3. Effects of long-term caloric restriction and protein intake level on hypothalamic preproGHRH mRNA levels in 2 and 18-month-old rats.

Two and a half μ g of total RNA were analyzed by RPA for each group. Relative densities of hypothalamic preproGHRH mRNA levels were expressed in % to that obtained in 2-month-old rats.

A) Autoradiographic representation of preproGHRH-R mRNA levels in 1) 2-month-old, 2) 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats, 3) 18-month-old *ad libitum*/13.2% protein-fed rats, 4) 18-month-old calorie-restricted (CR) rats and, 5) 18-month-old calorie-restricted/22% protein-fed rats.

B) In 18-month-old rats, results represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments, in triplicate, using 6-8 rats per group.

** $P < 0.01$ when mRNA levels from 18-month-old calorie-restricted rats were compared to those of 2-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

* $P < 0.05$ when mRNA levels from 18-month-old calorie-restricted rats were compared to those of 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

* $P < 0.05$ when mRNA levels from 18-month-old calorie-restricted/22% protein-fed were compared to those of 18-month-old CR-fed rats.

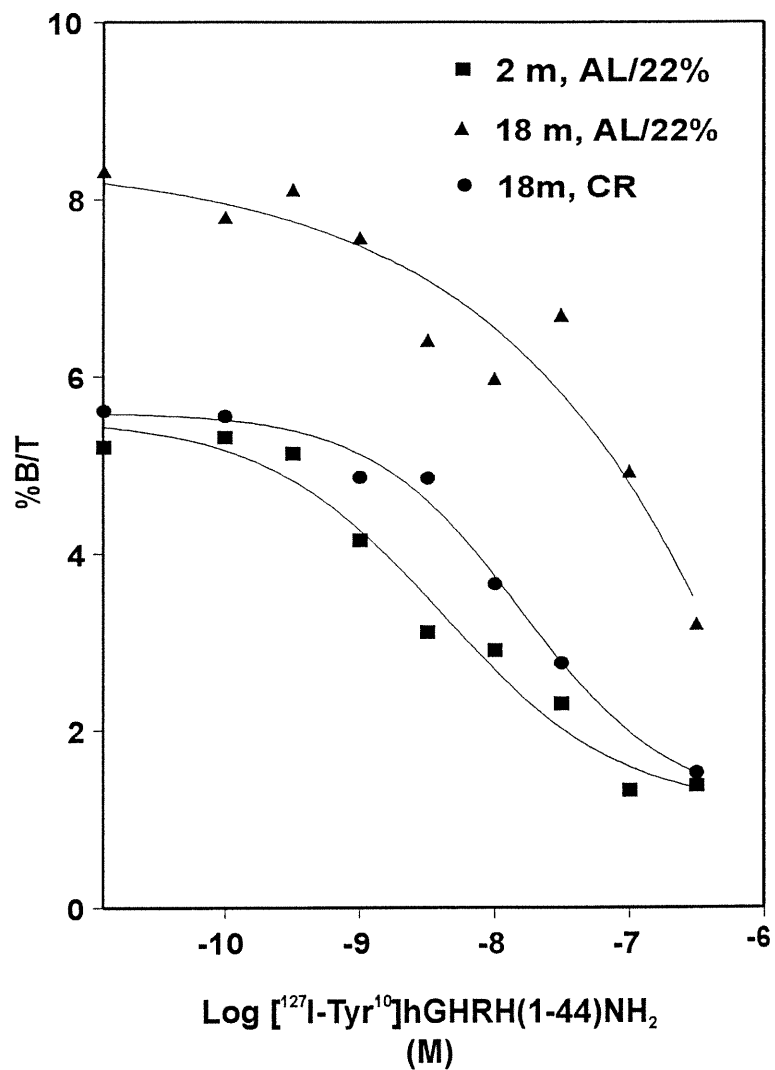


Figure 4. Representative $[^{125}\text{I}]\text{GHRH}$ binding profiles in anterior pituitary homogenates from 2- (■) and 18- (▲) month-old *ad libitum*(AL)/22% protein-fed and 18- month-old calorie-restricted (CR) rats (●). Values are expressed as the ratio of specific binding, corrected for 75 μg protein, over the total amount of radioligand added (B/T).

Titre de l'article : «Nutritional regulation on the leptin axis in the aging rat.»

Auteurs : Alma Robert, Karin Robinette, Guylaine Ferland et Pierrette Gaudreau.

Participation : L'ensemble des dosages biochimiques et hormonaux de même que tous les traitements statistiques ainsi que l'interprétation des résultats de cet article ont été effectués par Karin Robinette. La mise au point du RPA ainsi que les expériences de quantification des niveaux d'ARNm du récepteur de la leptine ont été effectués par Alma Robert. Pierrette Gaudreau et Guylaine Ferland, département du Nutrition, Université de Montréal étaient responsables du design et du suivi de la colonie. Pierrette Gaudreau a également supervisé les étapes de réalisation de l'étude.



Alma Robert



Karin Robinette



Guylaine Ferland



Pierrette Gaudreau

Le 20 décembre 2001, à titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'accepte que Karin Robinette inclut cet article soumis à la revue Endocrinology dans son mémoire de maîtrise en Sciences biomédicales intitulé « Régulation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance au cours du vieillissement: effet de la restriction calorique et de l'apport protéique.»

Nutritional regulation of the leptin axis in the aging rat

Alma Robert, Karin Robinette, Guylaine Ferland and Pierrette Gaudreau

Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital and Departments of Medicine and Nutrition, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence and request for reprints should be addressed to:

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

Tel: (514) 890-8000 extension 27159

Fax: (514) 412-7661

e-mail : pierrette.gaudreau@umontreal.ca

Running title: Nutritional regulation of leptin axis in aging

Key words: leptin, leptin receptor, hypothalamus, aging, caloric restriction, protein intake, glucose, insulin

ABSTRACT

Leptin regulates growth hormone secretion (GH) in part by increasing hypothalamic prepro growth hormone-releasing hormone (GHRH) mRNA levels. The contribution of the leptin axis to a rejuvenation of the pituitary GHRH receptor (GHRH-R) has not been investigated in long-term moderate caloric or protein restriction. The objective of the present study was to examine whether or not a regulation of this axis by a long-term 40% caloric and protein restriction could explain some of the changes seen in preproGHRH mRNA levels. In addition, since circulating glucose and insulin may influence serum leptin levels, these two secretagogues were measured.

The level of hypothalamic Ob-Rb mRNA was increased 1.3 times in 18-month-old *ad libitum*-fed rats. This effect of age was reverted by long-term caloric or protein restriction. Serum leptin levels were normalized to those of young rats by CR. Elevation of circulating insulin and glucose may contribute to increase serum leptin levels. As no correlation was observed between hypothalamic leptin receptor and preproGHRH mRNA levels in CR, this pathway does not appear to represent a key modulator circuit in the rejuvenating effect of CR on GHRH-R.

INTRODUCTION

Leptin is an adipocyte-derived 16-kDa protein encoded by the *ob* gene (1). This satiety hormone is involved in the central control of food intake, homeostasis and energy expenditure (2, 3). It also plays an important role in the neuroendocrine response to fasting (4). Leptin acts on multiple sites of action in the rat brain. High levels of the long isoform of the leptin receptor (Ob-Rb) are found in the hypothalamus, particularly in the arcuate, ventromedial and paraventricular nuclei and in the lateral hypothalamic area (5-7). The Ob-Rb was shown to exhibit the highest signalling capacity in response to leptin stimulation (8).

Leptin regulates growth hormone secretion (GH) secretion (9), at least in part by increasing hypothalamic prepro growth hormone-releasing hormone (GHRH) mRNA levels (10). The contribution of the leptin/Ob-Rb to a positive regulation of the hypothalamo-pituitary GHRH axis has not been investigated in long-term moderate caloric or protein restrictions. Therefore, the objective of the present study was to examine whether or not a regulation of the leptin axis by dietary interventions could explain some of the changes seen in preproGHRH mRNA levels, in CR rats. In addition, since circulating glucose and insulin may influence serum leptin levels (11), these two secretagogues were measured.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Two-month-old male Sprague Dawley rats (Charles Rivers Canada, St-Constant, Qc, CA) were individually housed in wire-bottom cages, in rooms under controlled temperature (22°C), humidity and lightning (12-h cycles: lights on at 07:00 h). Animals were feed to a semi-synthetic powdered diet prepared according to the Teklad control diet TD89248 (Teklad Test Diets, Madison, Wisc, USA) consisting of 22% casein (vitamin free), 48.5% sucrose, 15% corn starch, 5% corn oil, 4.6% fiber (cellulose), 3.9% mineral mix and 1% vitamin mix (ICN Pharmaceuticals, Montreal, Qc, CA). Rats were randomized in two groups: *ad libitum*-fed to a diet containing either 22% (control group) or 13.2% protein (40% protein restriction). At eight months of age the control *ad libitum*-fed group was randomized in three groups: 1) *ad libitum*-fed (22% protein intake), 2) 40% caloric restriction in comparison to *ad libitum*-fed (equivalent to 13.2% protein intake) and, 3) 40% caloric restriction in comparison to *ad libitum*-fed rats using a diet supplemented to 37% protein, to maintain a 22% total protein intake. In the latter group, sucrose was reduced to yield identical amounts of calories among the two calorie-restricted groups. Caloric restriction (CR) was implemented gradually: rats were submitted to a 20% caloric reduction for two weeks and to 40% until death. All rats received equal amounts of minerals and vitamins and had free access to water. Body weights (BW) and food intakes were recorded regularly. Rats were killed by decapitation between 09:30-11:30 at 18 months of age along with 2-month-old *ad libitum*-fed control rats. Macroscopic evaluation indicated no gross pathology. Mean BW \pm SEM at sacrifice (20-22 rats/group) were 310 \pm 10 g in 2-month-old control rats, 907 \pm 28 g in aged rats submitted to *ad libitum*-feeding/13.2% protein intake, 883 \pm 21 g in aged rats submitted to *ad libitum*-feeding/22% protein intake, 481 \pm 9 g in aged rats submitted to CR and 509 \pm 13 g in aged rats submitted to CR/22% protein intake, respectively. The animal protocol

was approved by the animal Care Committee of CHUM Research Center in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Tissue handling

For the RNase protection assay (RPA) of the Ob-Rb, whole hypothalami were snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until RNA extraction. For determination of serum immunoreactive leptin and insulin and glucose concentrations, trunk blood was collected and sera were kept at -80°C .

Ribonuclease protection assay

Total RNA was isolated from each hypothalamus using a single step acid guanidium-phenol/chloroform method with TRIzol (Invitrogen/Life Technologies, Burlington, Ont, CA). Hypothalamic Ob-Rb mRNA levels were assessed using a probe corresponding to the cDNA fragment 2956-3208 (GenBank accession number, U52966). The antisense [^{32}P]-labeled riboprobe was generated by *in vitro* transcription of the HincII linearized ObRb-pGEM11z plasmid, using SP6 RNA polymerase (MAXIscript transcription kit, Ambion, Austin, TX), in the presence of α -[^{32}P]UTP (800 mCi/mmol; Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Qc, CA). Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) mRNA levels were determined (internal standard), using a probe spanning the region from exons 5-8 of the rat GAPDH cDNA (nucleotide position: 369-685, accession number NM_017008). This antisense-labeled probe was generated by *in vitro* transcription of the Xba I-linearized pTRI-GAPDH-Rat (Ambion), using T7 RNA polymerase. Two pM of [^{32}P]-labeled Ob-Rb (specific activity: 560×10^6 cpm/ μg RNA) and GAPDH (specific activity: 3.1×10^6 cpm/ μg RNA) riboprobes were hybridized to 5 μg total RNA from each hypothalamus, for 16 h at 45°C , after denaturation at 95°C for 3 min (RPA II kit, Ambion). Non annealed nucleic acids were digested with RNase A (1U/ml) and RNase T (40U/ml) for 30 min, at 37°C . Protected fragments were resolved on 5% polyacrylamide-8M urea denaturing gels.

Autoradiography was performed at -80°C , using Kodak Biomax Ms-1 films with an intensifying screen. Ob-Rb and GAPDH mRNA levels were quantified by densitometry, using an IS1000 digital imaging system (Alpha Innotech Corp/Canberra Packard Montreal, QC, CA). Linearity of the protected signals was verified in each experiment, using 2.5-10 μg hypothalamic total RNA from the 2-month-old rats. Specificity of the [^{32}P]Ob-Rb riboprobe was assessed in each experiment, using a negative control of 5 μg liver total RNA. Normalized mRNA levels were expressed in percentage of relative density to those of 2-month-old rats, using a fixed amount of RNA.

Serum concentration of leptin, insulin and glucose

Serum concentrations of leptin were determined by ELISA (ACTIVETM murine leptin ELISA kit, Diagnostic Systems Laboratories Inc, Webster, TX). Serum levels of insulin were determined by RIA (Linco Research Inc, St-Charles, MO). Serum glucose was assayed by the glucose oxidase colorimetric method, using an automated analyzer. For each assay, all samples were analyzed in a single assay. Intra-assay coefficients of variation were 7.3%, 5.9% and 4.0%, respectively. The sensitivity of assays was 0.04 ng/mL, 0.1 ng/mL and 0.1mM, respectively.

Data analysis

Results were expressed as the mean \pm SEM. Statistical significance of differences was determined by the unpaired Student's *t* test and was established at $P < 0.05$. The study was aimed at determining: 1) the effect of aging (2-month-old compared to 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats); 2) the effect of caloric restriction (2-month-old compared to 18-month-old calorie-restricted rats); 3) the effect of caloric restriction in comparison to age-matched *ad libitum*-fed rats; 4) the effect of the protein restriction in *ad libitum*-fed rats (18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats compared to age-matched *ad libitum*/13.2% protein-

fed rats) and finally, 5) the effect of protein supplementation in calorie-restricted rats to maintain a 22% total protein intake (18-month-old rats calorie-restricted rats compared to age-matched CR/22% protein-fed rats).

RESULTS

Hypothalamic Ob-Rb mRNA levels

Levels of Ob-Rb mRNA were increased 1.3 times in the hypothalamus of 18-month-old *ad libitum*-fed rats compared to those of 2 month-old rats ($P<0.01$). This effect of age was reverted by long-term caloric restriction. Levels of Ob-Rb were also normalized in *ad libitum*-fed rat with 13.2% protein intake or in calorie-restricted rats fed a 22% protein (Fig. 1).

[Position of Figure 1 A, B]

Immunoreactive serum concentrations of leptin

Serum leptin levels were 95 times higher in 18-month-old *ad-libitum*-fed rats compared to those of 2-month-old controls (Table 1) ($P<0.001$). This raise was reverted by long-term CR. The level of dietary protein did not regulate serum leptin levels.

Serum concentrations of glucose and immunoreactive insulin

Serum glucose levels were 1.2 times higher in 18-month-old *ad libitum*-fed rats compared to those of 2-month-old controls (Table 1) ($P<0.05$) and CR normalized them. Levels of dietary protein did not positively regulated serum glucose levels.

Serum insulin levels were 2.3 times higher in 18-month-old *ad libitum*-fed rats compared to those of 2-month-old controls (Table 1) ($P<0.001$). Again, this deleterious effect of aging was prevented by the long-term CR and was not regulated by dietary protein levels.

[Position of Table 1]

DISCUSSION

Recent results indicate that aging is accompanied by hypothalamic leptin resistance, resulting from a diminution of leptin receptor protein and leading to an impairment of leptin signal transduction (12). As previously reported in 6- to 24-month-old rats (13), serum leptin levels were elevated in our aged *ad libitum*-fed rats and hypothalamic leptin receptor mRNA levels were slightly but significantly increased compared to those of young rats. Therefore, sustained stimulation of the leptin receptor may desensitize leptinergic neurones, stimulate receptor internalization (14), promote accumulation of the receptor in the cytoplasm and contribute to a decrease rate of leptin receptor mRNA translation. Our results suggest that adaptative mechanisms at the level of the hypothalamus differ with age and/or the duration of stimulation with a high concentration leptin, since in 6-week-old rats, a 4-week subcutaneous administration of leptin was shown to significantly decrease both leptin receptor mRNA and protein (15). Alternately, leptin may not be transported efficiently through the brain in aging *ad libitum*-fed rats. This could involve changes in the abundance of the short isoform of the leptin receptor (Ob-Ra), which is highly expressed in the choroid plexus and brain microvasculature and has been proposed to play a role in CNS leptin transport (16).

The contribution of increased glucose and insulin levels to leptin regulation is difficult to assess at this time, in relation with dietary conditions, as serum levels of the three molecules are coordinated. However, it might be proposed that elevation of these secretagogues contribute to increase leptin secretion and synthesis from adipocytes in the aging rat (11).

Finally, as no correlation has been observed between hypothalamic leptin receptor and preproGHRH mRNA levels in aging and calorie-restricted rats (see companion paper), this pathway does not appear to be a key modulator circuit in

the rejuvenating effect of CR on GHRH-R. However, studies to directly assess leptin receptor concentration and functionality will have to be performed before to reach a final conclusion.

REFERENCES

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
2. Friedman JM, Halaas JL 1998 Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770
3. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG 2000 Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671
4. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250-252
5. Guan XM, Hess JF, Yu H, Hey PJ, van der Ploeg LH 1997 Differential expression of mRNA for leptin receptor isoforms in the rat brain *Mol Cell Endocrinol* 133: 1-7
6. Shioda S, Funahashi H, Nakajo S, Yada T, Maruta O, Nakai Y 1998 Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neurosci Lett* 243: 41-44
7. Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB 1998 Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395:535-547
8. Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS 1997 Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 272: 32686-32695
9. Vuagnat BA, Pierroz DD, Lalaoui M, Englaro P, Pralong FP, Blum WF, Aubert ML 1998 Evidence for a leptin-neuropeptide Y axis for the regulation of growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 67:291-300
10. Cocchi D, De Gennaro Colonna V, Bagnasco M, Bonacci D, Muller EE 1999 Leptin regulates GH secretion in the rat by acting on GHR and somatostatinergic functions. *J Endocrinol* 162: 95-99

11. Levy JR, Stevens W 2001 The effects of insulin, glucose and pyruvate on the kinetics of leptin secretion. *Endocrinology* 142: 3558-3562
12. Scarpace PJ, Matheny M, Turner N 2001 Hypothalamic leptin resistance is associated with impaired leptin signal transduction in aged obese rats. *Neuroscience* 104: 1111-1117
13. Mooradian AD, Hurd R, Chehade J, Pun K, Haas MJ 2000 Age-related changes in plasma leptin binding activity in rats: a comparison of a simple acid-ethanol precipitation technique with column chromatography. *Proc Soc Exp Biol Med* 224: 273-277
14. Uotani S, Bjorbaek C, Tornoe J, Flier JS 1999 Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes* 48:279-286
15. Martin RL, Perez E, He YJ, Dawson R, Jr., Millard WJ 2000 Leptin resistance is associated with hypothalamic leptin receptor mRNA and protein downregulation. *Metabolism* 49:1479-1484
16. Lu Huang, Zhuowei W, Cai Li 2001 Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J Biol Chem* 276: 6343-6349
17. Levy JR, Stevens W 2001 The effects of insulin, glucose and pyruvate on the kinetics of leptin secretion. *Endocrinology* 142: 3558-3562.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to D^{rs} Joel K Elmquist and Christian Bjorbaek (Department of Medicine and Division of Endocrinology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Mass) for providing us with the Ob-Rb cDNA and to D^r P Chartrand (CHUM Research Center, University of Montreal, Montreal, Qc, CA) for the supply of a GAPDH cDNA.

This work was supported by the Dairy Farmers of Canada and the Canadian Institutes of Health Research. KR is recipient of a studentship from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). PG is recipient of a scholarship chercheur-boursier national from FRSQ.

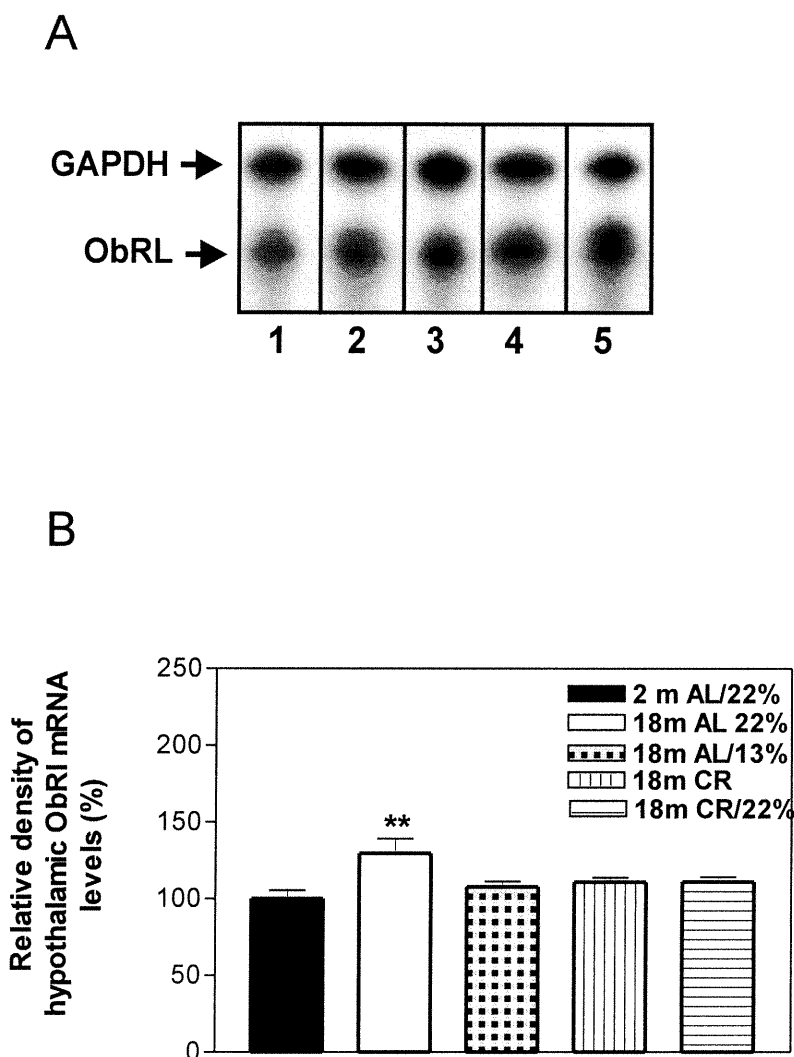


Figure 1. Effects of long-term caloric restriction and protein intake level on hypothalamic Ob-Rb mRNA levels in 18-month-old rats compared to 2-month-old rats.

Five μ g of total RNA were analyzed by RPA for each group. Relative densities of hypothalamic Ob-Rb mRNA levels were expressed in % to that obtained in 2-month-old rats.

A) Autoradiographic representation of Ob-Rb mRNA transcripts in 1) 2-month-old, 2) 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats, 3) 18-month-old *ad libitum*/13.2% protein-fed rats, 4) 18-month-old calorie-restricted (CR) rats and, 5) 18-month-old calorie-restricted/22% protein-fed rats.

B) In 2- and 18-month-old rats, results represent the mean \pm SEM of one experiment, in triplicate, using 5-8 rats.

* $P < 0.05$ when mRNA levels from 18-month-old *ad libitum*-fed/22% protein rats were compared to those of 2-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

* $P < 0.05$ when mRNA levels from 18-month-old calorie-restricted rats were compared to those of 2-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

* $P < 0.05$ when mRNA levels from 18-month-old calorie-restricted/22% protein-fed were compared to those of 2-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

TABLE 1. Serum concentration of leptin, glucose and insulin: effect of age and dietary protein and energy intakes.

Group	Leptin (ng/mL)	Glucose (nM)	Insulin (ng/mL)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	0.13 ± 0.05	9.33 ± 0.37	2.19 ± 0.30
18-month-old <i>ad libitum</i> /22% protein-fed	12.31 ± 0.56 ^a	10.90 ± 0.31 ^c	5.01 ± 0.44 ^a
18-month-old <i>ad libitum</i> /13.2% protein-fed	11.18 ± 0.72	12.44 ± 0.35 ^d	6.00 ± 0.37
18-month-old calorie-restricted	0.25 ± 0.07 ^b	9.44 ± 0.38 ^d	1.93 ± 0.28 ^d
18-month-old calorie-restricted/22% protein-fed	0.43 ± 0.14	9.01 ± 0.53	1.72 ± 0.32

Values represent the mean ± SEM of 5-6 individual samples tested in duplicate for leptin and 8-11 individual samples tested in singulate for glucose and insulin.

^a $P < 0.001$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^b $P < 0.001$ when compared to 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

^c $P < 0.05$ when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats.

^d $P < 0.01$ when compared to 18-month-old *ad libitum*/22% protein-fed rats.

3. DISCUSSION

Le processus de vieillissement chez les mammifères est associé à une diminution de la sensibilité de l'axe somatotrope au GHRH qui se traduit par une diminution des niveaux circulants de GH et d'IGF-I (173-176). Ces hormones influençant grandement la masse musculaire, la masse adipeuse ainsi que l'état et les fonctions de plusieurs tissus et organes (177-180), il est important de bien comprendre les mécanismes mis en jeu de même que les possibilités de les contourner ou de les ralentir dans le but de retarder le processus de vieillissement.

La restriction calorique modérée de longue durée (RC) a souvent été citée comme étant l'intervention anti-vieillessement la plus bénéfique chez les mammifères (172, 209-211). Chez les rongeurs, la prévention de la détérioration des tissus et organes reliés au vieillissement, le ralentissement du début ou de la progression de plusieurs maladies reliées à l'âge et donc l'extension de la durée de vie moyenne et maximale peuvent être atteints par une RC (208). Il a été suggéré que les effets bénéfiques de la restriction calorique seraient en partie dus au maintien de la fonctionnalité de l'axe somatotrope (GHRH/GH/IGF-I) (219), entre autres par la prévention des altérations des sites de liaison du GHRH-R hypophysaire (220). L'apport protéique a par ailleurs été démontré comme étant un modulateur de la sensibilité de l'axe somatotrope chez le rat jeune (71, 98, 222-227), toutefois ses effets à long terme n'ont pas été investigués.

Le présent projet avait donc pour objectif d'étudier l'effet de la combinaison de ces deux grands paramètres nutritionnels, soit la restriction énergétique modérée de longue durée et l'apport protéique optimal, au cours du vieillissement, sur la sensibilité de l'axe somatotrope et plus particulièrement sur l'intégrité et la fonctionnalité du récepteur hypophysaire et rénal du GHRH. L'expression du préproGHRH hypothalamique a également été étudiée. Au niveau périphérique, certaines entités hormonales et biochimiques pouvant potentiellement être impliquées dans le mécanisme de régulation du GHRH-R ont été mesurées. Les

niveaux sériques de leptine étant régulés différemment au cours du vieillissement et par la RC chez le rat jeune, nous avons ensuite évalué les niveaux d'ARNm de son récepteur hypothalamique ainsi que certains paramètres permettant de mieux comprendre la régulation de cet axe.

3.1 Régulation du GHRH-R hypophysaire et rénal: effets des facteurs centraux et périphériques influencés par la RC et l'apport protéique au cours du vieillissement.

Des changements au niveau de l'expression génique du GHRH-R ont été peu étudiés au cours du vieillissement en relation avec la RC. Récemment, une diminution progressive des niveaux de l'ARNm GHRH-R, a été rapportée par RT-PCR semi-quantitatif chez des rats de 6 à 24 mois, sans effet significatif de la RC sur l'ARNm du récepteur, même si une légère augmentation a été observée (196). D'autres résultats obtenus par Northern Blotting ont permis de démontrer que les deux transcrits d'ARNm du GHRH-R de 2.5 kb, correspondant au récepteur fonctionnel, et de 4.0 kb, dont la structure protéinique et la fonction est inconnue, sont régulés différemment au cours du vieillissement (205), résultats non-obtenus par la méthode de RT-PCR quantitative. Les résultats contenus dans ce mémoire sont ainsi les premiers à montrer l'effet de la RC et de l'apport protéique sur la régulation des niveaux des deux transcrits du GHRH-R au cours du vieillissement. De plus, ces changements de niveaux de transcrits ont été mis en relation avec ceux des deux sites de liaison du GHRH. En effet, à l'âge de 12 mois, les transcrits d'ARNm du récepteur hypophysaire du GHRH-R sont augmentés, résultant en une augmentation significative du ratio de 4/2.5 kb, en corrélation avec la perte du site de liaison à haute affinité. Ces résultats concordent avec ceux préalablement observés (201), montrant la présence d'un site de liaison à basse affinité et haute capacité détectable dans des homogénats d'hypophyses antérieures de rats de 12 mois contrairement aux rats de 2 mois où deux sites de liaison à haute affinité et

basse capacité et basse affinité et haute capacité sont observés. Aucun effet de la restriction protéique n'a été observé au niveau du récepteur ou de son ARNm. À 18 mois, l'effet de l'âge se traduit par une augmentation du transcrit de 4kb et du ratio 4/2.5 kb de même que par la détection d'une seule classe de sites de liaison. Aucun effet de la restriction protéique n'a été observé au niveau du récepteur ou de son ARNm. Par ailleurs, la RC a induit des effets rajeunissants au niveau de la régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R par une normalisation du transcrit de 4kb et du ratio 4/2.5 kb à un niveau similaire à ceux des rats jeunes. Cet effet s'est traduit au niveau protéique, par le maintien des deux sites de liaison du GHRH, tel que préalablement observé dans une colonie précédente (220). L'apport protéique de 22% chez les animaux de 18 mois en RC ne permet pas de maintenir les effets bénéfiques de la RC au niveau du GHRH-R ou de son ARNm. À l'âge de 22 mois, aucun effet de l'âge ou de l'état nutritionnel n'a été observé sur les niveaux d'ARNm du GHRH-R qui demeurent similaires chez tous les groupes. Les essais de liaison n'ont pu être effectués avec ce groupe d'âge étant donné un nombre insuffisant d'animaux. Il semble donc qu'à cet âge, la RC n'a plus ses effets positifs au niveau de l'axe somatotrope. Par contre, une tendance observée pour plusieurs paramètres chez nos animaux de 22 mois soumis à une RC, supporte l'hypothèse de la présence de deux sous-groupes chez ces animaux ; le premier dans lequel les paramètres sont similaires à ceux des rats jeunes et le second dans lequel la RC ne semble plus moduler de façon positive les paramètres étudiés. L'hypothèse d'un sous-groupe présentant un vieillissement réussi devra être étudiée plus en profondeur avec un nombre plus élevé de rats de 22 mois.

Ces résultats suggèrent donc que la RC peut efficacement protéger le GHRH-R du vieillissement par un mécanisme permettant le maintien d'un ratio optimal des transcrits d'ARNm, se traduisant vraisemblablement par le maintien de la fonctionnalité du récepteur. Par contre, étant donné que la structure du transcrit d'ARNm de 4kb du GHRH-R n'est pas encore connue, le mécanisme

précis par lequel s'effectue les changements de paramètres de liaison demeure à préciser. Toutefois, il est suggéré que cette entité soit traduite en un isoforme du GHRH-R tronqué, agissant possiblement comme un dominant-négatif tel que rapporté dans les adénomes hypophysaires humains (128). Parallèlement à nos résultats, l'étude de Shimokawa *et al.* (196) citée plus haut pour ses résultats sur la régulation de l'ARNm du GHRH-R au cours du vieillissement obtenus par RT-PCR, rapporte aussi une légère mais non-significative augmentation des niveaux d'ARNm chez les rats soumis à une RC. Par contre, leur modèle de RC est très différent de celui présenté dans la présente étude: début à l'âge de 6 semaines, 30% -équivalent de RC par semaine, approche dans laquelle les rats étaient nourris 3 jours sur 7. Dans nos études (référence 201 et la présente), la RC de 40% débutait à l'âge de 8 mois, dans le but de prévenir les interférences avec la période de croissance rapide et les rats étaient nourris à tous les jours. Il est donc difficile d'établir si les divergences de résultats sont reliés aux modèles de RC ou aux approches différentes de quantification des niveaux d'ARNm par RT-PCR versus Northern blotting.

La technique de RT-PCR a permis la détection de l'ARNm du GHRH-R dans plusieurs tissus parmi lesquels seule la médulla rénale en renferme une concentration suffisante pour permettre sa détection sans amplification (86). Il a été suggéré sur la base d'études de structure-affinité et de réticulation chimique que le GHRH-R de l'hypophyse antérieure et de la médulla de rein puissent être différents (149). De même, les rôles spécifiques du GHRH-R de la médulla rénale demeurent inconnus, bien que sa localisation soit associée aux anses de Henlé et suggérant la prolifération différentielle cellulaire et/ou le transport ionique (148). Les profils de régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire et rénal étant différents au cours du développement et du vieillissement chez le rat (148), il était donc d'intérêt de déterminer si des manipulations nutritionnelles pouvaient les réguler sélectivement. En effet, bien que les niveaux d'ARNm hypophysaire et rénal du GHRH-R diminuent à l'âge de 12 et 18 mois et demeurent inchangés à

l'âge de 22 mois, ces derniers ne sont pas modulés par la RC ou l'apport protéique. Ainsi, la RC seule à l'âge de 18 mois ne permet pas de maintenir les niveaux d'ARNm rénal à un niveau similaire à celui des rats jeunes tel que dans l'hypophyse. Par contre, un effet positif sur les niveaux d'ARNm du récepteur rénal est observé lorsque la RC est combinée à un apport protéique de 22%. L'impact de cette intervention au niveau du récepteur demeure à évaluer, étant donné que la méthode d'essai de liaison dans des cellules semi-purifiées en culture d'anes de Henlé est en cours de développement. Conséquemment, il apparaît présentement prématuré de discuter l'importance physiologique de cette observation.

Afin d'identifier certains mécanismes par lesquels le statut nutritionnel pourrait réguler le GHRH-R, plusieurs paramètres biochimiques et hormonaux ont été analysés. Plusieurs hormones peuvent réguler le gène du GHRH-R dont le GHRH lui-même, qui contrôle l'expression de son propre récepteur *in vitro* (131, 148) et *in vivo* (230), en plus de stimuler la synthèse et la sécrétion de GH (131). Les niveaux hypothalamiques d'ARNm du préproGHRH ont été mesurés à 18 mois puisque ce groupe d'âge présentait la plus grande diversité d'effets régulateurs. Aucune modification n'a été observée en fonction de l'âge ou de l'apport protéique seul. Par contre, la RC a induit une diminution du niveau d'ARNm du préproGHRH qui est normalisé lorsque cette dernière est combinée à un apport protéique de 22%. Ces résultats de l'impact d'un apport protéique optimal à long terme appuient les résultats d'études à court terme (98, 231) quant à son importance pour le maintien des niveaux d'ARNm du préproGHRH. Les résultats obtenus suggèrent de plus que la RC puisse réguler à la hausse la transcription et la traduction de l'ARNm du préproGHRH de même que la synthèse *de novo* de GHRH-R fonctionnels. Alternativement, le niveau de préproGHRH hypothalamique pourrait aussi refléter le contenu hypothalamique en GHRH, et donc ne pas constituer un régulateur important du GHRH-R. Par contre, étant donné l'importance de l'apport protéique de 22% au niveau rénal, le niveau de GHRH hypothalamique pourrait

être un régulateur du GHRH-R rénal en supposant qu'il soit toujours bioactif à son arrivée dans les cellules de Henlé. Une quantification des niveaux d'ARNm du préproGHRH médullaire devra par ailleurs être effectuée afin de déterminer l'origine du GHRH agissant au niveau du GHRH-R rénal.

Le vieillissement est reconnu pour diminuer les niveaux d'IGF-I sériques et la RC n'a pas d'effet sur ceux-ci ou induit une diminution supplémentaire de leur niveaux (220). Un apport protéique de 22% protéine chez les animaux en RC restaure partiellement les niveaux d'IGF-I en les augmentant à l'âge de 18 et 22 mois. Par ailleurs, nos résultats (non-publiés) indiquent que les protéines de liaison de l'IGF-I sont augmentées avec l'âge et normalisées par la RC. En effet, l'IGFBP-3, soit la protéine de liaison de l'IGF-I la plus abondante dans le sérum, est augmentée d'environ 2 fois chez les rats de 18 mois nourris *ad libitum* comparativement aux témoins de 2 mois, mais diminuée d'environ 1.6 fois chez les rats de 18 mois soumis à une RC comparativement aux rats jeunes. Le ratio IGF-I/IGFBP3 ratio étant significativement diminué d'environ 2.3 fois chez les rats de 18 mois comparativement aux rats de 2 mois. Ces résultats suggèrent donc que les niveaux d'IGF-I libres, soit l'IGF-I qui peut se lier à son récepteur, pourraient être plus élevés que la concentration d'IGF-I sérique apparente chez les rats en RC. Toutefois, ces résultats ne peuvent expliquer les effets positifs de la RC sur les niveaux d'ARNm du GHRH-R. Il a récemment été démontré que l'IGF-I régule à la baisse les niveaux d'ARNm du GHRH-R dans des cellules hypophysaires de rats adultes en culture (232), mais ne modulerait pas les niveaux d'ARNm du préproGHRH (233). Les effets de l'IGF-I dans la médulla de rein sur les niveaux d'ARNm du GHRH-R et du prepro-GHRH n'ont quant à eux pas encore été étudiés.

Les hormones thyroïdiennes influencent positivement *in vitro* (135) et *in vivo* (29, 136, 137) l'expression de l'ARNm du GHRH-R (135-137), la concentration des sites de liaison à haute et à basse affinité du GHRH (29) ainsi que de la

concentration de GHRH-R immunoréactif (29), bien qu'aucun élément de réponse pour le récepteur des hormones thyroïdiennes n'ait été identifié sur le gène du GHRH-R (125). Tel que précédemment observé (220), les niveaux sériques de T₄ libre diminuent au cours du vieillissement sans normalisation par la RC. Par contre, chez les rats de 18 et 22 mois, un apport protéique de 22% combiné à la RC maintient les concentrations de T₄ à des niveaux similaires à ceux des animaux nourris *ad libitum*. Comme les taux de conversion entre T₄ et T₃ ou les quantités de récepteurs activés de ces hormones affectent plusieurs activités protéiques (172, 234-236), les niveaux de T₃ libre ont également été étudiés. Les concentrations sériques de cette hormone offrent peu de support pour expliquer l'effet de régulation positif de la RC sur le GHRH-R, puisque les niveaux de T₃ sont diminués de façon importante avec la RC. De plus, aucun effet de l'apport protéique n'a été détecté pour cette hormone.

Les hormones sexuelles peuvent également réguler l'expression du gène du GHRH-R. La régulation à la baisse du GHRH-R est expliquée par un élément de réponse négatif pour le β -estradiol étant présent sur le gène du GHRH-R entre les positions -202 et -108 pb et entre -317 et -888 pour les estrogènes (125). Aucun élément de réponse pour la testostérone n'a été découvert à ce jour sur le promoteur du gène et aucune étude sur la régulation *in vitro* de la testostérone dans des cellules hypophysaires en culture n'a été rapportée. Les niveaux sériques de testostérone ont donc été mesurés afin de détecter une possible régulation directe du GHRH-R ou *via* la SRIF dont la sécrétion hypothalamique peut être activée par la testostérone, résultant en une diminution de celle de la GH (36-38). Nos résultats indiquent que la testostérone est diminuée au cours du vieillissement et que la RC restaure partiellement ses niveaux à l'âge de 18 mois, suggérant ainsi un mécanisme potentiel par lequel le GHRH-R pourrait être régulé. Cette régulation positive n'est cependant pas maintenue à un niveau significatif à l'âge de 22 mois même si un niveau plus élevé de testostérone est observé. D'autre part, la restriction protéique exerce une augmentation transitoire de la

testostérone sérique à l'âge de 18 mois seulement, chez les rats nourris *ad libitum*.

Les glucocorticoïdes ont finalement été mesurés puisqu'ils augmentent l'expression des niveaux d'ARNm du GHRH-R dans l'hypophyse de rat, ainsi que le nombre de sites de liaison au GHRH (133, 134, 139). Les niveaux d'ARNm du GHRH-R sont directement stimulés *in vivo* et *in vitro* et l'effet prédominant de cette hormone consiste en l'augmentation de la transcription du gène du GHRH-R (134). Un élément de réponse positif aux glucocorticoïdes étant localisé dans la région entre -1456 et -1181pb (125). Nos résultats indiquent que les niveaux totaux de corticostérone demeurent inchangés au cours du vieillissement à l'âge de 18 et 22 mois. Toutefois, la RC induit une augmentation de leurs niveaux comparativement à ceux des rats de 2 mois et d'animaux du même âge nourris *ad libitum*. Ceci qui rejoint une étude récemment publiée montrant une augmentation des niveaux de cette hormone après une RC de plus de 2 mois (237). Ces résultats peuvent expliquer les effets bénéfiques de la RC, soit l'hormesis qui est défini comme étant les actions bénéfiques résultant de la réponse d'un organisme à un stress de faible intensité, soit un des mécanisme d'action de la RC (215). De façon générale, l'hormesis pourrait exercer ses effets anti-vieillessement par une réponse des gènes de stress et la RC augmenterait l'expression des protéines de choc thermique en réponse au stress (238).

Comme les récepteurs des hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes sont présents dans les cellules somatotropes et des anses de Henlé, l'effet de régulation de ces hormones sur le GHRH-R pourrait s'effectuer à des concentrations différentes selon le type cellulaire. De plus, la RC pourrait réguler de façon cellule-spécifique les niveaux de leurs récepteurs nucléaires.

3.2 Régulation de l'axe leptine : effets de la RC et l'apport protéique au cours du vieillissement.

La leptine est une protéine de 16 kDa encodée par le gène *ob* (58). Cette hormone agit sur la prise alimentaire et la dépense énergétique (59) et joue un rôle important dans la réponse neuroendocrine au jeûne (239). Elle est produite par les adipocytes, sécrétée dans le sang et traverse la barrière hématoencéphalique (240). Cette propriété lui permet de rejoindre ses sites d'action au niveau cerveau qui sont entre autres les noyaux arqué, ventromédian et paraventriculaire de l'hypothalamus ainsi que sa région latérale (241-243).

Étant donné que la leptine stimule la sécrétion et la synthèse de GH (60, 63) ainsi que les niveaux hypothalamiques de GHRH, ses niveaux sériques ont été mesurés chez nos animaux puisqu'ils représentaient un mécanisme potentiel par lequel la RC aurait pu réguler positivement le GHRH-R. Ceux-ci étaient plus élevés chez les rats de 18 mois comparativement à ceux de 2 mois tel que rapporté dans d'autres études (244-247).

Comme l'action de la leptine sur la GH s'effectue présumément par une interaction avec la forme longue du récepteur *ob* (Ob-Rb), localisé dans le noyau arqué de l'hypothalamus (61, 62), ses niveaux d'ARNm ont été mesurés par RPA. Les niveaux hypothalamiques d'ARNm de l'Ob-Rb de rats de 18 mois étaient augmentés légèrement, mais significativement par rapport aux rats de 2 mois. Chez les rats âgés, les hauts niveaux de leptine pourraient provoquer une surstimulation de l'Ob-Rb. Ceci pourrait provoquer une désensibilisation des neurones leptinergiques menant à l'internalisation du récepteur (248) et à l'accumulation de récepteurs dans le cytoplasme, contribuant ainsi à la diminution du taux de traduction du récepteur de la leptine. Nos résultats suggèrent une régulation hypothalamique différente selon l'âge ou la durée de stimulation par la leptine, puisqu'une diminution de leptine et de l'ARNm de son récepteur ont été observés

suite à une stimulation sous-cutanée de leptine chez le rat de 6 semaines, durant 4 semaines (249). De plus, une diminution du transport de la leptine au niveau de la barrière hématoencéphalique pourrait expliquer nos résultats (240, 248). Cet état pourrait également être relié à des changements de concentration de la forme courte soluble du récepteur de la leptine (Ob-Ra) identifiée comme étant abondante dans le plexus choroïde et les microvaisseaux du cerveau (250). D'autres mécanismes impliquant l'inactivation des voies de transduction du signal ont de plus été proposés (244, 251) dans le phénomène de résistance à la leptine.

Dans la présente étude, la restriction calorique ou protéique tendent à normaliser les niveaux d'ARNm du récepteur de la leptine. Il a récemment été proposé que la leptine puisse jouer un rôle neuroendocrinien important dans la prévention du vieillissement par la RC (252). Ces effets ont été expliqués par le fait que la RC engendre une diminution de la masse adipeuse, qui mène en conséquence à la diminution de plusieurs peptides sériques comme la leptine et d'autres cytokines sécrétées par le tissu adipeux (253, 254). Cette théorie est cependant affaiblie par plusieurs observations contradictoires sur le sujet et les présents résultats qui n'ont démontré aucun effet spécifique de la RC, à tout le moins dans nos conditions expérimentales. (255-258). Les présents résultats suggèrent que l'effet positif de la RC sur le GHRH-R et les niveaux d'ARNm de préproGHRH n'est probablement pas lié à un mécanisme impliquant le récepteur hypothalamique de la leptine.

Plusieurs études suggèrent un lien fonctionnel entre le statut nutritionnel, la sécrétion d'insuline du pancréas et l'expression de leptine dans les adipocytes (254, 259, 260). Nos résultats sont en accord avec ceux d'une étude récente montrant une augmentation des niveaux d'insuline chez le rat âgé qui sont normalisés à ceux des rats de 2 mois lorsque les animaux sont soumis à une RC (254). Aucun effet de l'apport protéique n'a été observé dans nos conditions expérimentales. Ces résultats montrent ainsi une corrélation entre les niveaux de

leptine et d'insuline sérique. Il est difficile d'évaluer l'effet du glucose et de l'insuline sur la régulation de la leptine puisque les niveaux des trois molécules sont régulés de façon coordonnée avec les conditions nutritionnelles. Il a cependant été proposé que ces sécrétagogues contribuent à une augmentation de synthèse et de sécrétion de leptine dans les adipocytes de rats âgés (260A). Ainsi, nos résultats indiquent que les niveaux de glucose sériques sont augmentés avec le vieillissement, la restriction protéique induisant une augmentation additionnelle. La RC prévient cette augmentation avec ou sans modulation de l'apport protéique. Ces résultats sont en accord avec l'une des hypothèses de l'effet bénéfique de la RC qui pourrait agir en modulant la glycémie et l'insulinémie, connues pour causer des dommages cellulaires et moléculaires au cours du vieillissement (214). Il a été proposé que l'insuline provoque des dommages par son action mitogénique (261) alors que le glucose serait lié à des phénomènes de glycation et/ou glycoxydation (262) bien que d'autres mécanismes pourraient être impliqués. Ces phénomènes post-traductionnels sont d'ailleurs connus pour influencer la fonctionnalité de certains récepteurs dont possiblement le GHRH-R.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La présente étude visait à vérifier l'hypothèse selon laquelle la restriction calorique modérée de longue durée combinée à un apport protéique optimal, peut être bénéfique au cours du vieillissement, en modulant positivement l'axe somatotrope, principalement en maintenant l'intégrité fonctionnelle du récepteur hypophysaire et possiblement en exerçant un maintien de la concentration du récepteur du GHRH au niveau rénal.

Au niveau hypophysaire, nous avons démontré que la RC seule et non combinée à un apport protéique de 22% prévient l'altération des sites de liaison au GHRH de même qu'une augmentation du ratio 4/2.5kb des transcrits de l'ARNm du récepteur du GHRH observés au cours du vieillissement, chez les rats nourris *ad libitum*. Une régulation différentielle a été observée au niveau du récepteur rénal puisque que son niveau d'ARNm demeure similaire à celui des rats jeunes uniquement lorsque la RC est combinée à un apport protéique de 22%. Toutefois, cette conclusion ne pourra être définitivement établie que si les résultats obtenus par des études de liaison sur les récepteurs GHRH de la médulla rénale convergent avec les données de protection à la RNase.

Nous avons subséquemment tenté d'identifier des entités biochimiques et hormonales par lesquelles s'effectuerait la régulation nutritionnelle du GHRH-R au cours du vieillissement. Les glucocorticoïdes de même que la testostérone sont ressortis comme étant des médiateurs moléculaires potentiels de la régulation de l'expression du gène du GHRH-R par la RC au cours du vieillissement puisque leurs niveaux sont maintenus à des niveaux plus élevés. Comme le GHRH-R ne possède pas d'élément de réponse identifié pour la testostérone, contrairement aux glucocorticoïdes, et qu'aucune étude connue n'a été effectuée concernant son effet sur la régulation de l'expression du GHRH-R, il sera important de déterminer l'effet de cette hormone sur la régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R, dans des cellules hypophysaires et rénales en culture primaire provenant de rats jeunes et âgés, afin de cerner une possible action directe ou indirecte sur la régulation de

l'expression du gène du GHRH-R. Des études de régulation impliquant des combinaisons hormonales mimant celles retrouvées au niveau sérique lors de la RC pourraient ensuite être entreprises. De telles expériences permettraient de valider notre hypothèse sur le mécanisme moléculaire en créant un modèle *in vitro* mimant l'effet *in vivo* de la RC.

Au niveau cellulaire, nous ne pouvons exclure la régulation de la fonctionnalité du GHRH-R par des mécanismes d'altérations post-traductionnels du récepteur au cours du vieillissement. Des études biochimiques d'immunobuvardage et de réticulation chimique avec plusieurs anticorps anti-GHRH-R permettraient d'identifier les différentes isoformes du récepteur qui ont probablement une influence sur l'intégrité fonctionnelle du GHRH-R et l'axe somatotrope au cours du vieillissement, dans un contexte de RC. Ces expériences aideraient à préciser la nature des changements structuraux des isoformes du GHRH-R et de vérifier, à tout le moins partiellement, l'hypothèse selon laquelle la RC réduit la production de radicaux libres (213), et maintient dans un état fonctionnel le système de défense cytosolique (213, 263, 264) et permet de supprimer les dommages existants tels que la lipoperoxydation, la glycation et les dommages à l'ADN (212, 265-267).

Au niveau systémique, cette étude a permis d'étudier une des voies par lesquelles pourrait s'effectuer l'effet positif de régulation de la RC sur le GHRH-R: l'axe leptine. Nos résultats ont démontré que bien que la RC prévient la hausse des niveaux de leptine sérique au cours du vieillissement, le récepteur hypothalamique de la leptine semble peu affecté par le vieillissement ou la RC, suggérant que cet axe n'agit pas comme un circuit modulateur important. Pour confirmer cette hypothèse, il serait important d'étudier la concentration et l'intégrité fonctionnelle du récepteur de la leptine. De plus, comme le neuropeptide Y (NPY) a été suggéré comme étant un médiateur hypothalamique de l'effet stimulateur de la leptine sur la GH (64-67), une des suites à donner à ce projet serait d'en mesurer les niveaux

hypothalamiques de même que ceux de son récepteur ainsi que ses paramètres de liaison, afin de mieux caractériser l'axe leptine-NPY et sa contribution à la régulation de l'axe somatotrope au cours du vieillissement et dans le modèle de vieillissement réussi que constitue la RC modérée de longue durée.

Enfin, compte tenu de la fragilité rénale avec le vieillissement et de nos résultats suggérant une modulation positive des niveaux d'ARNm du GHRH-R rénal observée lors d'un apport protéique optimal relié à la RC modérée de longue durée, il sera d'intérêt d'explorer cette piste lorsque l'essai de liaison du GHRH rénal sera mis au point dans les cellules de l'anse de Henlé afin de comparer le comportement spécifique du GHRH-R rénal et hypophysaire en situation de modulation nutritionnelle de longue durée.

5. BIBLIOGRAPHIE

1. Andreasen T, Helmggaard L, Gaudreau P, Anderson PH 1996 Growth hormone-releasing substances. In : The complexity of endocrines systems, Ranke MB, Christiansen JS, Eds J and J Verlag, Mannheim:1-27
2. Frohman LA, Jansson JO 1986 Growth hormone-releasing hormone. *Endocr Rev* 7:223-253
3. Parller DC, Sassin JF, Mace JW, Rossman L 1969 Human growth hormone release during sleep: electroencephalographic correlation. *J Clin Endocrinol Metab* 29:871-874
4. Winer LM, Shaw MA, Bauman G 1990 Basal plasma growth hormone levels in man: new evidence for rythmicity of growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1678-1686
5. Tannenbaum GS, Martin JB 1976 Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 98:562-570
6. Gluckman PD, Grumbach MM, Kaplan L 1981 The neuroendocrine regulation and function of growth hormone and prolactin in the mammalian foetus. *Endocr. Rev* 2:363-395
7. Walker PH, Dussault G, Alvarado-Urbina, Dupont 1977 The development of hypothalamo-pituitary axis in the neonatal rat: hypothalamic somatostatin and pituitary and serum GH concentrations. *Endocrinology* 101:782-787
8. Müller EE, Cella SG, Parenti M, Deghenghi V, Locatelli V, De Genarro Colona V, Torsello A, Cocchi D 1995 Somatotropic dysregulation in old mammals. *Horm Res.* 43:39-45
9. Sarret P, Nouel D, Dal Farra C, Vincent JP, Beaudet A, Mazella J 1999 Receptor-mediated internalisation is critical for the inhibition of the expression of growth hormone by somatostatin in the pituitary cell line AtT 20. *J Biol Chem* 274:19294-19300

10. Mayo KE 1992 Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 6:1734-1744
11. Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S 1992 Cloning and functional characterisation of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:251-255
12. Frohman LA 1996 Cellular physiology of growth hormone-releasing hormone. In: *Growth hormone secretagogues*, BB Bercu and RF Walker Eds Springer-Verlag, New-York:137-144
13. Lumpkin MD, McDonald JK 1989 Blockade of growth hormone releasing-factor activity in the pituitary and hypothalamus of the conscious rat with a peptidic GHRH antagonist. *Endocrinology* 124:1522-1531
14. Mertani HC, Pechoux C, Garcia-Caballero T, Waters MJ, Morel G 1995 Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the human anterior pituitary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3361-3367
15. Fraser RA, Harvey S 1992 Ubiquitous distribution of growth hormone receptors and/or binding proteins in adenohypophysal tissue. *Endocrinology* 130:3593-3600
16. Fraser RA, Siminosky K, Harvey S 1991 Growth hormone receptor gene: novel expression in pituitary tissue. *J Endocrinol* 128:R9-R11
17. Yamashita S, Weiss M, Melmed S. 1986 Insulin-like growth factor 1 regulates growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels in human pituitary tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab* 63 : 730-735.
18. Yamashita S, Melmed S 1987 Insulin-like growth factor 1 regulation of growth hormone gene transcription in primary rat pituitary cells. *J Clin Invest* 79:449-452
- 18A. 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

- 18B. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML 2000 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407: 908-913
19. Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL 1981 Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 212:1279-1281
20. 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
21. Yamashita S, Melmed S 1986 Insulin regulation of rat growth hormone gene transcription. *J Clin Invest* 78:1008-1041
22. Ahmad I, Steegles AW, Finkelstein JA 1992 In situ hybridization study of obesity-associated alteration in growth hormone mRNA levels. *Int J Obes* 16:435-441
23. Evans RM, Birnberg NC, Rosenfield MG 1992 Glucocorticoid and thyroid hormones transcriptionally regulate growth hormone gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 79:7659-7663
24. Casanova J, Copp RP, Janocko L, Samuels HH 1985 5'-Flanking DNA of the rat growth hormone gene mediates regulated expression by thyroid hormone. *J Biol Chem* 260:11744-11748
25. Glass CK, Franco R, Weinberg C, Albert VR, Evans RM, Rosenfeld MG 1987 A c-erb-A binding site in the rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone. *Nature* 329:738-741
26. Koenig RJ, Brent Ga, Warne RL, Larsen PR, Moore DM 1987 Thyroid hormone receptor binds to a site in the rat growth hormone promoter required for induction by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci* 84:5670-5674
27. Sap J, De Magistris L, Stunnenberg H, Vennstrom B 1990 A major thyroid hormone response element in the third intron of the rat growth hormone gene. *Embo J* 9:887-896

28. Martin D, Epelbaum MT, Bluet-Pajot M, Prelot M, Kordon C 1985 Thyroidectomy abolishes pulsatile growth hormone secretion without affecting hypothalamic somatostatin. *Neuroendocrinology* 41:476-481
29. Boulanger L, Andersen PH, Gaudreau P 1999 Development of a site-directed polyclonal antibody against the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its use to estimate GHRH receptor concentration in normal and hypothyroid rats. *Neuroendocrinology* 70:117-127
30. Seifert H, Perrin M, Rivier J, Vale W 1984 Growth hormone-releasing factor on rat anterior pituitary cells. *Nature* 313:487-489
31. Tamaki M, Sato M, Matsubara S, Wada Y, Takahara J 1996 Dexamethasone increases growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) receptor mRNA levels in cultured rat anterior pituitary cells. *J Neuroendocrinology* 8:475-480
32. Fernandez-Vasquez G, Cacicedo L, Lorenzo MJ, Tolon RM, Lopez J, Sanchez FF 1995 Corticosterone modulates growth hormone-releasing hormone factor and somatostatin in fetal rat hypothalamic cultures. *Neuroendocrinology* 61:31-35
33. Lam KS, Srivastava G 1997 Gene expression of hypothalamic somatostatin and growth hormone-releasing hormone in dexamethasone-treated rats. *Neuroendocrinology* 66:2-8
34. Delitala G, Tomasi P, Viridis R 1988 Neuroendocrine regulation of human growth hormone secretion. Diagnostic and clinical applications. *J Endocrinol Invest* 11:441-462
35. Devesa J, Lima L, Tresgerres JAF 1992 Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends Endocrinol Metab* 3:175-183
36. Frohman LA, Downs TR, Chomczynski P 1992 Regulation of growth hormone secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology* 13:344-405

37. Devesa G, Lois N, Arce V, Diaz MJ, Lima L, Tresguerres JAF 1991 The role of sexual steroids in the modulation of growth hormone (GH) secretion in humans. *J Steroid Biochem ol Biol* 40:165-173
38. Hartman ML, Veldhuis JD, Thorner MO 1993 Normal control of growth hormone secretion. *Horm Res* 40:37-47
39. Brodows RG, Sunyer FXP, Campbell RG 1973 Neural control of counterregulatory events during glucopenia in man. *J Clin Invest* 52:1841-1844
40. Tannenbaum GS, Martin JB 1976 Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 98:562-570
41. Murao K, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Ishida T, Takahara J 1994 Accute effects of hypoglycemia on hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin gene expression in the rat. *Endocrinology* 134:418-423
42. Berrelowitz M, Dudlak D, Frohman A 1982 Release of somatostatin-like immunoreactivity from incubated rat hypothalamus and cerebral cortex. Effects of glucose and glucoregulatory hormones. *J Clin Invest.* 69:1293-1301
43. Besset A, Bonardet A, Raudonin G, Descomps B, Passnant P 1982 Increase in sleep-related GH and Prl secretion after chronic arginine aspartate administration in man. *Acta Endocrinol* 99:18-23
44. Daughaday WH 1989 Growth hormone: normal synthesis, secretion, control and mechanisms of action. In : *Endocrinology*, edited by L.J. De Groot. Philadelphia, PA:Saunders 1:318-329
45. Isidori A, Lomonaco A, Cappa M 1981 A study of growth hormone release in man after oral administration of amino acids. *Curr. Med. Res. Opin.* 7:475-481
46. Okada K, Sugihara H, Minami S, Wakabayashi I 1993 Effect of parental administration of selected nutrients and central injection of gamma-

- globulin from antiserum to neuropeptide Y on growth hormone secretory pattern in food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 57:678-686
47. Knopf RF, Conn JW, Fajans SS, Rull JA, Guntsche EM, Thiffault CA 1966 The normal endocrine response to ingestion of protein and infusion of amino acids. Sequential secretion of insulin and growth hormone. *Trans. Assoc. Am. Phys.* 79:312-321
 48. Alba-Roth JA, Müller AO, Schopol J, Von Werder K 1988 Arginine stimulates growth hormone secretion by suppressing endogenous somatostatin secretion. *J Clin Endocrinol. Metab.* 67:1186-1189
 49. Ghigo ES, Goffi S, Arvat E, Nicolosi M, Procopio M, Bellone J, Imperiale E, Mazza E, Barrachi G, Camanni F 1990 Pyridostigmine partially restores the GH responsiveness to GHRH in normal aging. *Acta Endocrinol* 123:169-174
 50. Ghigo ES, Goffi S, Nicolosi M, Arvat E, Bellone J, Procopio M, Valente F, Mazza E, Ghigo MC, Camanni F 1990 Growth hormone responsiveness to combined administration of arginine and GH-releasing hormone does not vary with age in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71:1481-1485
 51. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA 1991 Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142
 52. Blackard WG, Boylon CT, Hinson TC, Nelson NC 1969 Effect of lipid and ketone infusions on insulin-induced growth hormone elevations in rhesus monkeys. *Endocrinology* 85:1180-1185
 53. Estienne MJ, Schillo KK, Green MA, Hileman SM, Boling JA. 1989 N-methyl-D,L-aspartate stimulates growth hormone but not luteinizing hormone secretion in the sheep. *Life Sci.* 44:1527-1533
 54. Casanueva FF, Borrás CG, Burguera B, Lima L, Muruaus C, Tresguerres JA, Devesa J 1987 Growth hormone administration in anorexia nervosa patients, normal controls, and tamoxifen-pretreated volunteers. *Clin. Endocrinol.* 27:517-523

55. Casanueva FF, Villanueva L, Penalva A, Cabezas J. 1981 Free fatty acids inhibition of exercise-induced growth hormone secretion. *Horm. Metab. Res.* 13:348-350
56. Alvarez CV, Mallo F, Burguera B, Cacicedo L, Dieguez C, Casanueva FF 1991 Evidence for a direct pituitary inhibition by free fatty acids of in vivo growth hormone responses to growth hormone-releasing hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 53:185-189
57. Imaki T, Shibasaki T, Masuda A, Hotta M, Yamaguchi N, Demura H, Shizume K, Wakabayashi I, Ling N 1986 The effect of glucose and free fatty acids on growth hormone (GH)-releasing factor-mediated GH secretion in rats. *Endocrinology* 118:2390-2394
58. Zhang Y, Proenca YR, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
59. Campfield LA, Smith FJ, Burn P 1996 The Ob protein (leptin) pathway. A link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm. Metab. Res.* 28:619-632
60. Carro E, Senaris R, Considine RV, Casanueva FF, Dieguez C 1997 Regulation of growth hormone secretion by leptine. *Endocrinology* 138:2203-2206
61. Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P 1996 Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett.* 387:113-116
62. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG 1996 Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest.* 98:1101-1106
63. Cocchi D, De Gennaro Colonna V, Bagnasco M, Bonacci D, Müller EE 1999 Leptin regulates GH secretion in the rat by acting on GHRH and somatostatinergic functions. *Journal of endocrinology* 162:95-99.

64. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Vallesky JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hofmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, MacKellar FC, Zhang XY, Heimna M 1995 The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 77:530-532
65. Hakansson ML, Hulting AL, Meister B 1996 Expression of leptin receptor mRNA in the hypothalamus arcuate nucleus-relationship with NPY neurons. *Neuroreport* 7:3087-3092
66. Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Morgan PJ, Trayhurn P 1996 Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *Journal of neuroendocrinology* :733-735
67. Wang Q, Bing C, Al-Barazanji K, Mossakowaka DE, Wang XM, McBay DL, Neville WA, Taddayon M, Picavance L, Dryden S, Thomas MEA, McHale MT, Gloyer IS, Wilson S, Buckingham R, Arch JRJ, Trayhurn P, Williams G 1997 Interrations between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurones in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes* 46: 335-341
68. Cocchi D, Parenti M, Cattaneo L, De Gennaro CV, Zocchetti A, Muller EE 1993 Growth hormone secretion is differentially affected in genetically obese male and female rats. *Neuroendocrinology* 5 :928-934
69. Sacchi M, Pincelli AI, Cavagnini . 1999 Growth hormone in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:260-271
70. Tannenbaum GS, Rorstad O, Brazeau P 1979 Effects of prolonged food-deprivation on the ultradian growth-hormone rhythm and immunoreactive somatostatin tissue level in the rat. *Endocrinology* 104:1799-1738
71. Okada K, Suzuki N, Sigihara H. Minami S, Wakabayashi I. 1994 Restoration of growth hormone secretion in prolonged food-deprived rat depends on the level of nutritional intake and dietary protein. *Neuroendocrinology* 59:380-386
72. Ho KY, Veldhuis JD, Johnson ML, Furlanetto R, Evans WS, Alberti KGM, Thorner MO 1988 Fasting enhances growth hormone secretion and

- amplifies complex rhythms of growth hormone secretion in man. *J Clin Invest* 81:968-975
73. Harel Z, Tannenbaum GS 1995 Long-term alterations in growth hormone and insulin secretion after temporary dietary protein restriction in early life in the rat. *Pediatr. Res.* 38:747-753
 74. Pimstone BL, Becker DJ, Hansen DL 1972 Human growth hormone in protein-calorie malnutrition. In : *Growth and growth hormone*, edited by A. Pecile and E.E Müller. Amsterdam, Excerpta Medica:389-401
 75. 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 USA* 82:63-67
 76. Rao WVNG, Loffler C, Scnittger S, Hansmann I 1991 The gene for human growth hormone-releasing factor (GHRF) maps to or near chromosome-20p12. *Cytogenet Cell Genet* 57:39-40
 77. Riddel DC, Mallonee R, Phillips JA, Parks JS, Sexton LA, Hamerton JL. 1985 Chromosomal assignment of human sequences encoding arginine vasopressin-neurophysin II and growth hormone-releasing factor. *Som Cell Mol Genet* 11:189-195
 78. Campbell RM, Scanes CG 1992 Evolution of the growth-hormone-releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth regul* 2:175-191
 79. Godfrey PG, 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. *Nature Genet* 4:227-232
 80. Lin HD, Bollinger J, Ling N, Reichlin S 1984 Immunoreactive growth hormone releasing factor in human stalk median eminence. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 58:1197-1199
 81. Ling N, Esch NP, Bohlen P, Brazeau P, Wehrenberg WB, Guillemin R 1984 Isolation, primary structure and synthesis of human hypothalamic

- somatocrin: growth hormone releasing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4302-4306
82. Daikoku S, Kawano H, Noguchi M, Nakanishi J, Tokusen M, Chihara K, Nagatsu I 1986 GRF neurones in the rat hypothalamus. *Brain Res* 399:250-261
 83. 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
 84. VandePol CJ, Leidy JW, Finger TE, Robbins RJ 1986 Immunohistochemical localization of GRF containing neurones in rat brain. *Neuroendocrinology* 42:143-147
 85. Peterssenn S, Schlte H 2000 Structure and function of the growth hormone-releasing hormone receptor. *Vitam. Horm* 59:35-69
 86. Matsubara S, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Takahara J 1995 Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology* 136:4147-4150
 87. Margioris AN, Brockmann G, Bohler HC, Grino M, Vamvakopoulos N, Chrousos GP 1990 Expression and localization of growth hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid in rat placenta. In vitro secretion and regulation of its peptide product. *Endocrinology* 126:151-158
 88. Gonzalez-Crespo S, Boronat A 1991 Expression of the rat growth hormone-releasing hormone gene in placenta is directed by an alternative promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8749-8753
 89. Bagnato A, Moretti C, Ohniahi J, Frajese G, Catt KJ 1992 Expression of the growth hormone-releasing hormone gene and its peptide product in the rat ovary. *Endocrinology* 130:1097-1102
 90. Berry SA, Srivasta CH, Rubin IR, Phipps WR, Pescovittz OH 1992 Growth hormone-releasing hormone like messenger ribonucleic acid and immunoreactive peptide are present in human testis and placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 75:281-284

91. Stephanou A, Knight RA, Lightman SL 1991 Production of growth hormone-releasing hormone-like peptide and its mRNA by human lymphocytes. *Neuroendocrinology* 33:628-633
92. Bosman FT, Van Assche C, Nieuwenhuyzen Kruseman AC, Jackson S, Lowry PJ. 1984 Growth hormone-releasing factor (GRF) immunoreactivity in human and rat gastrointestinal tract and pancreas. *J. Histochem. Cytochem.* 32:1139-1144
93. Shibasaki, T, Kiyosawa Y, Masuda A, Nakahara M, Imaki T, Wakabayashi I, Demura H, Shizume K, Ling N 1984 Distribution of growth hormone-releasing hormone-like immunoreactivity in human tissues extracts. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 59:263-268
94. Frohman LA, Downs TR, Chomczynski P 1992 Regulation of growth hormone secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology* 13:344-405
95. Zeitler P, Argente J, Chowen-Breed JA, Clifton DK, Steiner RA 1990 Growth hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid in the rat hypothalamus of the adult male rat is increased by testosterone. *Endocrinology* 127:1362-1373
96. Senaris RM, Lago F, Lewis MD, Dominguez F, Scanlon MF, Dieguez C 1992 Differential effects of in vivo estrogen administration on hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin gene expression. *Neurosci Lett* 141:123-126
97. Mayo KE, Godfrey PA, Suhr ST, Kulik DJ, Rahal JO 1995 Growth hormone-releasing hormone: synthesis and signaling. In: *Recent progress in Hormone Research*, Bardin Ed, Academic Press 50:35-73
98. Bruno JF, Song J, Xu Y, Berelowitz M 1993 Regulation of hypothalamic growth hormone-releasing factor messenger ribonucleic acid expression in food-deprived rats: a role for histaminergic neurotransmission. *Endocrinology* 133:1377-1381
99. Morel G, Gallego R, Boulanger L, Ointos E, Garcia-Caballero T, Gaudreau P 1999 Restricted presence of the growth hormone-releasing

- hormone receptor to somatotropes in rat and human pituitaries. *Neuroendocrinology* 70 : 128-136
100. Abritat 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* 128:291-299
 101. 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
 102. Hashimoto K, Koga M, Motomura T, Kasayama S, Kouhara H, Ohnishi T, Arita N, Hayakawa T, Sato B, Kishimoto T 1995 Identification of alternatively spliced messenger ribonucleic acid encoding truncated growth hormone-releasing hormone receptor in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2933-2939
 103. Tang J, Lagacé G, Castagné J, Collu R 1995 Identification of human growth hormone-releasing hormone receptor splicing variants. *J. Cli. Endocrinol. Metab.* 80:2381-2387
 104. Lin C, Lin SC, Chang C-P, Rosenfield MG 1992 Pit-1 dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360:765-768
 105. Hsiung HM, Smith DP, Zhang XY, Bennet T, Rosteck Jr PR, Lai MH 1993 Structural and functional expression of a complementary DNA for porcine growth hormone-releasing hormone receptor. *Neuropeptides* 2:1-10
 106. Horikawa R, Gaylinn BD, Lyons Jr CE, Thorner MO 2001 Molecular cloning of ovine and bovine growth hormone-releasing hormone receptors : the ovine receptor is C-terminally truncated. *Endocrinology* 142:2660-2668
 107. Gaylinn BD, Lyons CE, Zysk JR, Clarke IJ, Throner MO 1994 Photoaffinity cross-linking to pituitary receptor for growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* 135:950-955

108. Segre GV, Goldring SR 1993 Receptors for secretin, calcitonin, parathroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagon-like peptide 1, growth hormone-releasing hormone and glucagon belongs to a newly discovered G-protein-linked receptor family. *Trends Endocrinol Metab* 4:309-314
109. Kowlakowski LF 1994 CGRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptor and Channels* 2: 1-7
110. Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S 1992 Functionnal expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *Neuron* 8:811-819
111. Ishihara T, Nakamura S, Toro Y, Takahashi T, Takahashi K, Nagata S 1991 Molecular cloning and expression of a cDNA encoding for secretin receptor. *EMBO J* 10:1635-1641
112. Jelinek L, Lok S, Rosenburg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, Bensch PA, Kuijter JL, Sheppard PO, Sprecher CA, O'Hara PJ, Foster D, Walker M, Chen LHJ, McKernan PA, Kindsvogel W 1993 Expression cloning and signalling properties of the rat glucagon receptor. *Science* 259:1614-1616
113. Thorens B 1992 Expression cloning of the pancreatic β cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8641-8645
114. Pisegna JR, Wank SA 1993 Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6345-6349
115. Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ, Bonner TI 1993 Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 133:2861-2870
116. Mayo KE, Gogfrey PA, DeAlmeida V, Miller T 1996 Structure, fonction, and regulation of the pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. In: *Growth hormone secretagogues*, BB Bercu and RF Walker Eds. Springer-Verlag, New-York, 53-71

117. Cotecchias S, Exum S, Caron MG, Lefkowitz RJ 1990 Regions of the α 1-adrenergic receptor involved in coupling to phosphatidyl inositol hydrolysis and enhanced sensitivity of biological function. *Proc Natl Acad Sci USA* 8:2896-2990
118. Liggett SB, Caron MG, Lefkowitz RJ, Hnatowich M 1991 Coupling of a mutated form of the human β 2-adrenergic receptor to Gi and Gs. *J Biol Chem* 266:4816-4821
119. Kjelsberg MA, Cotecchia S, Ostrowski J, Caron MG, Lefkowitz RJ 1992 Constitutive activation of the α 1 β -adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. *J Biol Chem* 267:1430-1433
120. Stephan DJ, Blumer KJ 1994 The third cytoplasmic loop of a yeast G-protein-coupled receptor controls pathway activation, ligand discrimination, and receptor internalization. *Mol Cell Biol* 14:3339-3349
121. Bouvier M, Moffet S, Loisel TP, Mouillac B, Hébert T 1994 La palmitoylation : une modification post-traductionnelle impliquée dans la régulation des voies de signalisation couplées aux protéines G. *Med Sci* 10:10-17
122. Veyrat-Durebex C, Gaudreau P 2001 Receptor-mediated internalization of growth-hormone-releasing hormone: preferential mechanisms in human GHRH-receptor-transfected BHK cells and rat pituitary. *Soumis à Endocrinology*
123. Gaylann BD, Von Kap-Herr C, Golden WL, Thorner MO 1994 Assignment of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene (GHRH-R) to 7p14 by in situ hybridization. *Genomics* 16:193-195
124. 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
125. Petersenn S, Rasch AC, Heyens M, Schulte HM 1998 Structure and regulation of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene, *Mol Endocrinol* 12:233-247

126. Petersenn S, Schulte HM 2000 Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. *Vitam Horm* 59:35-69
127. Miller TL, Godfrey PA, Dealmeida VI, Mayo KE 2000 The rat growth hormone releasing hormone receptor gene : structure, regulation and generation of receptor isoforms with different signaling properties. *Endocrinology* 140:4152-4164
- 127A. Zeitler P, Stevens P, Siriwardana G 1998 Functionnal GHRH receptor carboxyl terminal isoforms in normal and dwarf (*dw*) rats. *J Mol Endo* 21:363-371
128. Motomura T, Hashimoto K, Koga M, Arita N, Hayakawa T, Kishimoto T, Kasayama S 1998 Inhibition of signal transduction by aa splice variant of the growth hormone-releasing hormone receptor expressed in human pituitary adenomas. *Metabolism* 47:804-808.
129. Aleppo G, Moskal SF, De grandis PA, Kineman ND, Frohman LA 1997 Homologous down-regulation of growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acids levels. *Endocrinology* 138:1058-1065
130. Lasko CM, Korytko AI, Wehrenberg WB, Cuttler L 2001 Differential GH-releasing hormone regulation of GHRH receptor mRNA expression in the rat pituitary. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E626-E631
131. Horikawa R, Hellmann P, Cella SG, Torsello A, Day RN, Muller EE, Thorner MO 1996 Growth hormone-releasing factor regulates expression of its own receptor. *Endocrinology* 137:2642-2645
132. Miki N, Ono M, Murata Y, Ohsaki E, Tamitsu K, Yamada M, Demura H 1996 Regulation of growth hormone-releasing factor (GRF) receptor gene expression by GRF. *Biochem Biophys Res Commun* 224:586-590
133. Seifert H, Perrin M, Rivier JL, Vale W. 1985 Growth hormone-releasing factor binding sites in anterior pituitary membrane homogenates: modulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 117:424-426

134. Miller TL, Mayo K 1997 Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 138:2458-2465
135. Korytko AI, Cuttler L 1997 Thyroid hormone and glucocorticoid regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression. *Journal of Endocrinology* 152:R13-R17
136. Miki N, Ono M, Murata Y, Tamitsu K, Ri T, Demura H, Yamada M 1995 Thyroid hormone regulation of gene expression of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 217:1087- 1093
137. Tam SP, Lam KSL, Srivastava G 1996 Gene expression of hypothalamic somatostatin, growth hormone releasing factor, and their pituitary receptors in hypothyroidism. *Endocrinology* 137:418-424
138. Nogami H, Matsubara M, Harigaya T, Katamaya 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* 14 :4396-4401
139. Lam KSL, Lee MF, Tam SP, Srivasta G 1996 Gene expression of the receptor for growth hormone-releasing hormone is physiologically regulated by glucocorticoids and estrogen. *Neuroendocrinology* 63:475-480
140. Ono M, Miki N, Murata Y, Osaki E, Tamitsu K, Ri T, Yamada M, Demra H 1995 Sexually dimorphic expression of pituitary growth hormone-releasing factor receptor in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 216:1060-1066
141. Gaudreau P, Veyrat-Durebex C, Denis S, Alliot J Effect of aging on pituitary growth hormone-releasing factor receptor mRNA levels in male and female Wistar-Lou rats. Proc of the 28th annual meet of the Soc for Neurosci , Los Angeles, 1998 (Abstract 442.17)

142. Szabo M, Cuttler L 1986 Differential responsiveness of the somatotroph to growth hormone-releasing factor during early neonatal development in the rat. *Endocrinology* 118:69-73
143. Ho KY, Evans WS, Blizzard RM, Velduis JD, Merriam GR, Somojlik E, Furlanetto R, Rogol AD, Kaiser DL, Thorner MO 1987 Effects of sex and age on 24-hour profile of growth hormone secretion in men : importance of endogenous estradiol concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 64:51-58
144. Korytko AI, Zeitler P, Cuttler L 1996 Developmental regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression in the rat. *Endocrinology* 137:1326-1331
145. Takahashi Y, Okimura K, Yoshimura K, Kaji H, Chihara K 1995 Regional distribution of growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor mRNA in the rat brain. *Endocrinology* 136:4721-4724
146. De Los Frailes MT, Fernandez G 1992 Role of locally produced growth hormone-releasing factor in somatostatin regulation by fetal rat brain cell in culture. *Neuroendocrinology* 55:221-229
147. Zhang J, Obál F Jr, Zheng T, Fang J, Taishi P, Krueger JM 1999 Intrapreoptic microinjection of GHRH or its antagonist alters sleep in rats. *J. Neuroscience* 19:2187-2194
148. Boisvert C, C Paré, C Veyrat-Durebex, A Robert, S Dubuisson, G Morel and P Gaudreau 2002 Localization and regulation of a functional growth hormone-releasing hormone receptor in the rat kidney. *Endocrinology*, sous presse.
149. Boulanger L, Girard N, Dion I, Gaudreau P 2002 Characterization of a growth hormone-releasing factor receptor binding site in the rat renal medulla. *Peptides* 23: 43-50
150. Brazeau P, Ling N, Esch F, Bohlen P, Mougín C, Guillemin R 1982 Somatocrin (growth hormone releasing factor) in vitro bioactivity; Ca^{2+} involvement, camp mediated action and additivity of affect with PGE 2. *Biochem Biophys Res Commun* 109:588-594

151. Labrie F, Gagné B, Lefèbre G 1983 Growth hormone-releasing factor stimulates adenylyate cyclase activity in the anterior pituitary gland. *Life Sci* 33:2229-2233
152. Lewin MJ, Reyl-Desmars F, Ling N 1983 Somatocrin receptor coupled with cAMP-dependant protein kinase on anterior pituitary granules. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:6538-6542
153. Harwood JP, Crew C, Aiguilera G 1984 Actions of growth hormone-releasing factor and somatostatin on adenylyate cyclase and growth hormone release in the rat anterior pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 37:277-284
154. Reyl-Desmars F, Baird A, Zeytin FN 1985 GRF is a highly potent activator of adenylyate cyclase in the normal bovine and rat pituitary: interaction with somatostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 127:977-985
155. Hsiung HM, Smith DP, Zhang XY, Bennet T, Rosteck PR Jr, Lai MH 1993 Structure and functional expression of a complementary DNA for porcine growth hormone releasing hormone receptor. *Endocrinology* 137:2642-2645
156. Lin SC, Lin CR, Gukousky I, Lusic AJ, Sawchenko PE, Rosenfield MG 1993 Molecular basis of the *little* mouse phenotype and implications for cell-type specific growth. *Nature* 364:208-213
157. Wong AO, Moor BC, Hawkins CE, Narayanan N, Kraicer J 1995 Cytosolic protein kinase A mediates the growth hormone (GH)-releasing action of GH-releasing factor in purified rat somatotrophs. *Neuroendocrinology* 61:590-600
158. Armstrong D, Eckert R 1987 Voltage-activated calcium channels that must be phosphorylated to respond to membrane depolarization. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2518-2522
159. Nastainczyk W, Röhrkasten A, Sieber M, Rudolph C, Schächtele C, Marmé D, Hoffmann F 1987 Phosphorylation of the purified receptor for calcium channels blockers by cAMP kinase and protein kinase C. *Eur J Biochem* 169:137-142

160. Holl RW, Thorner MO, Leong DA 1988 Intracellular calcium concentration and growth hormone secretion in individual somatotropes: Effects of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 122:2927-2932
161. Kato M, Suzuki M 1989 Growth hormone-releasing factor depolarizes rat pituitary cells in Na⁺-dependant mechanism. *Brain Res* 476:145-148
162. Lussier BT, French MB, Moor BC, Kraicer J 1991 Free intracellular Ca²⁺ concentration ((Ca²⁺)_i) and growth hormone release from purified rat somatotrophs. I. GH-releasing factor-induced Ca²⁺ influx raises (Ca²⁺)_i. *Endocrinology* 128:570-582
163. Rawlings SR, Hoyland J, Masson WT 1991 Calcium homeostasis on bovine somatotrophs: calcium oscillations and calcium regulation by growth hormone-releasing hormone and somatostatin. *Cell Calcium* 12:403-414
164. Cuttler L, Glaum SR, Collins BA, Miller RJ 1992 Calcium signaling in single growth hormone-releasing factor-responsive pituitary cells. *Endocrinology* 130:945-953
165. Chen C, Vincent JD, Clarke IJ 1994 Ion channels and the signal transduction pathways in the regulation of growth hormone secretion. *Trends Endocrinol Metab* 5:227-233
166. Naumov A, Herrington J, Hille B 1994 Actions of growth-hormone-releasing hormone on rat pituitary cells: intracellular calcium and ionic currents. *Eur J Physiol* 427:414-421
167. Canocino PL, Cronin MJ, Thorner MO, Macleod RM 1983 Human pancreatic GRF stimulates phosphatidyl inositol labelling in cultured anterior pituitary cells. *Am J Physiol* 245:E587-E590
168. 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 (Lond)* 447:171-189
169. Thorner MO, Holl RW, Leong DA 1988 The somatotrope: an endocrine with functional calcium calcium transients. *J Exp Biol* 139:169-179

170. Pombo CM, Zalvide J, Gaylinn BD, Dieguez C 2000 Growth hormone-releasing hormone stimulates mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 141:2113-2119
171. Zeitler P, Siriwardana G 2000 Stimulation of mitogen-activated protein kinase pathway in rat somatotrophs by growth hormone-releasing hormone. *Endocrine* 12:257-264
172. Weindruch R, Walford RL 1988 The retardation of aging and disease by dietary restriction. Springfield IL, Charles Thomas:7-215
173. Shetty KR, Duthie EH 1995 Anterior pituitary function and growth hormone use in the elderly. *Endocrinol Metab Clin North America* 24:213-231
174. Deslauriers N, Gaudreau P, Aribat T, Renier G, Peticlerc D, Brazeau P 1991 Dynamics of growth response to growth hormone-releasing factor in aging rats: peripheral and central influences. *Neuroendocrinology* 53:439-446
175. Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J 1980 Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology* 107:1875-1879
176. Takahasi S, Gottschall PE, Quigley KL, Goya RG, Meites J 1987 Growth hormone secretory pattern in young, middle-age and old female rats. *Neuroendocrinology* 46:137-142
177. Corpas E, Harman M, Blackman MR 1993 Human growth hormone and human aging. *Endocrine Rev* 14:20-39
178. Rudman D 1985 Growth hormone, body composition and aging. *J Am Geriatr Soc* 33:800-807
179. Borst SE, Millard WJ, Lowenthal DT 1994 Growth hormone, exercise and aging, The future therapy for the frail elderly, *J Am Geriatr Soc* 42:528-535
180. Meites J, Goya RG, Takahasi S 1987 Why the neuroendocrine system is important in aging processes. *Exp Gerontol* 22:1-15

181. Carlson HE, Gillin JC, Gordon P, Snyder F 1972 Absence of sleep related growth hormone peaks in aged normal subjects and in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 34:1102-1105
182. Young VR, Steffee WP, Pencharz PB 1975 Total human body protein synthesis in relation to protein requirements at various ages. *Nature* 25 :192-194
183. Marcus R, Butterfield G, Holloway L, Gilliland L, Baylink DJ, Hintz RL, Sherman BM 1990 Effects of short-term administration of recombinant human growth hormone to elderly people. *J Clin Endocrinol Metab* 70:519-527
184. Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, Schlenker RA, Cohn L, Rudman I, Mattson DS 1990 Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med* 323:1-6
185. Martinoli MG, Ouellet J, Réhaume J, Pelletier G 1991 Growth-hormone and somatostatin gene expression in adult and aging rats as measured by quantitative in situ hybridization. *Neuroendocrinology* 5:607-615
186. Rossi GL, Bestetti GE, Galbiati E, Muller EE, Cocci D 1991 Sexually dimorphic effects of aging on rat somatotropes and lactotropes. *J Gerontol : Biol Sci* 46:B152-158
187. Sonntag WE, Hylka VW, Meites J 1983 Impaired ability of old male rats to secrete growth hormone in vivo but not in vitro in response to hpGRF(1-44). *Endocrinology* 11:2305-2307
188. Ceda G, Valenti G, Butterini U, Hoffman AR 1986 Diminished pituitary response to growth hormone-releasing factor in aging male rats. *Endocrinology* 118:2109-2114
189. Sonntag WE, Gough MA 1988 Growth hormone induced release of growth hormone in aging male rats : dependence on pharmacological manipulation and endogenous somatostatin release. *Neuroendocrinology* 4:482-488

190. Spik K, Sonntag WE 1989 Increased pituitary response to somatostatin in aging male rats : relationship to somatostatin receptor number and affinity. *Neuroendocrinology* 50:489-494
191. Morimoto N, Kawakami F, Makino S, Chihara K, Hasegawa M, Iyata Y 1988 Age related changes in growth hormone-releasing factor and somatostatin in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 47:459-464
192. De Gennaro Colonna V, Zoli M, Cocchi D, Maggi A, Marrama P, Agnati LF, Muller EE 1989 Reduced growth hormone-releasing factor (GHRH)-like immunoreactivity and GHRF gene expression in the hypothalamus of aged rats. *Peptides* 10:705-708
193. Ge F, Tsagarakis LH, Rees LH, Besser GM, Grossman A 1989 Relationship between growth hormone-releasing hormone and somatostatin in the rat : effects of age and sex on content and in-vitro release from hypothalamic explants. *J Endocrinol* 123:53-58
194. Sonntag WE, Gottschall PE, Meites J 1986 Increased secretion of somatostatin from hypothalamic neurones of aged rat in vitro. *Brain Res* 380:229-234
195. Sonntag WE, Boyd RL, Boozee RM 1990 Somatostatin gene expression in hypothalamus and cortex of aging male rats. *Neurobiol Aging* 11:409-416
196. Shimokawa I, Yanagihara K, Higami Y, Okimoto T, Tomita M, Ikeda T, Lee S 2000 Effects of aging and dietary restriction on mRNA levels of receptors for growth hormone-releasing hormone and somatostatin in the rat pituitary. *Gerontol Biol Sci* 6:B274-B279
197. Meites J 1992 Alterations in hypothalamic-pituitary function with age. In: *Endocrine function and aging*; Armbrecht HJ, Coe RM, Wongsurawat N Eds; Springer-Verlag, New York:1-12.
- 197A Panzeri G, Torsello A, Cella SG 1990 Age-related modulatory activity by a cholinergic agonist on the growth hormone response to GH-releasing hormone in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 193:301-305.

198. Muller EE, Cella SG, Rigamonti AE, Degli Uberti EC, Ambrosio MR, Cocchi D 1997 Aspects of the central nervous drive to growth hormone secretion during aging. *Aging (Milano)*9:7-8
199. Walker RF, Yang SW, Bercu BB 1991 Robust growth hormone secretion in aged female rats co-administrated GH-releasing hexapeptide (GHRP-6) and growth hormone-releasing peptide. *Life Sci* 49:1499-1504
200. Gregerman RI 1986 Mechanisms of age-related alteration of hormone secretions and actions. An overview of 30 years of progress. *Exp Gerontology* 21:345-365
201. Abribat T, Deslauriers N, Brazeau P, Gaudreau P 1991 Alterations of pituitary growth hormone-releasing factor binding sites in aging rats. *Endocrinology* 128:633-635
202. Lefrançois L, Boulanger L, Gaudreau P 1995 Effects on aging of pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites: in vitro mimicry by guanyl nucleotides and reducing agents. *Brain Res* 673:39-46
203. Robberecht P, Gillard M, Waelbroeck M, Camus JC, De Neef P, Christophe J 1986 Decreased stimulation of adenylate cyclase by growth hormone-releasing factor in the anterior pituitary of old rats. *Neuroendocrinology* 44:29-432
204. Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale WW, Rosenfeld MG, Evans RM 1985 Independent effects of growth hormone-releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314:279-281
205. Gaudreau P, Boulanger L, Morel G 1999 Axe somatotrope et vieillissement: importance du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance. *Médecine Science*, 15:VII-IX
206. Lima L, Dale'Ala A, Parenti M 1989 Replenishment of brain catecholamine stores does not restore the impaired growth hormone responsiveness to GHRH in aged rat. *Pharmacol Res* 21:87-88
207. Schlienger JL, Pradignac A, Gruenberger F 1995 Nutrition of the elderly: a challenge between facts and needs. *Hormone Res.* 43:46-51

208. Yu BP 1994 How diet Influences the aging process of the rat. Proceedings of the Society for experimental biology and medicine 205:97-105
209. Masoro EJ 1992 A dietary key to uncovering aging processes. News in physiol Sci 7:157-160
210. Schlienger JL, Pradignac A, Grunenberger F 1995 Nutrition of the elderly : a challenge between facts and needs. Hormone Res 43:46-51
211. Lane MA, Baer DJ, Rumpler WV, Weindruch R, Ingram DK, Tilmont, EM, Cutler RG, Roth GS 1996 Calorie restriction lowers body temperature in rhesus monkeys, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents. Proc Natl Acad Sci USA 93:4159-4164
212. Laganière S, Yu BP 1989 Effect of chronic food restriction in aging rats. II. Liver cytosolic antioxydants and related enzymes. Mech Ageing Dev 48:221-230
213. Lee DW, Yu BP 1990 Modulation of free radicals and superoxydase dismutase by age and dietary restriction. Age 2:357-362
214. Masoro EJ. 2000 Caloric restriction and aging : an update. Experimental Endo 35:299-305.
215. Masoro EJ. 1998 Hormesis and the antiaging action of dietary restriction. Exp Gerontol 33:61-66.
216. Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Rrolla TA. 1999 Gene expression of aging and its retardation by caloric restriction. Science 286:1679-1680.
217. Dhahbi JM, Cao SX, Tillman JB, Mote PL, Madore M, Walford RL, Spindler SR 2001 Chaperone-mediated regulation of hepatic protein secretion by caloric restriction. Biochem and Biophys Res Commun 284:335-339.
218. Han ES, Hilsenbeck SG, Richardson A, Nelson JF 2000 cDNA expression arrays reveal incomplete reversal of age-related changes in gene expression by caloric restriction. Mech Ageing and Dev 155:157-174

219. D'Costa AP, Ingram RL, Lehnem JE, Sonntag WE 1993 The regulation and mechanisms of action of growth hormone and insulin-like growth factor 1 during aging. *J Reprod. Fert.* 46:87-98
220. 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
221. Han ES, Evans TR, Lee, S, Nelson JF 2001 Food restriction differentially affects pituitary hormone mRNAs throughout the adult Span of male F344 rats. *J Nut* 131:1987-1693
222. Harel Z, Tannenbaum GS 1993 Dietary proteins restriction impairs both spontaneous and growth hormone-releasing factor-stimulated growth hormone release in the rat. *Endocrinology* 133:1035-1043
223. Olchovsky BJF, White JD, Leidy JW, Song J, Berelowitz M 1990 Influence of food deprivation in the rat on hypothalamic expression of growth hormone-releasing factor messenger ribonucleic acid by dietary protein. *Endocrinology* 127:2111-2116
224. Janowski BA, Ling NC, Giustina A, Wehrenberg WB 1993 Hypothalamic regulation of growth hormone secretion during food deprivation in the rat. *Life Sci* 52:981-987
225. Hugues JN, Enjalbert A, Moyse E, Shu C, Voirol MJ, Sebaoun J, Epelbaum J 1986 Differential effects of passive immunization with somatostatin antiserum on adenohipophysal hormone secretion in starved rats. *J Endocrinol* 109:169-174
226. Bruno JF, Xu Y, Song, Berelowitz M 1994 Pituitary and hypothalamic somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in the food-deprived and diabetic rat. *Endocrinology* 135:1787-1792
227. Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE 1994 Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrine review* 15:80-101
228. Kuhara T, Ikeda S, Onheda A 1991 Effects of intravenous infusion of 17 amino acids on the secretion of GH, glucagon and insulin in sheep. *Amer. J. Physiol* 260:E21-26

229. Roe FJ, Lee PN, Conybeare G, Kelly D, Matter B, Prentice D, Tobin G 1995 The biosure study : influence of composition of diet and food consumption on longevity, degenerative diseases and neoplasia in Wistar rats studies for up to 30 months post weaning. *Food Chem Tox* 33:1S-100S
230. Girard N, Boulanger L, Denis S, Gaudreau P. 1999 Differential *in vivo* regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor by GHRH in young and aged rats. *Endocrinology* 140: 2836-2842.
231. Bruno JF, Olchovsky D, White JD, Leidy JW, Song J, Berelowitz M 1990 Influence of food deprivation in the rat on hypothalamic expression of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 127: 2111-2116
232. Korytko AI, Cuttler L 2001 Regulation of GHRH receptor gene expression in the neonatal and adult rat pituitary. *Growth Horm IGF Res* 11: 282-288
233. Kamegai J, Unterman TG, Frohman LA, Kineman RD 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* 139:3554-3560
234. Ricketts WG, Birchenall-Sparks MC, Hardwick JP, Richardson A 1985 Effect of age and dietary restriction on protein synthesis by isolated kidney cells. *J Cell Physiol* 125:492-498
235. Ward WF 1988 Enhancement by food restriction of liver protein synthesis in the aging Fisher 344 rats. *J Gerontol Biol Sci* 43:B50-B53
236. D'Costa AP, Lenham JE, Ingram RL, Sonntag WE 1993 Comparison of protein synthesis in brain and peripheral tissue during aging: relationship to insulin-like growth factor-1 and type 1 IGF receptors. *Ann New York Acad Sci* 692:253-255
237. Gursoy E, Cardounel A, Hu Y, Kalimi M 2001 Biological effects of long-term caloric restriction: adaptation with simultaneous administration of

- caloric stress plus repeated immobilization stress in rats. *Exp Biol Med* 226: 97-102
238. Heydari AR, Wu B, Takahashi R, Strong R, Richardson A 1993 Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. *Mol Cell Biol* 13:2909-2918.
239. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250-252
240. Burguera B, Couce ME, Curran GL, Jensen MD, Lloyd RV, Cleary MP, Poduslo JF 2000 Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats. *Diabetes* 49:1219-1223
241. Guan XM, Hess JF, Yu H, Hey PJ, van der Ploeg LH 1997 Differential expression of mRNA for leptin receptor isoforms in the rat brain *Mol Cell Endocrinol* 133: 1-7
242. Shioda S, Funahashi H, Nakajo S, Yada T, Maruta O, Nakai Y 1998 Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neurosci Lett* 243: 41-44
243. Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB 1998 Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395:535-547
244. Wang ZW, Pan WT, Lee Y, Kakuma T, Zhou YT, Unger RH 2001 The role of leptin resistance in the lipid abnormalities of aging. *FASEB J* 15:108-114
245. Li H, Matheny M, Tumer N, Scarpace PJ 1998 Aging and fasting regulation of leptin and hypothalamic neuropeptide Y gene expression. *Am J Physiol* 275:E405-E411
246. Li H, Matheny M, Nicolson M, Tumer N, Scarpace PJ 1997 Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes* 46:2035-2039

247. Mooradian AD, Hurd R, Chehade J, Pun K, Haas MJ 2000 Age-related changes in plasma leptin binding activity in rats: a comparison of a simple acid-ethanol precipitation technique with column chromatography. *Proc Soc Exp Biol Med* 224: 273-277
248. Uotani S, Bjorbaek C, Tornoe J, Flier JS 1999 Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes* 48:279-286
249. Martin RL, Perez E, He YJ, Dawson R, Jr., Millard WJ 2000 Leptin resistance is associated with hypothalamic leptin receptor mRNA and protein downregulation. *Metabolism* 49:1479-1484
250. Lu H, Zhuowei W, Cai Li 2001 Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J Biol Chem* 276: 6343-6349
251. Bjorbaek C, El Haschimi K, Frantz JD, Flier JS 1999 The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 274:30059-30065
252. Shimokawa I, Higami Y 1999 A role for leptine in the antiaging action of dietary restriction: a hypothesis. *Aging (Milano)* 11:380-382
253. Barzilai N, upta G 1999 Revisiting the role of fat mass in the life extension induced by caloric restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54:B89-B96
254. Gupta G, Cases JA, She L, Ma XH, Yang XM, Hu M, Wu J, Rossetti L, Barzilai N 2000 Ability of insulin to modulate hepatic glucose production in aging rats is impaired by fat accumulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E985-E991
255. Masoro EJ 1999 Commentary on "Revisiting the role of fat mass in the life extension induced by caloric restriction. *J.Gerontol.Biol.Sci.* 54A, B97
Ref Type: Generic
256. Harrison DE, Archer JR, Astle CM 1984 Effects of food restriction on aging: separation of food intake and adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1835-1838
257. Bertrand H, Lyndt FT, Masoro EJ, Yu BP 1980 Changes in adipose mass and cellular through the adult life of rats fed ad libitum or a life-prolonging restricted diet. *J.Gerontol.* 35:827-835 Ref Type: Generic

258. Koistinen HA, Koivisto VA, Karonen SL, Ronnema T, Tilvis RS 1998 Serum leptin and longevity. *Aging (Milano)* 10:449-454
259. Palmiter RD, Erickson JC, Hollopeter G, Baraban SC, Schwartz MW 1998 Life without neuropeptide Y. *Recent Prog Horm Res* 53:163-199
260. Kieffer TJ, Heller RS, Habener JF 1996 Leptin receptors expressed on pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 224:522-527
- 260A. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P 1995 Recombinant mouse Ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546-549,
261. Lev-Ran A 1998 Mitogenic factors accelerate later-age disease : insulin as a paradigm. *Mech Ageing Dev* 102:95-103
262. Kristal BS, Yu BP 1992 An emerging hypothesis : synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions. *J Gerontol : Biol Sci* 47:B107-B114
263. Koizumi A, Weindruch R, Walford RL 1987 Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxydation in mice. *J Nutr* 117:361-367
264. Yougman L, Park JW, Kim JY, Ames BN 1992 Protein oxydation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calorie. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9112-9116
265. Laganière S, Yu B.B 1993 Modulation of membrane phospholipids fatty acid composition by age and food restriction. *Gerontology* 39:7-18
266. Pieri C 1991 Food restriction slows down age-related changes in cell membrane parameters. In Pierpaoli W, Fabris N, Eds. *Physiological Senescence and its Postponement*. New York : Ann New York Acad Sci 621:353-362
267. Chung MH, Kasai H, Nishimura S, Yu BP 1992 Protection of DNA damage by dietary restriction. *Free Rad Biol Med* 12 : 523-525

IX. ANNEXE

1. LISTE DES PUBLICATIONS-ARTICLES ORIGINAUX

1. Gaudreau P, **Robinette K**, Girard N 1999 Récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance et axe somatotrope: effet du vieillissement et de la restriction calorique de longue durée chez le rat. Bertière, M.C., Payette, H., Guigoz, Y., Vellas, B., Nutrition et vieillissement, Collection: L'année Gériologique, Serdi Edition, p.53-63.
2. Boulanger L, **Robinette K**, Gaudreau P 2001 Regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor in the aging rat. Soumis à Endocrinology.
3. **Robinette K**, Robert A, Boisvert C, Paré C, Ferland G, Gaudreau P 2001 Nutritional regulation of the pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in the aging rat: effects of central and peripheral influences. Soumis à Endocrinology.
4. Robert A., **Robinette K**, Ferland G, Gaudreau P 2001 Nutritional regulation on the leptin axis in the aging rat. Soumis à Endocrinology.
5. **Robinette K**, Robert A, Ferland G, Gaudreau P. In vitro regulation of pituitary GHRH receptor by steroid hormones. En préparation.

2. LISTE DES COMMUNICATIONS-PRÉSENTATIONS PAR AFFICHAGE

1. **Robinette K**, Boisvert C, Robert A, Paré C, Ferland G, Gaudreau P Tissue-specific regulation of growth hormone-releasing hormone receptor in the aging rat effects of a long-term caloric and proteic restriction. Peptides receptor: from gene to therapy Conference, Montréal, juillet 2001.
2. **Robinette K**, Robert A., Ferland G, Gaudreau P Régulation nutritionnelle du récepteur du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance au cours du vieillissement: effet de la restriction calorique modérée de longue durée. Troisième journée scientifique des étudiants et stagiaires du CHUM, Hôpital Notre-Dame, Montréal, décembre 2000.
3. **Robinette K**, Robert A, Ferland G, Gaudreau P Nutritional regulation of growth hormone-releasing hormone receptor in aging: effect of a long-term moderate calorie restriction. Summer neuropeptide Conference, Ste-Adèle, juillet 2000.
4. **Robinette K**, Ferland G, Gaudreau P, Régulation nutritionnelle du récepteur du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance au cours du vieillissement: effet de la restriction calorique modérée de longue durée. Congrès des stagiaires de recherche de la Faculté de Médecine et des Centres de recherche des hôpitaux universitaires affiliés de l'Université de Montréal, Palais des Congrès, Montréal, janvier 2000.
5. **Robinette K**, Nadeau L, Ferland G, Gaudreau P Régulation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance au cours du vieillissement: effet du niveau d'apport protéique optimal. Congès annuel

des étudiants et stagiaires du CHUM, Hôpital Notre-Dame, Montréal,
décembre 1998.