

2m11.2714.7

Université de Montréal

Modulation diététique et hormonale du récepteur adénohypophysaire du facteur  
de libération de l'hormone de croissance au cours du vieillissement.

par

Nathalie Girard

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

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

Février 1999

© Nathalie Girard, 1999



QH

506

454

1999

V.007

**Page d'identification du jury**

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Modulation diététique et hormonale du récepteur adénohypophysaire du facteur  
de libération de l'hormone de croissance au cours du vieillissement.

présenté par:

Nathalie Girard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Mémoire accepté le: \_\_\_\_\_

## Sommaire

Chez les humains et les rongeurs, des changements de caractéristiques et/ ou les concentrations effectives du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH-R) seraient un des facteurs initiateurs de la perte de sensibilité des somatotropes au GHRH. La réduction de la sécrétion de l'hormone de croissance (GH) qui en résulte a des conséquences importantes au niveau de la santé et de la qualité de vie des individus puisqu'elle mène à la détérioration de plusieurs organes et tissus. Nous avons donc étudié des stratégies d'interventions diététique et hormonale, chez le rat Sprague-Dawley mâle, dans le but de prévenir, retarder ou renverser les altérations subies par le GHRH-R au cours du vieillissement.

La restriction calorique modérée est considérée comme l'une des interventions anti-vieillessement les plus bénéfiques chez les mammifères. Grâce à des études de liaison avec le  $[^{125}\text{I-Tyr}^{10}]\text{GHRH}(1-44)\text{NH}_2$  dans des homogénats d'adénohypophyses, nous avons démontré qu'une restriction calorique de 40% de longue durée (dix mois), implantée à l'âge de huit mois chez le rat, contrairement à une restriction calorique de courte durée (50 jours) implantée chez le rat âgé de 16 mois, est efficace pour protéger les sites de liaison du GHRH-R des altérations qui surviennent avec l'âge. Nous avons déterminé que des changements dans les niveaux circulants de  $T_4$  libre ou totale ou des acides gras libres ne sont pas à l'origine de la protection des sites de liaison du GHRH.

D'autre part, il a été proposé qu'un traitement chronique au GHRH permet de resensibiliser les cellules somatotropes sous certaines conditions. Dans le but de comprendre les mécanismes endocriniens impliqués dans cette resensibilisation et étudier le rôle du GHRH-R, nous avons effectué un traitement de quatorze jours par voie sous-cutanée au  $\text{GHRH}(1-29)\text{NH}_2$  humain (0.5 ou 1.0 mg/kg de poids corporel/jour) chez des rats jeunes (deux mois) et âgés (18 mois). Chez les jeunes rats, un traitement avec 0.5 mg/kg permet une augmentation du nombre de sites à haute affinité du GHRH. Toutefois, une augmentation en parallèle du contenu hypothalamique en somatostatine maintient les quantités de facteur insulinaire de type 1 (IGF-1) circulantes à des niveaux normaux. Chez les jeunes rats traités avec 1.0 mg/kg, on observe une

régulation à la baisse du nombre de sites à haute affinité du GHRH ce qui le normalise comparativement aux rats témoins. A cette régulation négative s'ajoute une augmentation du contenu hypothalamique en somatostatine, il en résulte en une diminution des niveaux circulants d'IGF-1. Chez les rats âgés un traitement avec 1.0 mg/kg permet de restaurer de la classe de sites à haute affinité de GHRH-R disparue au cours du vieillissement et d'augmenter la quantité d'ARNm de GHRH-R. Ceci résulte en une normalisation des niveaux sériques d'IGF-1 à des taux similaires à ceux observés chez les jeunes rats. De plus, nous avons observé que les mécanismes de rétrocontrôle négatif semblent absents chez les rats âgés.

Finalement, les hormones thyroïdiennes ont été rapportées comme étant essentielles pour réguler différents éléments de l'axe somatotrope. Ainsi, chez les jeunes rats hypothyroïdiens (deux mois), les niveaux de GH et GHRH-R sont diminués. Au cours du vieillissement, comme les niveaux sériques de  $T_4$  sont diminués, nous avons évalué l'effet d'un traitement de quatorze jours par voie sous-cutanée à la thyroxine ( $2\mu\text{g}/100\text{g}$  de poids corporel/jour) chez des rats âgés (18 mois). Ce traitement a permis de restaurer les niveaux circulants d'IGF-1 et  $T_4$  totaux. Il a également permis de restaurer partiellement les sites de liaison du GHRH-R. Nous en concluons donc, qu'au cours du vieillissement, une diminution des niveaux circulants d'hormones thyroïdiennes est impliquée dans la perte des sites à haute et à basse affinité du GHRH-R.

## Table des matières

	page
Sommaire .....	i
Table des matières.....	iii
Liste des figures .....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des sigles et abréviations .....	ix
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 L'HORMONE DE CROISSANCE.....	2
1.2 RÉGULATION DE LA GH .....	3
1.2.1 <i>Contrôle hypothalamique de la GH</i> .....	4
1.2.2 <i>Mécanismes de rétrocontrôle de la sécrétion de la GH</i> .....	4
1.2.3 <i>Autres influences hormonales sur la sécrétion de la GH</i> .....	6
1.2.4 <i>Autres influences sur la sécrétion de la GH</i> .....	7
1.3 RÉCEPTEUR DU GHRH .....	8
1.3.1 <i>Gène du récepteur du GHRH</i> .....	8
1.3.2 <i>Régulation du gène du GHRH-R</i> .....	10
1.3.3 <i>Caractéristiques du GHRH-R</i> .....	13
1.3.4 <i>Voies de signalisation intracellulaires du GHRH-R</i> .....	15
1.4 EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR L'AXE SOMATOTROPE .....	16
1.5 EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR LE GHRH-R .....	21
2 CADRE CONCEPTUEL ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE	23
2.1 RESTRICTION CALORIQUE MODÉRÉE .....	24
2.2 TRAITEMENT CHRONIQUE AU HGHRH(1-29)NH <sub>2</sub> .....	26

2.3	TRAITEMENT CHRONIQUE À LA THYROXINE.....	27
3	MANUSCRITS .....	30
3.1	GIRARD N, FERLAND G, BOULANGER L, GAUDREAU P (1998). LONG-TERM CALORIE RESTRICTION PROTECTS RAT PITUITARY GROWTH HORMONE-RELEASING FACTOR RECEPTOR BINDING SITES FROM AGE-RELATED ALTERATIONS. NEUROENDOCRINOLOGY. 68:21-29. ....	31
3.2	GIRARD N, BOULANGER L, DENIS, S, GAUDREAU P (1998). DIFFERENTIAL <i>IN VIVO</i> REGULATION OF THE PITUITARY GROWTH HORMONE-RELEASING FACTOR RECEPTOR BY GHRH IN YOUNG AND AGED RATS. ENDOCRINOLOGY. SOUS PRESSE.....	58
3.3	GIRARD N, BOULANGER L, GAUDREAU P (1998) <i>IN VIVO</i> REGULATION OF THE PITUITARY GROWTH HORMONE-RELEASING FACTOR RECEPTOR IN AGED RATS: EFFECT OF A CHRONIC TREATMENT WITH THYROXINE. ENDOCRINOLOGY. SOUMIS .....	88
4	DISCUSSION.....	112
4.1	RESTRICTION CALORIQUE MODÉRÉE .....	1133
4.2	TRAITEMENT CHRONIQUE AU GHRH(1-29)NH <sub>2</sub> HUMAIN .....	120
4.3	TRAITEMENT CHRONIQUE À LA THYROXINE.....	1244
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	1277
6	SOURCES DOCUMENTAIRES .....	131
	Remerciements .....	x
	Annexe 1. ....	xi

## Liste des figures

	Page
<b>1. Introduction</b>	
Figure 1. Structure schématique du gène et de l'ADNc de GHRH-R chez le rat .....	8
Figure 2. L'épissage alternatif de l'ARNm du GHRH-R et les isoformes résultants .....	9
Figure 3. Séquence nucléotidique des 2 kb en amont de l'initiation de la transcription du gène du GHRH-R humain et les sites consensus identifiés .....	11
Figure 4. Structure et topologie du GHRH-R humain et son homologie avec le GHRH-R de rat .....	14
 <b>3. Articles</b>	
<b>3.1. Article intitulé: "Long-term calorie restriction protects rat pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites from age-related alterations."</b>	
Figure 1. Profil représentatif de liaison du [ <sup>125</sup> I] GHRH dans des homogénats d'adénohypophyse de rats témoins de 2 mois et 18 mois et de rats de 18 mois soumis à une restriction calorique de longue durée.....	57
 <b>3.2. Article intitulé: "Differential <i>In Vivo</i> regulation of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor by GHRH in young and aged rats."</b>	
Figure 1. Analyse autoradiographique de buvardage de type Northern de l'ARNm du GHRH-R dans l'adénohypophyse de rats de 18 mois témoins ou traités avec 1.0 mg/kg de GHRH. ....	85



Figure 2. Densités des transcrits d'ARNm du GHRH-R dans l'adénohypophyse de rats de 18 mois témoins ou traités avec 1.0 mg/kg de GHRH. .... 86

Figure 3. Profil représentatif de liaison du [<sup>125</sup>I] GHRH dans des homogénats d'adénohypophyse de rats de 2 mois témoins, 18 mois témoins ou 18 mois traités avec 1.0 mg/kg de GHRH..... 87

**3.3. Article intitulé: "*In vivo* regulation of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor in aged rats: effect of a chronic treatment with thyroxine."**

Figure 1. Analyse autoradiographique de buvardage de type Northern de l'ARNm du GHRH-R dans l'adénohypophyse de rats de 18 mois témoins ou traités avec 2 µg/kg de T<sub>4</sub>..... 110

Figure 2. Densités des transcrits d'ARNm du GHRH-R dans l'adénohypophyse de rats de 18 mois témoins ou traités avec 2 l'adénohypophyse µg/kg de T<sub>4</sub>..... 111

## Liste des tableaux

Page

### 3. Articles

#### 3.1. Article intitulé: "Long-term calorie restriction protects rat pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites from age-related alterations."

Tableau 1. Poids corporel, taille des fémurs et des tibias et concentrations sériques d'acides gras libres de rats de 2 et 18 mois: effets d'une restriction calorique de 40% de longue et de courte durée..... 53

Tableau 2. Estimé des paramètres de liaison du GHRH dans des homogénats d'adénohypophyse de rats de 2 et 18 mois: effets d'une restriction calorique de 40% de longue durée implantée à l'âge de 8 mois. .... 54

Tableau 3. Estimé des paramètres de liaison du GHRH dans des homogénats d'adénohypophyse de rats de 2 et 18 mois: effets d'une restriction calorique de 40% de courte durée implantée à l'âge de 16 mois. .... 55

Tableau 4. Concentrations sériques de  $T_4$  totale,  $T_4$  libre et IGF-1 total de rats de 2 et 18 mois: effets d'une restriction calorique de 40% de longue durée implantée à l'âge de 8 mois. .... 56

#### 3.2. Article intitulé: "Differential *In Vivo* regulation of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor by GRF in young and aged rats."

Tableau 1. Estimé des paramètres de liaison du GHRH dans des homogénats d'adénohypophyse de rats de 2 mois: effets d'un traitement de 14 jours au hGRF(1-29)NH<sub>2</sub> par voie sous-cutanée. .... 81

Tableau 2. Estimé des paramètres de liaison du GHRH dans des homogénats d'adénohypophyse de rats de 18 mois: effets d'un traitement de 14 jours au hGRF(1-29)NH <sub>2</sub> par voie sous-cutanée. ....	82
Tableau 3. Contenus hypothalamiques immunoréactifs en GHRH et SRIF et concentrations sériques d'IGF-1 total de rats de 2 mois: effets d'un traitement de 14 jours au hGRF(1-29)NH <sub>2</sub> par voie sous-cutanée .....	83
Tableau 4. Contenus hypothalamiques immunoréactifs en GHRH et SRIF et concentrations sériques d'IGF-1 total dans des rats 18 mois: effets d'un traitement de 14 jours au hGRF(1-29)NH <sub>2</sub> par voie sous-cutanée.....	84
 <b>3.3. Article intitulé: "<i>In vivo</i> regulation of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor in aged rats: effect of a chronic treatment with thyroxine."</b>	
Tableau 1. Concentrations sériques de T <sub>4</sub> et d'IGF-1 totaux et contenus hypothalamiques immunoréactifs de GHRH dans des rats de 18 mois: effets d'un traitement de 14 jours à la thyroxine par voie sous-cutanée. ....	108
Tableau 2. Estimé des paramètres de liaison du GHRH dans des homogénats d'adénohypophyse de rats de 18 mois: effets d'un traitement de 14 jours à la thyroxine par voie sous-cutanée .....	109

## Liste abrégations

ADN	:acide déoxyribonucléique
ADNc	:acide déoxyribonucléique complémentaire («cDNA»)
AMPc	:adénosine 3', 5'-mono-phosphate cyclique («cAMP»)
AP	: protéine activatrice
ARNm	: acide ribonucléique messenger
ARNt	: acide ribonucléique de transfert
CREB	: protéine de liaison de l'élément de réponse au cAMP (CRE)
DTT	: Dithiothréitol
GH	: hormone de croissance («growth hormone»)
GHRH	: facteur de libération de l'hormone de croissance («growth hormone-releasing hormone»)
GHRH-R	: récepteur du GHRH
GSH	: glutathione réduite
IGF-1	: facteur de croissance insulinique de type 1 («Insulin-like growth factor-1»)
Kb	: kilo paires de bases
KDa	: kilodaltons
NF-1	: facteur nucléaire 1
PKA	: protéine kinase A
PKC	: protéine kinase C
RT-PCR	:amplification en chaîne par une polymérase précédée d'une étape de transcription réverse («reverse transcribed polymerase chain reaction»)
SRIF	: somatostatine
T <sub>4</sub>	: thyroxine
TRE	: élément de réponse des récepteurs des hormones thyroïdiennes
TRH	: facteur de libération de la thyrotropine («thyrotropine releasing hormone»)
USF	: facteur stimulateur en amont («upstream stimulating factor»)
UTR	: région non-traduite («untranslated region»)

## 1. INTRODUCTION

## 1.1 L'hormone de croissance

L'hormone de croissance (GH) est un polypeptide linéaire de 191 acides aminés possédant deux ponts disulfures intramoléculaires. La GH est synthétisée et sécrétée par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse [Li *et al* (1945); Le Cam et Legraverend (1993)]. Une variété d'agents hormonaux et métaboliques contrôle cette synthèse et sécrétion de GH. La GH possède de nombreuses actions directes et indirectes sur les tissus périphériques dont le foie, les os, la rate, les reins et les muscles striés [Thorner *et al* (1992); Underwood et Van Wyk (1992)]. Les actions directes de GH, sur le foie, par exemple, sont médiées par la stimulation de récepteurs membranaires de la famille des récepteurs de facteur de croissance [Schander *et al* (1983); Kelly *et al* (1993)]. Les effets indirects de GH sont principalement médiés par le facteur de croissance insulinique de type-1 (IGF-1) [Isaksson OG *et al* (1988); Daughaday (1989)]. La majorité de l'IGF-1 circulant est d'origine hépatique [Lemmons *et al* (1984)] mais, il est également sécrété par de nombreux autres tissus et organes, sites d'action de GH, pour agir de façon autocrine ou paracrine. L'IGF-1 sérique circule libre ou lié à différentes protéines de liaison qui prolongent la demi-vie du peptide et contribuent à réguler sa disponibilité dans le sérum et les tissus cibles. Les actions de GH sont donc influencées au niveau périphérique par des niveaux d'IGF-1 circulant libre ou lié à ses protéines porteuses et par des effets locaux paracrines et/ou autocrines d'IGF-1.

La GH est une hormone anabolisante essentielle chez l'enfant et l'adulte. Elle influence positivement le métabolisme protéique en stimulant l'incorporation cellulaire d'acides aminés, l'accélération de la transcription et de la traduction, l'augmentation des taux de mitoses et la différenciation de certains types cellulaires. Ses effets sont particulièrement prononcés dans les os, les cartilages, le foie, la rate, le rein, le thymus, les érythrocytes du système hématopoïétique et le muscle strié [Cohicks et Clemmons (1993); Nilsson *et al* (1994); Freeman (1996)]. La GH réduit également le catabolisme protéique et favorise l'utilisation des gras comme source d'énergie par l'organisme [Rudman (1985); Bengtsson *et al* (1992); Casanueva (1992); Corpas *et al* (1993); Rubin

*et al* (1993)]. Chez l'enfant, la GH s'avère particulièrement importante pour le développement et la croissance staturale. Pour ce faire, la GH induit la formation de colonies de chondrocytes [Isaksson *et al* (1982)] et la prolifération d'ostéoblastes [Isaksson *et al* (1985); Nilsson *et al* (1986); Ernst *et al* (1988)] menant ainsi à la croissance des régions épiphyséales des os longs. De plus, l'amélioration de l'absorption intestinale de calcium et phosphate suite à l'augmentation de la production de 1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> et/ou l'augmentation de la sensibilité intestinale à la vitamine D [Van derVeen et Netelenbos (1990)] contribue à cette croissance sous l'action de la GH. Chez l'adulte, la GH joue un rôle important au niveau du maintien du métabolisme et de la masse musculaire.

## 1.2 Régulation de la GH

Chez les mammifères, la sécrétion de GH est épisodique. Elle est caractérisée par des pics de sécrétion élevés suivis de creux au cours desquels les niveaux de GH sont très faibles [Frohman et Jansson (1986)]. Un tel patron de sécrétion pourrait être nécessaire pour une induction optimale de la croissance et des autres effets métaboliques de la GH [Frohman et Jansson (1986)]. La sécrétion de cette hormone comporte, en plus, un rythme circadien qui cause une amplitude accrue des pics de sécrétion au cours du sommeil [Parller *et al* (1969); Winer *et al* (1990)]. Ainsi, la plus grande partie de la sécrétion de GH se produit au cours de la nuit chez l'humain alors que chez le rat, elle se produit plutôt le jour. Un dimorphisme sexuel caractérise également la sécrétion de GH. Chez le mammifère mâle, les pics de sécrétion de GH sont élevés et les niveaux de base très faibles. Chez la femelle, les pics de sécrétion sont plus faibles mais, les niveaux de base de GH sont plus élevés. La production et le maintien d'un tel patron exigent une régulation précise et délicate entre les éléments qui stimulent la sécrétion de GH et ceux qui l'inhibent. Un système neuro-endocrinien complexe est à l'origine de cette régulation. Il implique la participation de plusieurs neurotransmetteurs et hormones et comporte des mécanismes de rétrocontrôle négatif par des substrats hormonaux.

### 1.2.1 Contrôle hypothalamique de la GH

Deux peptides hypothalamiques contrôlent principalement la sécrétion de la GH: le facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH) et la somatostatine (SRIF). Le GHRH est un peptide de 43 ou 44 acides aminés qui stimule la synthèse et la sécrétion de la GH. La SRIF inhibe la sécrétion de GH et existe sous deux isoformes: la forme prédominante de quatorze acides aminés et la forme de 28 acides aminés présente en plus faible quantité [Reichlin (1983); Viollet *et al* (1995)].

La synthèse du GHRH s'effectue principalement dans les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus alors que celle de SRIF s'effectue surtout dans ceux du noyau périvericulaire rostral. Sous l'influence de neurotransmetteurs d'origine suprahypothalamique, le GHRH et la SRIF sont synthétisés et transportés vers les terminaisons nerveuses de l'émminence médiane [Gomez-Pan A et Rodriguez-Arno MD (1983); Ibata Y *et al* (1986)] d'où ils sont relâchés dans les vaisseaux du système porte hypophyséal [Zaborsky (1982); Gomez-Pan A et Rodriguez-Arno MD (1983); Ibata Y *et al* (1986)]. Les deux hormones sécrétées interagissent alors avec leurs récepteurs membranaires respectifs dont certains sont situés sur les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure où elles sont impliquées dans le contrôle de la sécrétion de GH [Mayo (1992); Yamada *et al* (1992)]. Les récepteurs de GHRH et SRIF appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Le GHRH induit l'activation d'une protéine G stimulatrice ( $G_s$ ) contrairement à la SRIF qui active une protéine G inhibitrice ( $G_i$ ) pour moduler la sécrétion de GH.

### 1.2.2 Mécanismes de rétrocontrôle de la sécrétion de la GH

La régulation de la sécrétion et de la synthèse de la GH par les somatotropes de l'adénohypophyse est également influencée par de nombreux mécanismes de rétrocontrôles hypothalamiques et hypophysaires. Au niveau hypothalamique, une boucle de rétrocontrôle ultracourte permet au GHRH et à la SRIF sécrétés d'inhiber leur propre synthèse et sécrétion et de stimuler la sécrétion du peptide ayant l'effet opposé. Des évidences indirectes suggèrent



l'existence de GHRH-R impliqués dans la fonction hypophysiotropique de GHRH dans le noyau arqué, périventriculaire, ventromédial et dans l'aire hypothalamique antérieure [Aguila et McCann (1991); Takahashi *et al* (1995)] et médiant des mécanismes de rétrocontrôle négatif de neurosécrétion de GHRH [Shaffer Tannenbaum (1984)]. A cet effet, Lumpkin et McDonald (1989) ont rapporté que l'injection d'un antagoniste du GHRH dans le troisième ventricule de l'hypothalamus, menait à une augmentation de la sécrétion de la GH. Ces résultats suggèrent non seulement la présence de récepteurs fonctionnels pour le GHRH au niveau hypothalamique mais également un mécanisme de rétrocontrôle négatif ultracourt. La SRIF sécrétée agit également sur les neurones sécrétoires du GHRH. Tannenbaum *et al* (1998) ont d'ailleurs récemment mis en évidence l'expression des sous-types de récepteurs Sst1 et Sst2 de la SRIF dans des neurones produisant du GHRH dans le noyau arqué. De plus, le GHRH stimule, via la production d'oxide nitrique qui diffuse jusqu'au noyau périventriculaire adjacent, la transcription et la sécrétion de SRIF [Aguila MC (1994); Matsubara *et al* (1995)].

Un mécanisme de rétrocontrôle court permet à la GH sécrétée d'agir au niveau hypothalamique pour stimuler l'expression de SRIF dans le noyau périventriculaire et inhiber la production d'ARNm de GHRH dans le noyau arqué. Il en résulte que le contenu peptidique de GHRH est réduit alors que celui de SRIF est augmenté [Frohman et Jansson (1986); Patel et Srikant (1986)]. La GH exerce aussi un effet inhibiteur direct sur l'hypophyse en inhibant sa propre sécrétion [Berelowitz *et al* (1981)]. En accord avec un tel rôle, des récepteurs de la GH ont été identifiés dans les cellules somatotropes de rat et d'humain par hybridation *in situ* et par immunocytochimie. Des ARNm du récepteur de la GH ont également été détectés dans les cellules somatotropes, lactotropes et gonadotropes du lobe antérieur de l'hypophyse. Ceci suggère un rôle comme facteur de croissance intracrine, paracrine et autocrine de différenciation et de prolifération des somatotropes et des lactotropes à partir de somatotropes primaires mais, ceci suggère également un mécanisme de rétrocontrôle de la GH sur sa propre sécrétion [Goodyear *et al* (1984); Fraser *et al* (1991); Fraser et Harvey (1992); (Minami *et al* (1993); Mertani *et al* (1995)].

Finalement, une boucle de rétrocontrôle longue, permet à l'IGF-1 périphérique d'inhiber la sécrétion de GH grâce à des récepteurs spécifiques au niveau de l'hypophyse. Berelowitz *et al* (1981), Morita *et al* (1987), Hartman *et al* (1993), Becker K *et al* (1995) ont montré qu'IGF-1 exerce un effet direct sur la sécrétion hypothalamique de SRIF qui est stimulée *in vitro* par IGF-1 alors que celle de GHRH est inhibée [Becker *et al* (1995)].

### 1.2.3 Autres influences hormonales sur la sécrétion de la GH

Outre les hormones de l'axe somatotrope, plusieurs hormones peuvent influencer l'expression et la sécrétion de la GH. Elles peuvent agir directement sur la GH ou indirectement, par l'intermédiaire de GHRH ou SRIF. Les hormones thyroïdiennes stimulent directement la transcription du gène de GH grâce à la présence d'éléments de réponses (TRE) pour ses récepteurs sur ce gène [Evans *et al* (1982); Casanova *et al* (1985); Glass *et al* (1987); Koenig *et al* (1987); Şap *et al* (1990)]. L'insuline, tant qu'à elle, exerce un effet négatif sur l'expression du gène de la GH [Yamashita et Melmet (1986); Ahmad *et al* (1992)]. Les androgènes, dont la testostérone et le 17- $\beta$ -oestradiol, ont plutôt un effet indirect sur la sécrétion de la GH. En effet, ils agissent au niveau hypothalamique pour inhiber la sécrétion de SRIF, ce qui résulte en une augmentation de celle de la GH [Devesa *et al* (1991); Frohman *et al* (1992); Hartman *et al* (1993)]. Ainsi, il a été rapporté que l'administration d'androgènes améliore la sécrétion de GH chez les garçons péripubertaux [Martin *et al* (1968); Illig et Prader (1970); Rosenfield et Furlanetto (1985)] et chez les hommes souffrants d'hypogonadisme hypogonadotrope [Liu *et al* (1987)]. L'action des glucocorticoïdes sur la sécrétion de GH est complexe. L'effet modulateur qu'ils exercent *in vivo* semble influencé par la concentration de glucocorticoïdes présente. Ils agissent à la fois directement au niveau de la sécrétion et de la transcription de la GH mais également sur la sécrétion de SRIF, de GHRH et la synthèse de GHRH-R [Tushinski *et al* (1977); Moore *et al* (1985); Seifert *et al* (1985); Delitala *et al* (1988); Desava *et al* (1992); Frohman *et al* (1992); Mehls *et al* (1993)]. Chez l'homme, un traitement avec des doses pharmacologiques de glucocorticoïdes résulte une suppression de la réponse

hypophysaire en GH par GHRH [Kaufman *et al* (1988)]. Par contre, des excès modérés de glucocorticoïdes augmentent la sécrétion pulsatile de GH chez des hommes normaux [Veldhuis *et al* (1992)].

#### 1.2.4 Autres influences sur la sécrétion de la GH

Le status physiologique a un impact important sur la sécrétion de la GH. Certains états métaboliques tels que le diabète mellitus de type I mal contrôlé, l'hyperglycémie [Press *et al* (1984); Masuda *et al* (1985)], l'anorexie nerveuse, le jeûne et les états de dénutrition protéique résultent, chez l'homme, en une sécrétion augmentée de GH. A l'inverse, l'obésité supprime la sécrétion de la GH [Tannenbaum *et al* (1979); Rudman *et al* (1981); Williams *et al* (1984); Quabbe (1985); Frohman et Jansson (1986); Martin et Reichlin (1987); Dieguez *et al* (1988); Press (1988); Strobl et Thomas (1994)]. Il a également été démontré que la sécrétion de GH est augmentée de façon transitoire après l'exercice [Hagberg *et al* (1988)] et en réponse à certains agents de stress [Delitala *et al* (1987)]. Finalement, la dépression réduit les taux basaux de GH mais, stimule sa sécrétion [Mendlewicz *et al* (1985)].

En résumé, le contrôle de la sécrétion de GH fait intervenir de nombreux participants. Dans un premier temps, il implique les peptides hypothalamiques GHRH et SRIF. Dans un second temps, des mécanismes de rétrocontrôle aux niveaux hypothalamiques, hypophysaires et périphériques sont mis à contribution. Dans un troisième temps, plusieurs autres hormones du système endocrinien vont agir sur la GH et/ou les différentes composantes de l'axe somatotropes. Finalement, l'état physiologique jouera également un rôle déterminant dans la régulation de la GH.

### 1.3 Récepteur du GHRH

#### 1.3.1 Gène du récepteur du GHRH

Le GHRH-R a été initialement cloné chez le rat et l'humain à partir de banques d'acides déoxyribonucléiques complémentaires d'hypophyses (ADNc) par Mayo (1992) et Gaylinn *et al* (1993) respectivement. L'identité de séquence entre les deux espèces est d'approximativement 80%. Hsiung *et al* (1993) et Lin *et al* (1993) ont rapporté, peu après, la séquence du GHRH-R chez le porc et la souris.

Le gène de GHRH-R de rat contient 14 exons de petites tailles et relativement uniforme.

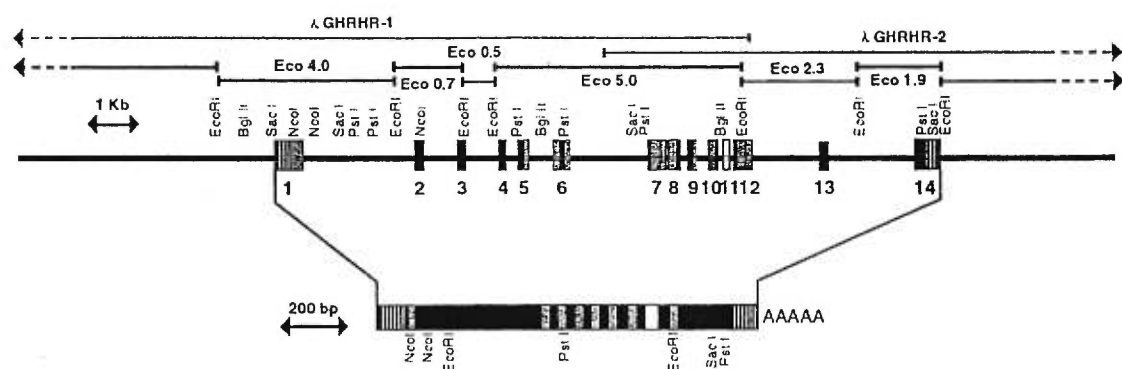


Figure 1: Structure schématique du gène et de l'ADNc de GHRH-R chez le rat. Tiré de Mayo KE *et al* (1996). Les régions plus claires représentent les sept domaines transmembranaires. Les exons sont représentés par des boîtes numérotées. L'exon blanc représente l'exon qui peut subir l'épissage alternatif.

Grâce à un site d'épissage alternatif, deux transcrits d'ARNm, respectivement de 2.5 et 4.0 kb, ont été décrits dans l'hypophyse, le placenta, les ovaires et les testicules [Mayo *et al* (1996)]. La forme la plus courte code pour 423 acides aminés et correspond au récepteur fonctionnel. Elle constitue la forme prédominante. Il est à noter que Mayo a rapporté la présence d'ADNc codant pour une protéine qui comporte une insertion de 41 acides aminés en position

325 du récepteur soit à la jonction d'un intron-exon. Une protéine correspondante n'a toutefois pas été détectée jusqu'à présent.

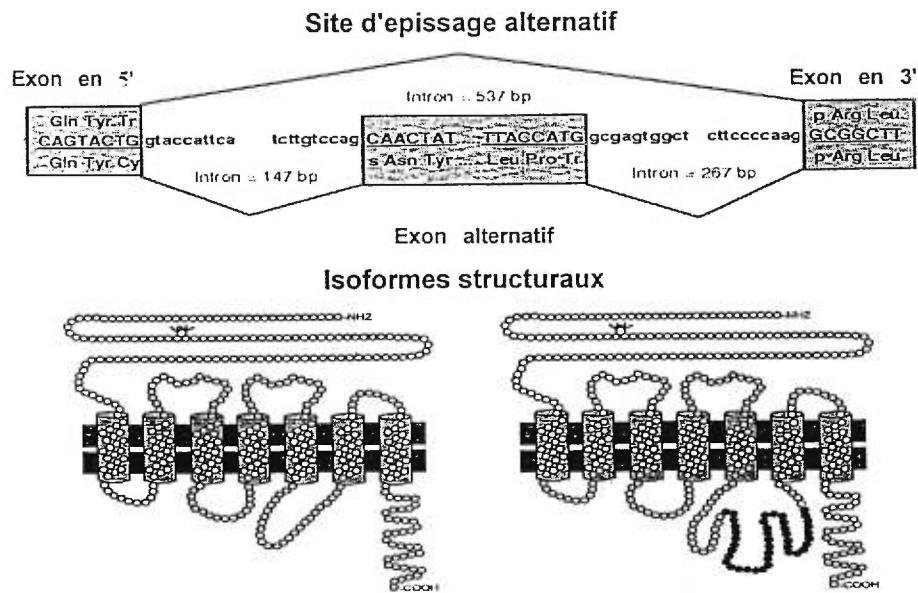


Figure 2. L'épissage alternatif du ARNm du GHRH-R et les isoformes structureux résultants. Tiré de Mayo et al (1996). La boucle noire dans l'isoforme de droite représente l'insertion de 41 acides aminés.

De même, aucune protéine correspondante au transcrit de 4.0 kb n'a été détectée. L'identification de sites consensus pour différents facteurs de transcription et d'éléments de régulation dans la région promoteur de ce gène fait présentement l'objet d'étude.

Chez l'humain, des études ont associé le gène de GHRH-R au bras court du chromosome 7 (7p14 et 15) [Gaylinn *et al* (1994); Wajnrajch MP *et al* (1994)]. Le gène de GHRH-R est constitué de 13 exons répartis sur plus de 12 kb

[Maheshwari et Baumann (1997)]. 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 acides aminés de la protéine [Petersenn *et al* (1998)].

Récemment, Petersenn *et al* (1998) ont déterminé que le promoteur ne contient pas de boîtes TATA, CCAAT ou d'autres séquences initiatrices consensus. Seul un motif de boîte GC localisé en -210 est présent. Par analyse de protection à la ARNse (Rnase protection analysis), ils ont trouvé plusieurs sites mineurs et un site majeur d'initiation de la transcription à 40 nucléotides en amont du codon initiateur ATG.

### 1.3.2 Régulation du gène du GHRH-R

Chez le rat, des études sont présentement en cours pour déterminer la structure du promoteur du gène de GHRH-R et les séquences impliquées dans la régulation de ce gène. Chez l'humain, Petersenn *et al* (1998) ont fait l'étude d'une région de 2 kb en amont du site de l'initiation de la transcription.

Cette région contient deux sites présumés de liaison pour les séquences activatrices (« enhancer ») AP-1 ( activator protein-1) aux positions -991 et -609 et AP-4 à la position -28. 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 décrit. Des sites de liaison pour des facteurs de transcription tissu-spécifique tels des facteurs possédant un domaine Pou, comme Pit-1, ont été identifiés aux positions -1009, -799, -127, et Brn-2 à la position -700. L'identification de ces sites appuie les travaux de Lin *et al* (1992 et 1993) qui décrivent un rôle pour le facteur de transcription Pit-1 dans l'expression de GHRH-R. La région promotrice contient également des motifs consensus correspondant à des éléments inductibles par la machinerie impliquée dans la transduction des signaux extracellulaires. Par exemple, on retrouve un motif CREB (cAMP-response element (CRE)-binding protein) à la position -483 et NF- $\kappa$ B à -429.

-2000 TAGCAA GTGATGGAGG CAGAATTGA ATCCTGAGTG TATACAGAAT TAGCTAGAGA

-1920 AGACAGCTCC ATGAAGAAAC AGGCCTGCAG GGATCCTTGG GGAACATGTA CAGTTAGAGC AGGGTTTTTC AGCCTTGGTC

-1840 TTATTGATCT TTGAGACTGG ATAATTTCTTC ATATGATCAA GGGTGGGGGC ATCCTGTGCA TTGTAGATGC TTAATAGCAT

-1760 CCCTGGTCTC TACTCATTCG ATACCAGGAG CAACTCACCA CCCCACTCCT CACCCTAACT CCTAGTTTTT ATTTTGATAA

-1680 CAAAAATGT CTCAGACAT TGCCAAATGT CCCCTAGGGA AGCAAAATG CTCAGGTTA GGAACCACTC GTTTAGACAG

-1600 TAATAACTAT TATTAATTAT CACTATCAAC CTCAAATAIT AGCCATCATT AATGCTAATG ATATTGATGC TAATTATCAA

-1520 CAGTGATTAA TCGTAAGACT TTTTTTTCCT GGTGCTGTG CTTCCTTGTGA GCTGAGGAAC AGAAGGTTCT AGCTTTCCTT

-1440 TCAAGTTATA CCTTTTCAGC ACTCTGCTTT TCCACCCCGT GAGCTCTCAG CCTGCCAAGA GAGGAGCTCT GCTCTCCCTT

USF

-1360 AAAAGTGTA AAGTGTGCAG AGCTCTGTGT GGCATGCTGC TTGCACCCAT TTCACAGTTA AGCTCATGAA AACACTTGCA

Oct-1

-1280 CAGGATAGGA GGGTTTTGGA GCTTGGGGTG GTTCATGTTT TTGTTTCGAA ATATTTTTTT TTCAGTATTT TGTGACAAT

-1200 GAAGAAAAAT GAAAAATAA ACCCCTGCTG ATGTCAAAAT AAGCCATAA TCCAGATGTA GCGGGGGCGA GGAGCCTTCA

-1120 ACATTCATGA TGTGATCGGG CTGTAAACAT GTCTGGTGT CTAGCACGCA GCCCAGCAGC TTCTGTGAGT GGAGACGTGC

-1040 ACACAAACAT CAGGACCTGT CGGCTACTGG GATATTCAGG TCTTTCAGAG GTGACATCTT TGACATTCCA AAGTGCTGTG

Pit-1 AP-1 Oct-1

-960 CAAGATCCAG GGGCATTAG AACACTGTCT TTAGCCTGGC CAATGGAGAC CCTGCATTTT AAAGTCTAAA ACTATAATAA

-880 AAGTGACCAG GCAATGAATG TTCAATATAG TTTGCTGTGT AAGTCTTCTC ATTTCTGCTA CTGATGAGAG TTGTCTCTCC

ER

-800 CCTATTCAG ATGGCTTGAC CCATGAATCC TTCACAAGGC TTCACAACCA CCTCATTTTC CCCTTTTGGC GTGAGAGTTT

Pit-1

-720 TGGAGAGATT TTGATAAGCC CCCATGTGAA ATCCAGAGCC TTGATGCTTG CAGCTTCAGC TCACCATCCA GGCCAGCGTC

Brn-2

-640 CTGCCCAGT AAAGGCCCA GGTCTTGCTG AAATGACACA TTCTTGCCCA GCCCATGCCA GTGCTTACAG ATCATACTTC

AP-1

-560 CTTTCCTAAG ACCATTCCAA CCTCCATCT CCACTAATAC CATACCCCTC CCCTTCCCA CCAGTTCCAC ACAGCTCTGA

-480 CCTCATCTC CAGCCCTGTG GATGAGGCTA GGAGCACA TCAAATAACC TGGGAGCTTC GCAAGGGCAG GCCCAGGTCC

CREB Oct-1 NF-kappaB

-400 CCTTCCTAAT CTTTAAGATC CCATCAATCT GAGGGGTCAC TCCAAATGATG GCCACCAGAG ACTGGGGCTT AGAGAAGAAA

NF-1

-320 GTGGTAGAGA ATATTGACCA AGTGACTGT GGCTGTCAAC TCTTGGGCC CTTGCTATCA GGACAGACAC ACAAGCAGAC

ER NF-1

-240 TTATAGCCAG AGTAGAAGGT GATGAGGGTG GGGCTCAGC TCCTGCCTGC TGGAAACAGA GTCCCACCTC AGGGTCAATG

SP1

-160 CTGAGCTGGG CAGGTGTCTT GCAATCCTGG TGAATATCCA GCGTCTGTG TCCCTTGGC TAGCTCCTGC CTATGCAAAC

Pit-1 NF-1

-80 AGCCACCTGA GAAGGGGAAG CAGAGGGTGC GGTGAAACG GCTGTGTCAG GGGACACCAG GCGAAGGAAG ATAGCTAAGG

AP-4

+1 CTTACTGAGG CTGGTGGAGG GAGCCACTGC TGGGCTCACC ATGGACCGCC GSATGTGGGG GGCCACGTC TTCTGCCTGT

Figure 3. Séquence nucléotidique en amont de l'initiation de la transcription du gène de GHRH-R humain et les sites consensus identifiés. Le début de la transcription est identifié par la position +1. Tiré de Petersenn *et al* (1998).

Le promoteur du GHRH-R possède également des éléments de réponse pour certaines hormones dont les glucocorticoïdes aux positions -1456 et -1181, le  $\beta$ -oestradiol entre -202 et -108 et l'œstrogène entre -317 et -888. [Petersenn *et al* (1998)]. Cette étude supporte les résultats rapportés par Seifert *et al* (1985), montrant que, dans des homogénats d'hypophyses de rats adrenalectomisés, une réduction du nombre de sites de liaison au GHRH était observée. Cette réduction reflète une diminution des ARNm du GHRH-R [Miller et Mayo (1997)]. Lorsque des rats adrenalectomisés ou intacts sont traités aux glucocorticoïdes (dexaméthasone), une augmentation du nombre de sites de liaison pour le GHRH est alors observée [Seifert *et al* (1985)]. De même, *in vitro*, une carence en glucocorticoïdes de cellules hypophysaires en culture primaire, provoque une diminution du nombre de sites de liaison au GHRH [Seifert *et al* (1985)]. Un traitement des cellules en culture à l'hydrocortisone ou la dexaméthasone augmente les niveaux d'ARNm de GHRH-R [Korytko et Cuttler (1997); Miller et Mayo (1997)].

Miki *et al* (1995) et Korytko et Cuttler (1997) ont détecté, dans une culture primaire d'hypophyses de rats traités avec  $T_3$  pour une période de 24 heures une augmentation marquée des niveaux d'ARNm de GHRH-R. Toutefois, en transfection transitoire, Petersen *et al* (1998) n'ont pu détecter d'induction de l'activité promotrice du gène de GHRH-R avec les hormones thyroïdiennes. Il est donc possible que les actions décrites par Miki *et al* soient des effets indirects ou que la région du promoteur comportant les TRE se situe en amont du segment caractérisé par Petersen *et al*. Une autre explication des résultats de Petersen *et al* est que le système hétérologue utilisé était déficient en facteur de transcription tissu-spécifique tel que Pit-1, par exemple.

Le GHRH exerce également une régulation au niveau de son récepteur. En culture, Aleppo *et al* (1997) ont déterminé qu'un traitement de quatre heures avec GHRH résulte en une diminution, concentration-dépendante, des niveaux d'ARNm de GHRH-R (jusqu'à 54%). Horikawa *et al* (1996) ont démontré, qu'en immunoneutralisant le GHRH chez le rat nouveau-né, les niveaux d'ARNm de GHRH-R sont diminués. Par contre, Miki *et al* (1996) ont rapporté qu'une immunoneutralisation du GHRH chez le jeune rat augmente les niveaux



d'ARNm de GHRH-R. En leur administrant du GHRH synthétique, il est possible de restaurer l'expression du récepteur à des niveaux similaires à ceux des animaux témoins. Malgré les oppositions apparentes des résultats, qui peuvent être dus à l'âge et au stade développemental des animaux ou à l'efficacité de l'immunoneutralisation, il demeure que GHRH est important pour maintenir une expression optimale de son récepteur.

### 1.3.3 Caractéristiques du GHRH-R

Chez l'humain et le rat, la taille moléculaire prédite, à l'aide de l'ADNc, du GHRH-R est de 47 kDa. Par réticulation chimique, Gaylinn *et al* (1994) ont déterminé que la taille du GHRH-R hypophysaire glycosylé est de 55 kDa et de 45 kDa sous sa forme déglycosylée. Chez le rat, par immunobuvardage de type Western, Boulanger *et al* (1998) ont évalué que la forme déglycosylée du récepteur est de 47 kDa et Fujinaka Y *et al* (1996) ont déterminé que la molécule glycosylé a un poids apparent de 54 kDa.

Le GHRH-R appartient à la sous-famille sécrétine-glucagon-VIP des récepteurs couplés aux protéines G [Mayo (1992); Gaylinn *et al* (1993); Hsiung *et al* (1993); Lin *et al* (1993)]. La similarité en acides aminés entre le GHRH-R et les autres membres de cette famille est de 70% dans les régions transmembranaires. Elle est plus faible dans les régions C et N-terminales qui sont des régions impliquées dans la reconnaissance du ligand et le couplage à la protéine G. L'identité totale avec les autres membres de cette famille est de 35-40%.

Les récepteurs couplés aux protéines G sont caractérisés par sept hélices transmembranaires liées par trois boucles intracytoplasmiques et trois boucles extracellulaires. Le segment N-terminal du GHRH-R comporte 150 acides aminés et est vraisemblablement situé à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Il contient six résidus cystéine et un site potentiel de glycosylation à lien carboxamide (N) situé sur Asn<sup>50</sup>. Ce domaine du récepteur permet la reconnaissance et la liaison au ligand. En extrapolant ce qui a été démontré pour d'autres membres de cette superfamille de récepteurs, il est

probable que la troisième boucle cytoplasmique de 25 acides aminés de GHRH-R ait un rôle multifonctionnel. Elle serait impliquée, grâce à son interaction avec la protéine G et ses sites potentiels de phosphorylation, dans des processus d'activation, de désensibilisation, d'internalisation et de spécificité du ligand [Cotecchia *et al* (1990); Ligget *et al* (1991); Kjelsberg *et al* (1992); Stephan et Blumer (1994)]. Deux résidus cystéine, présents dans chacun des 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> domaines extracellulaires pourraient être impliqués dans des ponts disulfures. Ces ponts seraient importants pour le repliement optimal du récepteur et pour assurer une liaison à haute affinité au GHRH. Finalement, tel que démontré pour le récepteur  $\beta$ -adrénergique [Bouvier *et al* (1994)], un résidu cystéine présent dans le domaine C-terminal du récepteur pourrait être palmitoïlé et également impliqué dans des processus de désensibilisation du récepteur lors de la liaison du récepteur à son ligand.

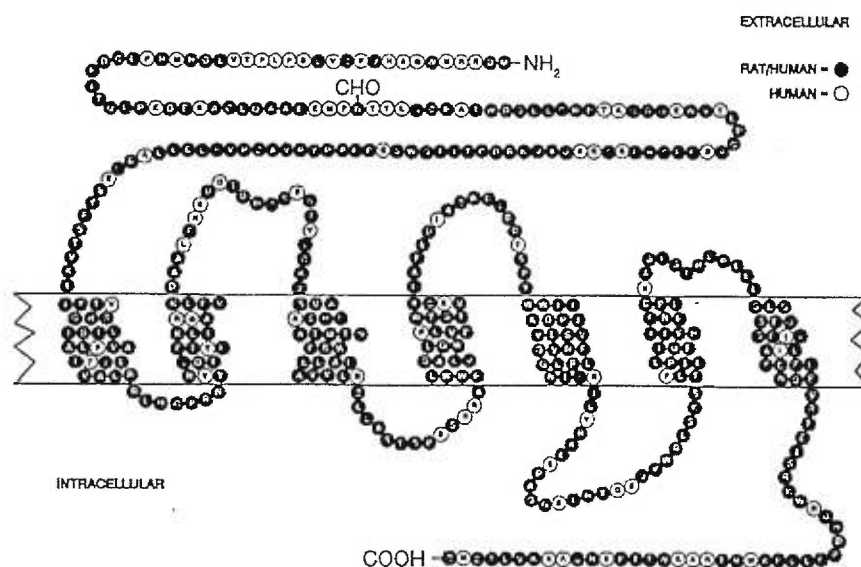


Figure 4. Structure et topologie du GHRH-R humain et son homologie avec le GHRH-R de rat. Tiré de Andreasen *et al* (1996). L'identité avec le GHRH-R est illustrée par les cercles noirs. CHO représente un site potentiel de glycosylation avec un lien carboxamide (N).

### 1.3.4 Voies de signalisation intracellulaires du GHRH-R

Suite à la liaison de GHRH à son récepteur, la réponse des cellules somatotropes se fait en deux temps. Nakagawa *et al* (1995), par une étude stéréologique, a démontré qu'une réponse rapide et maximale est détectée deux minutes après l'injection de GHRH sous la forme d'une augmentation de la fréquence d'exocytose des granules sécrétoires. Par la suite, la fréquence d'exocytose diminue. La réponse lente est enclenchée cinq minutes après l'injection et prend 60 minutes pour se compléter. Au cours de cette période, la densité du volume des granules augmente pour retourner graduellement à des niveaux basaux. Donc, la réponse rapide des somatotropes au GHRH permet la sécrétion de la GH alors que la réponse lente a pour but de renflouer le contenu cellulaire en GH. La réponse lente induit également la synthèse de GHRH-R et la prolifération des somatotropes permettant une amplification du signal initial.

Plusieurs voies de signalisation intracellulaire sont activées pour produire les effets du GHRH. Le système adénylyl cyclase-adénosine monophosphate 3',5'-cyclique (AMPC)-protéine kinase A (PKA) [Brazeau *et al* (1982); Labrie *et al* (1983); Lewin Wt *et al* (1983); Harwood *et al* (1984); Reyl-Desmars *et al* (1985); Thorner *et al* (1988); Frohman *et al* (1986); Mayo (1992); Gaylinn (1993); Hsiung *et al* (1993); Lin *et al* (1993)] et le système  $Ca^{2+}$ -calmoduline joue des rôles prédominants [Canocino *et al* (1983); Armstrong *et al* (1987); Thorner *et al* (1988); Lussier *et al* (1990); Lussier *et al* (1991); Kato *et al* (1992)] dans la transduction et l'amplification du signal. Le système inositol phosphate-diacylglycerol-protéine kinase C (PKC) est également impliqué dans la réponse au GHRH mais à un degré moindre [Brazeau *et al* (1982); Canocino *et al* (1983); Labrie *et al* (1983); Harwood *et al* (1984); Reyl-Desmars *et al* (1985); Frohman *et al* (1986); ); Armstrong *et al* (1987); Thorner *et al* (1988); Lussier *et al* (1990); Lussier *et al* (1991); Kato *et al* (1992)].

Lors de la liaison du GHRH à son récepteur, la sous-unité  $G_{s-\alpha}$  stimule l'activité adénylate cyclase. Il en résulte la production d'AMPC de façon concentration-dépendante. Cette augmentation d'AMPC intracellulaire permet la phosphorylation de la PKA cytosolique [Wong *et al* (1995)]. Cette dernière peut

alors phosphoryler différentes cibles. Parmi ces cibles, on retrouve des canaux calciques sensibles au voltage situés dans la membrane plasmique. La phosphorylation de ces canaux entraîne une dépolarisation de la membrane et un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire [Armstrong *et al* (1987); Nastainczyk *et al* (1987); Holl *et al* (1988); Kato *et al* (1989); Lussier *et al* (1991); Rawlings *et al* (1991); Cuttler *et al* (1992); ); Chen *et al* (1994); Naumov *et al* (1994); Wong *et al* (1995)]. La calmoduline lie alors le  $\text{Ca}^{2+}$  pour former un complexe actif. Celui-ci active la protéine kinase calmoduline-dépendante qui, en modifiant les propriétés des membranes de vésicules sécrétoires et/ou la fonction de peptides à la surface cytoplasmique des membranes cellulaires, permet l'exocytose de la GH.

La réponse au GHRH implique également la stimulation de la transcription et la traduction des gènes de GH et GHRH-R. Le facteur de transcription CREB est à l'origine de cette augmentation de transcription [Mayo *et al* (1996)]. Toutefois, son action directe avec les gènes de la GH et GHRH-R ou en stimulant la transcription du facteur de transcription hypophysaire Pit-1 [Soto *et al* (1995)] n'est pas complètement élucidé. Pit-1 et/ou d'autres facteurs pourraient alors activer la transcription du gène de la GH et du GHRH-R [Lin *et al* (1992); Tuggle et Trenkle (1996)].

#### **1.4 Effet du vieillissement sur l'axe somatotrope**

Le vieillissement biologique peut être caractérisé par une défaillance et une perte de coordination entre plusieurs systèmes de contrôle et d'intégration. Ceci mène au dérangement de l'homéostasie des cellules et organes et à la perte de l'adaptabilité de l'organisme face aux défis internes et externes [Weindruch et Walford(1988)].

Au cours du vieillissement, les concentrations circulantes de GH et, par conséquent, celle d'IGF-1, diminuent [Rudman *et al* (1981); Clemmons et Van Wyk (1984); Pavlov *et al* (1986); Rudman *et al* (1986); Ho *et al* (1987); Vermeulen (1987); Hoffman *et al* (1993)]. Ainsi, chez les hommes en santé, il a été démontré qu'entre les âges de 21 et 71 ans, les concentrations circulantes

de GH diminuent de 14% à chaque décennie et la demi-vie de GH chute de 6% [Iranmanesh A *et al* (1991)]. Une réduction du nombre et de l'amplitude des pics de sécrétion spontanée de GH au cours du sommeil a également été rapporté chez des adultes de 50 ans et plus [Carlson *et al* (1972)]. Chez le rat, des réductions des niveaux de GH et d'IGF-1 sont également observées sans toutefois que le patron de sécrétion ne soit affecté [Sonntag *et al* (1980)].

Il existe plusieurs similarités entre les altérations des structures et fonctions qui se produisent au cours du vieillissement et celles qu'on retrouve chez les patients adultes déficients en GH. Parmi celles-ci, on retrouve une diminution de la fonction rénale, une diminution du taux de divisions cellulaires, une réduction de la masse et densité osseuse, des déficits dentaires, une diminution de l'absorption de  $Ca^{+2}$  et une diminution du taux de synthèse protéique corporel globale [Young *et al* (1975)]. Une réduction du pourcentage de masse musculaire corporelle et une augmentation du pourcentage de la masse lipidique corporelle sont également retrouvées chez les patients déficients en GH et les humains âgés. En effet, chez l'humain, la masse musculaire corporelle chute d'environ 27% chez les hommes et 15% chez les femmes entre les âges de 25 et 70 ans [Forbes et Reina (1970)]. A l'inverse, la masse adipeuse augmente de 18% chez les hommes et de 12% chez les femmes entre les âges de 18 et 85 ans [Novack LP (1972)]. La résultante de toutes ces modifications est l'atrophie des muscles squelettiques, du foie, du rein, de la rate, de la peau et des os. La diminution de l'activité physique et/ou une augmentation de l'absorption d'hydrates de carbone ne peuvent entièrement expliquer ce phénomène [Dude et Ensick (1977); Lye (1985)]. Par contre, Walker *et al* (1994) ont établi que la diminution de sécrétion de GH au cours du vieillissement contribue, du moins en partie, à une augmentation progressive de la concentration du cholestérol plasmatique. Cette tendance peut être partiellement renversée par un traitement avec des sécrétagogues de GH. En raison de ces évidences, il a été proposé qu'une sécrétion déficiente de GH pourrait être un des « pacemakers » du vieillissement [Rudman (1985)].

Une thérapie de remplacement de la GH, chez des personnes âgées, permet une amélioration de leur balance azotée [Binnerts *et al* (1988); Marcus R *et al*

(1990)], une augmentation de leur masse musculaire et une diminution de leur masse corporelle adipeuse [Rudman *et al* (1990)]. De plus, Rosén *et al* (1995) ont rapporté qu'un traitement à la GH augmentait la masse et la densité minérale osseuse.

Chez les rats mâles et femelles âgés, le patron de sécrétion spontanée de la GH est réduit du tiers comparativement à celui observé chez les jeunes rats [Sonntag *et al* (1980); Takahashi *et al* (1987)]. Une amplitude et une durée réduites des pics de sécrétion de la GH cause cette diminution [Sonntag *et al* (1980); Takahashi *et al* (1987); Sonntag et Meites (1988)]. Les altérations de la sécrétion de la GH ont pour conséquence des taux circulants d'IGF-1 diminués [Fiorini et Roberts (1980); Takahashi et Meites (1987); Deslauriers *et al* (1989)].

Les premières évidences de modification de la sécrétion de la GH apparaissent à l'âge de douze mois. *In vivo* et *in vitro*, Deslauriers *et al* (1991) ont démontré, chez le rat mâle, que la sécrétion maximale de GH stimulée par GHRH est diminuée. De plus, chez ces animaux, les niveaux de transcription de la GH sont légèrement diminués (d'environ 15%) sans que le contenu immunoréactif en GH ne soit affecté [Deslauriers *et al* (1991)].

Chez le rat sénescence de 18 et 20 mois, le patron de sécrétion épisodique de GH n'est pas affecté. Par contre, la réponse induite par GHRH *in vivo* et *in vitro* est sévèrement déprimée et la réponse dose-dépendante est absente [Sonntag *et al* (1983); Ceda *et al* (1986); Cocchi *et al* (1986); Sonntag et Gough (1988); Spik et Sonntag (1989); Deslauriers *et al* (1991)]. Ces phénomènes sont la conséquence de niveaux d'ARNm de GH diminués de 50% [De Gennaro Colonna *et al* (1989); Martinoli *et al* (1991)] et de contenus hypophysaires en GH réduits de 30% [Sonntag *et al* (1980); Morimoto N *et al* (1988); De Gennaro Colonna *et al* (1989); Deslauriers *et al* (1991)]. De plus, des études immunochimiques ont démontré une réduction du nombre et de la taille des cellules GH-immunoréactives [Rossi *et al* (1991)]. Toutes ces modifications ont un impact négatif sur la quantité de GH sécrétée à chaque épisode. Toutefois, la sécrétion basale de GH a été rapportée augmentée de façon marquée, inchangée ou diminuée [Sonntag *et al* (1983); Ceda *et al* (1986); Sonntag et

Gough (1988); Spik et Sonntag (1989)]. Chez le rat de 18 et 20 mois, ces réductions de la sécrétion spontanée ou induite, de même que la transcription et les contenus en GH réduits peuvent être imputés à une diminution de 49 à 65% de la production de d'AMPc stimulée par GHRH [Ceda (1986); Robberecht P *et al* (1986); Parenti *et al* (1987)]. Cette diminution de production d'AMPc n'est toutefois pas causée par une déficience du système adénylate cyclase au cours du vieillissement, puisque sa réponse à la forskoline n'est pas significativement différente entre les rats de deux et 20 ou 24 mois. Il est intéressant de noter que ces études ont également mis en évidence que l'activation par le GTP de l'activité adénylate cyclase est environ 25 fois plus élevée dans les hypophyses de rats âgés. Ceci suggère qu'un découplage entre le récepteur de GHRH et sa protéine G<sub>s</sub> mène à une diminution de sa capacité à réguler le système adénylate cyclase.

Chez les rats mâles de 24 mois, De Gennaro Colonna *et al* (1989) et Muller *et al* (1989) ont observé une diminution supplémentaire des niveaux d'ARNm et de l'immunoreactivité de GHRH dans l'hypothalamus. Par des procédures d'immunocytochimie, Morimoto *et al* (1988) ont démontré que les quantités de GHRH dans l'éminence médiane de ces rats, sont réduites de façon marquée sans qu'il y ait une perte des neurones contenant le GHRH.

La contribution de la SRIF hypothalamique à la diminution de la sécrétion de GH demeure une question de controverse. Chez le rat de 18 et 20 mois, les niveaux d'ARNm et les contenus en SRIF ont été rapportés inchangés [Morimoto *et al* (1988)], augmentés [Sonntag *et al* (1986); Ge F (1989); Ferrara *et al* (1991)] ou diminués [Sonntag *et al* (1980); Takahashi *et al* (1987); Sonntag *et al* (1990); Deslauriers *et al* (1991); Martinoli *et al* (1991)]. D'autres ont rapporté que seuls les niveaux de la SRIF de 28 acides aminés seraient augmentés alors que ceux de la forme de 14 acides aminés resteraient constants [Tannenbaum *et al* (1982)]. Il en résulterait un tonus somatostatinergique plus élevé chez les animaux âgés. Mais, en examinant l'habilité de la SRIF à inhiber l'activité adénylate cyclase induite par la forskoline dans les hypophyses de rats de 21 et 23 mois, Parenti *et al* (1991) ont démontré que cette capacité est réduite de 25%. Une altération des

récepteurs hypophysaires de la SRIF n'est pas à l'origine de ce changement puisque leur nombre et leur affinité pour la SRIF ne sont pas significativement différents chez les rats de 2, 12 à 14 et 20 à 24 mois [Spik et Sonntag (1989)]. Ces derniers résultats vont donc à l'encontre de l'hypothèse que la réduction de la sécrétion de GH serait le résultat d'un tonus somatostatinergique accru.

Toutes ces évidences suggèrent que l'efficacité de la sécrétion de GH induite par GHRH est affecté par le vieillissement et dépend de l'intégrité du GHRH-R et de son système de transduction. La stimulation inadéquate des somatotropes au cours du vieillissement pourrait donc être dues à des altérations du GHRH-R.

### 1.5 Effet du vieillissement sur le GHRH-R

Grâce à des études de liaison avec le [ $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{10}$ ]GHRH(1-44)NH $_2$  ( $^{125}\text{I}$ -GHRH) dans des homogénats d'adénohypophyses de rats Sprague-Dawley de deux mois, deux classes de sites de liaison ont été mises en évidence pour le GHRH [Aribat *et al* (1990)]. La première classe de sites possède une haute affinité et une basse capacité de liaison pour  $^{125}\text{I}$ -GHRH alors que la deuxième classe est caractérisée par une basse affinité et une haute capacité de liaison. Ces sites subissent des altérations séquentielles au cours du vieillissement. Dès l'âge de huit mois, on observe une diminution du nombre de sites à haute affinité ainsi qu'une augmentation concomitante de la capacité de la classe de sites à basse affinité. Toutefois, les affinités des sites de liaison ne sont pas altérées. A quatorze mois, les modifications détectées à l'âge de huit mois persistent. De plus, une légère augmentation de l'affinité de la classe de sites à haute affinité est observée. Cette augmentation peut être interprétée comme une adaptation transitoire face à une capacité réduite du nombre de sites à haute affinité. Finalement, à l'âge de 18 mois, la majorité des sites à haute affinité a disparu. Il en résulte une seule classe de sites possédant une affinité intermédiaire et une capacité inférieure à la capacité totale observée chez les rats de deux mois [Aribat T *et al* (1991)].

Comme la réduction de capacité du site à haute affinité est en corrélation avec



la diminution de sécrétion de GH qui se produit au cours du vieillissement, ces résultats suggèrent que cette entité représente le récepteur fonctionnel qui médie les actions biologiques de GHRH dans les somatotropes [Abribat T *et al* (1991)].

Les paramètres de liaison du GHRH-R sont modifiés dès l'âge de huit mois. A cet âge, aucune autre modification de l'axe somatotrope ou de facteurs centraux ou périphériques pouvant influencer l'axe somatotrope, n'a été rapportée. Ceci suggère que des altérations des caractéristiques du GHRH-R ou de sa concentration effective pourraient être un facteur initiateur menant à réduction de la sécrétion de la GH induite par GHRH et à la perte de sensibilité des somatotropes au GHRH [Abribat *et al* (1991)].

En étudiant l'effet du 5'-guanylylimidodiphosphate (un nucléotide guanyl non-hydrolysable) et de deux agents réducteurs de liens disulfures (le glutathione réduit (GSH) et dithiothréitol (DTT)) sur la modulation des paramètres de liaison du <sup>125</sup>I-GHRH dans les hypophyses de rats jeunes et âgés, Lefrançois *et al* (1995) ont suggéré, qu'au cours du vieillissement, les altérations des sites de liaison du récepteur de GHRH pourraient impliquer la réduction de ponts disulfures ou d'autres modifications menant à des changements conformationnels similaires à ceux induits par GSH et DTT. Ces changements structuraux pourraient prévenir un couplage efficace du GHRH-R avec son ligand et sa protéine G et mener à une perte de fonctionnalité des somatotropes [Lefrançois *et al* (1995)].

L'altération progressive du GHRH-R au cours du vieillissement semble donc être un élément initiateur menant à long terme à la diminution de la sécrétion de GH. Cette réduction des niveaux de GH induit des effets délétères importants au niveau physiologique. Par conséquent, nous étudie des stratégies d'interventions diététique et hormonale ayant pour but de prévenir ou de renverser les modifications du GHRH-R causé par le vieillissement.

## 2. CADRE CONCEPTUEL ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Les mammifères âgés exhibent une diminution de la sécrétion de GH. Des effets physiologiques importants découlent de ces modifications, conduisant à la détérioration des fonctions de plusieurs organes et tissus. L'altération des paramètres de liaison du GHRH à son récepteur, situé sur les cellules somatotropes de l'adénohypophyse, constitue un des facteurs initiateurs de la perte de régulation de l'axe somatotrope au cours du vieillissement. Plusieurs groupes ont déjà souligné les influences métaboliques [Baes et Vale (1990)], diététiques [Bruno JF *et al* (1993); Yu (1994)] et hormonales [Miki *et al* (1995); Horikawa *et al* (1996); Tam *et al* (1996)] sur les diverses composantes de l'axe somatotrope. L'objectif principal de mon projet de recherche visait à utiliser des approches diététiques et hormonales dans le but de prévenir, retarder ou renverser les altérations du GHRH-R dans un modèle de rats mâles Sprague-Dawley âgé.

## **2.1 Restriction calorique modérée**

Il a été démontré que le status 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 que l'obésité, le cancer, le diabète et l'athérosclérose. Une consommation excessive de calories au cours d'une vie entière semble donc accélérer le déclin relié au vieillissement [Yu (1994)].

A l'inverse, la restriction calorique, une diminution de la consommation calorique sans malnutrition, a émergé comme l'intervention anti-vieillesse la plus bénéfique chez les mammifères [Weindruch (1988); Masoro (1992) Schlienger *et al* (1995); Lane *et al* (1996)]. Chez les rongeurs, une restriction calorique modérée de 40 à 50% à partir du sevrage permet de prévenir la détérioration de plusieurs organes et tissus. Elle permet également de retarder l'apparition de nombreuses pathologies reliées au vieillissement. Par conséquent, on peut observer, chez les animaux ayant été soumis à une restriction calorique, une augmentation de leur espérance de vie moyenne et maximale [Weindruch R *et al* (1988)].

Les mécanismes impliqués dans ces processus demeurent inconnus. Toutefois, une des hypothèses actuelles visant à expliquer le vieillissement suppose que celui-ci est, du moins en partie, causé par des dommages cumulatifs par les radicaux libres. En effet, au cours du vieillissement, certains enzymes du système de défense cellulaire contre les radicaux libres sont diminués avec l'âge [Laganier et Yu (1989); Lee et Yu (1990)]. Ceci mène à des pertes de fonction et à des pathologies. La restriction calorique posséderait un effet antioxydant qui limiterait le dommage oxydatif causé par les radicaux libres. En effet, il a été démontré que la restriction calorique réduit la production de radicaux libres [Lee et Yu (1990) ] et maintient dans un état fonctionnel le système de défense cytosolique [Koizumi *et al* (1987); Lee et Yu (1990); Youngman *et al* (1992)]. Elle protège également l'ADN génomique contre les dommages oxydatifs qui peuvent avoir des conséquences importantes sur la pathogénèse de plusieurs maladies chroniques, la biosynthèse et la régulation génique [Waraachakul *et al* (1989); Chung *et al* (1992)]. De plus, la restriction calorique permet de supprimer les dommages existants tels que la lipoperoxydation, la glycation et les dommages à l'ADN [Laganier et Yu (1989); Pieri (1991); Chung *et al* (1992); Laganier et Yu (1993)]. La restriction calorique permet également de moduler certains taux hormonaux, activités réceptorielles, augmentation de l'expression génétique et des taux de synthèse protéique [Yu BP (1994)]. Ainsi, au cours du vieillissement, chez les rats nourris *ad libitum*, la quantité de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques chutent d'environ 37%. La restriction calorique permet, chez le rat âgé, de maintenir une quantité à un niveau similaire à celui des jeunes rats [Scarpace et Yu (1987)]. Des effets positifs de la restriction calorique ont également été observés par Roth *et al* (1984) qui ont évalué l'activité et les niveaux de récepteurs dopaminergiques marqués au  $^3\text{H}$ -spiperone dans le corps strié chez des rats âgés entre trois et douze mois. Weraachakul et Richardson (1988) ont, pour leur part, démontré, dans des cellules de rein et des hépatocytes de rats nourris *ad libitum*, que l'activité adénylate cyclase stimulée par l'isoproterénol décline au cours du vieillissement. Une restriction calorique initiée à l'âge de six semaines permet, à 27 mois, de maintenir une activité similaire à celle des jeunes rats. La restriction calorique permet de moduler positivement l'axe somatotrope pour conserver, chez les rats âgés, un

patron de sécrétion de la GH similaire à celui observé chez les jeunes rats [De Costa *et al* (1993)].

Ces travaux et d'autres ont mis en évidence que la restriction calorique constitue un moyen efficace pour moduler de nombreux paramètres physiologiques et biochimiques. Nous avons donc étudié un modèle de rat mâle Sprague-Dawley soumis à une restriction calorique de 40%, entre les âges de huit et 18 mois, afin de vérifier l'effet de la restriction calorique sur le GHRH-R et dans le but d'évaluer si certains effets de la restriction calorique pourraient être dus à un maintien de l'intégrité de l'axe somatotrope. Nous avons également soumis des rats de 16 mois à une restriction calorique de courte durée (50 jours) pour être en mesure de comparer ses effets avec ceux de la restriction de longue durée. En effet, certains effets de la restriction calorique sont détectables relativement rapidement. Après une semaine de restriction calorique, les niveaux sanguins de corticostérone, chez le rat, sont augmentés [Sohal et Weindruch (1996)]. Après cinq jours, la concentration de glucose sanguin est diminuée d'environ 20%. Après trois semaines, les niveaux d'insuline sont diminués de plus de 50% [Cartee et Dean (1994)]. Finalement, une restriction calorique de 35 jours induit une augmentation de la microvasculature corticale chez les rats âgés [Poe *et al* (1996)].

Le manuscrit intitulé « Long-term calorie restriction protects rat pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites from age-related alterations », publié en août 1998 dans la revue *Neuroendocrinology* 68:21-29, fait partie du corps de ce mémoire et rapporte les résultats que nous avons obtenu dans le cadre de cette étude.

## **2.2 Traitement chronique au hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>**

L'expression génique et la sécrétion des différentes composantes de l'axe somatotrope sont régulées par des mécanismes complexes de stimulation et de rétrocontrôle négatif [Shaffer Tannenbaum (1984); Yamashita et Melmed (1986); Bertherat *et al* (1992); Lanzi et Shaffer Tannenbaum (1992); McCarthy *et al* (1992)]. Chez le rat nouveau-né, la présence de GHRH est essentielle

pour la synthèse optimale de GHRH-R [Horikawa *et al* (1996)]. De plus, chez des hommes âgés, un traitement chronique au GHRH induit une augmentation des niveaux sanguins moyens de GH et de la sécrétion de la GH stimulée par le GHRH [Corpas *et al* (1992); Vittone *et al* (1997)]. Des traitements avec le GHRH chez des rats jeunes et âgés ont fourni des résultats variables concernant les niveaux d'ARNm et la sécrétion de GH dépendamment du sexe de l'animal, du dosage utilisé, de la fréquence du traitement et de sa durée [Parenti *et al* (1987); Iovino *et al* (1989); Hu *et al* (1993); Sato *et al* (1993); Kovacs *et al* (1995)]. Il est donc difficile de réconcilier ces données pour tenter de répliquer ce qui est observé chez l'humain âgé et élucider les mécanismes impliqués. Toutefois, il a été démontré qu'il était possible, par l'administration de GHRH, de resensibiliser les cellules somatotropes de rat et humain âgés, du moins, dans certaines circonstances [Borges JCL *et al* (1984); Parenti *et al* (1987); Iovino *et al* (1989)].

Nous avons voulu évaluer un rôle possible du GHRH-R dans le processus de resensibilisation des somatotropes au GHRH. Nous avons donc mis au point un modèle de traitement de quatorze jours par voie sous-cutanée de GHRH(1-29)NH<sub>2</sub> humain (0.5 ou 1.0 mg/kg de poids corporel) pour des rats mâles Sprague-Dawley de deux et 18 mois. Ce modèle nous a permis d'étudier les mécanismes différentiels impliqués dans la régulation de l'axe somatotrope chez les rats jeunes et âgés. Les résultats que nous avons obtenus et qui font partie de ce mémoire, sont rapportés dans le manuscrit « Differential *In Vivo* regulation of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor by GRF in young and aged rats» qui est présentement sous presse et dans *Endocrinology*.

### **2.3 Traitement chronique à la thyroxine**

Les hormones thyroïdiennes affectent directement et indirectement le status de l'axe somatotrope. La plupart des travaux visant à étudier les effets des hormones thyroïdiennes sur l'axe somatotrope ont été effectués dans des modèles d'hypothyroïdies induites par thyroïdectomie ou à l'aide de bloqueurs de la synthèse des hormones thyroïdiennes tels que le méthimazole et le

propylthiouracil. Ainsi, il a été possible d'établir que les hormones thyroïdiennes augmentent directement la transcription du gène de la GH et stimule la synthèse et la sécrétion de la GH [Peake *et al* (1973); Casanova *et al* (1985); Glass *et al* (1987); Koenig *et al* (1987); Evans *et al* (1992)]. Les effets des hormones thyroïdiennes semblent impliquer à la fois la liaison spécifique de leurs récepteurs aux TRE situés au niveau de la région 5' flanquant la région promoteur du gène de GH [Rousseau *et al* (1987)] et du troisième intron [Sap *et al* (1990)] et une activation tissulaire plus générale du promoteur de la GH [Schaufele *et al* (1992)]. Ces études révèlent également qu'une déficience en hormones thyroïdiennes cause une diminution sévère de la réponse à une stimulation au GHRH. Dans des cellules d'hypophyses normales maintenues *in vitro* en absence de T<sub>3</sub> et dans des cellules provenant de rats hypothyroïdiens, la sécrétion stimulée de GH par le GHRH est significativement réduite lorsqu'on la compare à celle obtenue par des cellules de rats normaux maintenues en culture en présence de T<sub>3</sub> [Vale *et al* (1983); Martin *et al* (1985); Katakami *et al* (1986); Root *et al* (1986)]. De même, *in vivo*, la réponse hypophysaire au GHRH est atténuée chez les animaux hypothyroïdiens [Giustina et Wehrenberg (1995)] et la sécrétion maximale de GH en réponse à des doses importantes de GHRH est dix fois plus faible que chez les rats normaux [Vale *et al* (1983); Katakami *et al* (1986); Root *et al* (1986)].

Les hormones thyroïdiennes jouent également un rôle important pour assurer le maintien de niveaux d'expression optimale du GHRH-R. Miki *et al* (1995) et Tam *et al* (1996) ont rapporté que l'hypothyroïdisme diminue les niveaux d'expression du GHRH-R. Toutefois, ces niveaux peuvent être normalisés avec une thérapie de remplacement [Miki *et al* (1995)]. Ces résultats appuient les travaux de Godfrey et Mayo (1995) qui suggèrent la présence d'un TRE dans la région promoteur du gène de GHRH-R.

Nos observations et celles de d'autres groupes [Quigley *et al* (1990); Console *et al* (1995); Girard *et al* (1998)] révèlent que la concentration sérique de T<sub>4</sub> totale et libre est significativement réduite chez les rats âgés. L'hypothyroïdisme, comme le vieillissement, a un effet négatif sur le GHRH-R. Nous avons donc voulu déterminer l'effet d'une thérapie de remplacement de T<sub>4</sub> de deux semaines

administrée par voie cutanée ( $2\mu\text{g}/100\text{g}$  de poids corporel/jour), chez des rats mâles Sprague-Dawley de 16 à 18 mois, permet de restaurer les sites de liaison du GHRH-R et l'axe somatotrope. Le manuscrit « *In vivo* regulation of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor in aged rats: effect of a chronic treatment with thyroxine » décrit nos observations. Ce manuscrit est présentement soumis pour publication à la revue *Endocrinology*.



### 3. MANUSCRITS

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

**Long-term calorie restriction protects rat pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites from age-related alterations**

NATHALIE GIRARD<sup>1</sup>, GUYLAINE FERLAND<sup>3</sup>, LUCE BOULANGER<sup>1</sup> AND  
PIERRETTE GAUDREAU<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Neuroendocrinology Laboratory, Louis-Charles Simard Research Center, Notre-Dame Hospital and <sup>2</sup>Departments of Medicine and <sup>3</sup>Nutrition, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H2L 4M1

Correspondence and requests for reprints should be addressed to: Dr Pierrette Gaudreau, Neuroendocrinology Laboratory, Louis-Charles Simard Research Center, Notre-Dame Hospital, Rm M-5226, 1560 east Sherbrooke street, Montreal, Quebec, Canada, H2L 4M1

Tel: (514) 281-6000 extension 7159

Fax: (514) 896-4762

e-mail: gaudreap@ere.umontreal.ca

Running title: GRF binding sites in aging calorie-restricted rats

## Abstract

In mammals, middle age and late adulthood is characterized by a decreased growth hormone (GH) secretion and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) serum levels, contributing to tissue and organ atrophy. This condition is related, at least in part, to alterations of pituitary GH-releasing factor (GRF) receptor binding sites. Prevention of age-related deterioration of tissues and organs, retardation of the onset or progression of a wide range of age-related diseases and extension of both mean and maximum life span can be achieved through life-long moderate calorie restriction (CR). Because CR positively modulates the somatotroph axis, resulting in the maintenance of a youthful GH secretory pattern in rats, we investigated whether or not benefits of a long-term (10 months) 40% CR, started in 8-month-old Sprague-Dawley rats was accomplished by preventing age-related alterations of pituitary GRF receptor binding sites and whether or not a short-term (50 days) 40% CR, started in 16-month-old rats, could revert them. Potential hormonal and metabolic modulators of the GRF receptors were investigated as well. GRF binding parameters were derived from saturation studies, performed in pituitary homogenates with [ $^{125}$ I-Tyr $^{10}$ ]hGRF(1-44)NH $_2$ . As previously reported, the high affinity GRF receptor binding sites were blunted in 18-month-old *ad libitum*-fed rats and the apparent concentration of total binding sites was reduced. Short-term CR neither restored high affinity GRF binding sites nor increased the apparent concentration of total binding sites. On the contrary, long-term calorie-restricted 18-month-old rats exhibited high and low affinity GRF binding sites ( $K_{d1}$ : 1.73 $\pm$ 0.35 nM;  $K_{d2}$ : 310 $\pm$ 41 nM;  $B_{max1}$ : 183 $\pm$ 55 fmol/mg prot;  $B_{max2}$ : 30 $\pm$ 3 pmol/mg prot) such as 2-month-old rats ( $K_{d1}$ : 0.68 $\pm$ 0.15 nM;  $K_{d2}$ : 350 $\pm$ 47 nM;  $B_{max1}$ : 219 $\pm$ 53 fmol/mg prot;  $B_{max2}$ : 84 $\pm$ 9 pmol/mg prot). Our results imply that CR must be implemented before age-related alterations of GRF receptor binding sites become too severe or that CR has to be carried out for a long period of time, independently of the age at which it begins. Protection of pituitary GRF receptor binding sites from age-related alterations could not be attributed to changes in circulating levels of total or free T $_4$  or free fatty acids. Finally, the anti-aging effects of a long-term CR involve an action at the level of pituitary GRF receptor, contributing to an increase of GH but not IGF-1 circulating levels. Identification of molecular and cellular mechanisms responsible for these actions will deserve

attention in order to identify centrally and/or peripherally active classes of molecules that could preserve, in aging mammals, the functionality of the somatotroph axis through selective regulation of pituitary GRF receptors.

## Introduction

In the anterior pituitary, growth hormone (GH) pulsatile release is under the dual control of two hypothalamic peptides, GH-releasing factor (GRF) which stimulates GH secretion and synthesis and somatostatin (SRIF) which inhibits GH secretion [1]. Both peptides trigger somatotroph cells by selectively binding to G-protein coupled plasma membrane receptors [2,3]. The resulting activation of adenylate cyclase and production of cAMP constitute the primary events leading to GH secretion [4]. In the pituitary and hypothalamus, complex feedback mechanisms, as well as other hormonal, neuronal, metabolic and dietary influences, contribute to regulate GH, GRF and SRIF gene expression, somatotroph responsiveness to GRF and GH secretion. However, the efficiency of GRF-induced GH secretion strongly depends upon the integrity of the GRF receptor and its transduction system.

In aged humans and rodents, decreases in pituitary responsiveness to GRF and GH plasma levels [5-8] are thought to be responsible for a diminution of the protein synthesis capacity, an increase of the adipose tissue mass and a deterioration of several tissue and organ functions [8-11]. In 24-month-old rats, it has been partly related to a decrease in both GRF hypothalamic content [12, 13] and its gene expression [13], but not to a loss of GRF-containing neurons [12]. The contribution of hypothalamic SRIF to a decreased GH secretion remains controversial since divergent results on gene expression, peptide content and release [12, 14, 5-7,15-17] were reported. We have shown that a significant diminution of the maximal GRF-induced GH response appears *in vivo* and in isolated pituitary cells, around 12 months of age, in male Sprague-Dawley rats [5]. This is accompanied by a slight decrease ( $\cong 15\%$ ) in GH gene expression [15], although the immunoreactive GH content remains normal [5]. In 20-month-old rats, the GRF-induced GH response is severely depressed, the concentration-response is lost [5], the concentration of GH mRNA is diminished by 50% [15] and the immunoreactive GH content is decreased by 30% [5]. It seems however, that the intracellular machinery involved in GH secretion is not altered in aged rat somatotrophs since a combined administration of GRF and growth hormone-releasing peptide induces a robust *in vivo* GH response in both 3- and 19-month-

old rats [18]. Based on these informations, it has been hypothesized that the age-related decline of GH secretion, and consequently IGF-1, resulted more from an inadequate stimulation of the somatotrophs rather than a defect in the mechanisms of GH release [18-19].

We have reported that high and low affinity classes of GRF binding sites undergo sequential alterations in aging male Sprague-Dawley rat pituitaries [20-21]. In addition, the maximal GRF-induced cAMP production is selectively reduced by 45% in 20-24-month-old rat pituitaries [22]. Finally, the ability of SRIF to inhibit forskolin-induced adenylate cyclase activity is reduced by  $\approx 25\%$  in 21-23-month-old rat pituitaries [23] although SRIF binding site parameters are not significantly different in young, 12-14 and 20-24-month-old rats [24]. As the selective alterations of GRF binding parameters start very early on ( $\approx 8$  months), an age at which no other anomaly of central and/or peripheral factors influencing somatotroph responsiveness has been documented, changes in the characteristics of the GRF and/or its effective concentration have been proposed as one of the initiating factors leading to the decrease of GRF-induced cAMP production and somatotroph responsiveness observed in older rats [21].

Although a number of factors contribute to a successful aging, nutrition is believed to function as a powerful regulatory factor [25]. In rodents, prevention of age-related deteriorations, retardation of the onset or progression of a wide range of age-related diseases and consequently, extension of both mean and maximum life span can be achieved through life-long moderate calorie restriction (CR) [26]. Moreover, recent observations suggest that even a short-term calorie restriction may be beneficial to aged rats [27]. Because CR positively modulates the somatotroph axis, resulting in the maintenance of a youthful GH secretory pattern in rats [28], we investigated whether or not this benefit of a long-term 40% CR, started in 8-month-old Sprague-Dawley rats, was accomplished at least in part, by preventing age-related alterations of pituitary GRF receptor binding sites. We also studied if a short-term 40% CR, started in 16-month-old rats, could revert these alterations. In addition, potential hormonal and metabolic modulators of the GRF receptors were investigated.

## Materials and Methods

### *Animals and experimental procedures*

For long-term CR (10 months), 2-month-old male Sprague-Dawley rats (Charles Rivers Canada, St-Constant, Quebec) were individually housed in wire-bottom cages, in a room under controlled temperature (22°C), humidity and lighting (cycles of 12 hrs: lights on at 07:00), after one week of acclimatization to our animal facilities. Until 8 months of age, animals had free access to a semi-synthetic powdered diet prepared according to the Teklad control diet #TD 89248 (Teklad Test Diets, Madison, WI). The diet consisted 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 Biomedicals Ltd, St-Laurent, Quebec). At 8 months of age, the rats were randomized in two groups: the first group was provided free access to food while the second group was submitted to a 20% CR for two weeks and to a 40% CR thereafter, based on the mean intake of *ad libitum*-fed rats.

For short-term CR, 16-month-old rats were randomized in two groups and CR was implemented as described above. CR was then continued for 50 days. A gradual approach to calorie restriction was adopted to minimize stress on the animals. The diet fed to calorie-restricted rats contained an increased amount of vitamins and minerals to provide them with the same intake as *ad libitum*-fed controls. All animals had free access to water. Aging rats were weighted regularly until sacrifice. They were sacrificed at 18 months of age along with 2-month-old control animals after an overnight fast. The animal protocol was approved by the animal Care Committee of the University of Montreal in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.



### *Tissue handling*

After decapitation, anterior pituitaries were collected in ice-cold 50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.4, containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM EDTA and were used within 30 min to perform the GRF binding assay. Blood was also collected and sera were kept at -80°C for determination of total T<sub>4</sub>, free T<sub>4</sub>, total IGF-1 immunoreactive levels and free fatty acids concentrations.

### *Binding assay*

Tissue preparation and cold saturation studies were performed as previously reported, using [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>10</sup>] hGRF (1-44) NH<sub>2</sub> ([<sup>125</sup>I]GRF, 2000 Ci / mmol; Amersham Canada, Oakville, Ontario) as radioligand [20, 21]. For each saturation curve, 1 anterior pituitary from 18-month-old rats or 2 anterior pituitaries from 2-month-old rats were homogenized for 8-10 sec, with a micro ultrasonic cell disruptor (Kontes, Vineland, NJ), in 0.5 ml of ice-cold 50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.4, containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM EDTA. The homogenates were further diluted to 1.3 ml and 50 ml of this preparation was used in each assay tube (34-90 mg prot, as determined by the Lowry method [29] with 35-50 pM [<sup>125</sup>I]GRF and increasing concentrations of [<sup>127</sup>I-Tyr<sup>10</sup>]hGRF(1-44)NH<sub>2</sub> (0.1-1000 nM), in a total volume of 300 ml of Tris-acetate, pH 7.4 containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA and 0.42% bovine serum albumin. Non-specific binding was determined in presence of 1.0 mM rGRF(1-29)NH<sub>2</sub>. Incubations were carried out at 23°C for 60 min and stopped by centrifugation (12,000g, 5 min, 4°C). [<sup>127</sup>I-Tyr<sup>10</sup>]hGRF(1-44)NH<sub>2</sub> and rGRF(1-29)NH<sub>2</sub> were synthesized in our laboratory [30]. Control pituitaries from 2-month-old *ad libitum*-fed rats were assayed in each experiment along with 18-month-old *ad libitum*-fed and calorie-restricted rats.

### *Radioimmunoassays*

Serum total and free T<sub>4</sub> concentrations were determined using commercial RIA kits (Immunocorp Sci. Inc., Montreal, Canada and Incstar Corp., Stillwater, Mn, respectively). The sensitivity of the assays was 3.9 nmol/l for total T<sub>4</sub> and 1.03 pmol/l for free T<sub>4</sub>. Serum total IGF-1 concentrations were measured after acid-

ethanol treatment using a commercial RIA kit (Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, TX). The sensitivity of the assay was 21 ng/ml. All samples for each RIA were determined in duplicate in a single assay. Intra-assay coefficients of variation were respectively 6.2%, 6.2% and 6.1% for total T4, free T4 and IGF-1.

#### *Serum free fatty acid concentration*

Serum free fatty acid (FFA) concentrations were determined after organic-acid extraction, using the methyl red colorimetric assay of Dole and Meinertz [32]. Palmitic acid was used as standard.

#### *Data Analysis*

The computerized LIGAND program was used to analyse cold saturation studies [33]. Statistical significance of differences was determined by the unpaired Student's *t*-test. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM.

## Results

### *Body weight, femur and tibia size and serum concentration of free fatty acids*

As shown in Table 1, 18-month-old rats submitted to a long-term CR had a body weight (BW) 2 times lower than 18-month-old *ad libitum*-fed rats ( $P < 0.0005$ ) and 2 times higher than 2-month-old *ad libitum*-fed controls ( $P < 0.0005$ ). Their femur and tibia length was decreased by 1.02-fold while their femur and tibia width were decreased by respectively 1.09- and 1.07-fold. Liver, heart, spleen, kidney, testis and small intestine weight to BW ratio were not significantly different between 18-month-old calorie-restricted and *ad libitum*-fed rats (data not shown). Eighteen-month-old rats submitted to a short-term CR had a BW 1.27 times lower than 18-month-old *ad libitum*-fed rats ( $P < 0.0005$ ) and 2 times higher than 2-month-old *ad libitum*-fed controls ( $P < 0.0005$ ).

In the group of rats submitted to a long-term CR, serum concentration of FFA was neither significantly different between 18-month-old calorie-restricted and 18-month-old *ad libitum*-fed rats ( $P > 0.1$ ) nor between 2- and 18-month-old *ad libitum*-fed rats ( $P > 0.25$ ). However, a significant diminution of the FFA level was observed in 18-month-old calorie-restricted rats when compared to 2-month-old rats ( $P < 0.025$ ). In the group of rats submitted to a short-term CR, serum concentration of FFA was respectively decreased by 2.6- and 2.4-fold in 18-month-old calorie-restricted rats when compared to 18- and 2-month-old *ad libitum*-fed rats ( $P < 0.005$ ).

### *Pituitary GRF binding parameters*

Table 2 summarizes the effect of a long-term 40%CR, on pituitary GRF binding parameters in 18-month-old rats when compared to 18- and 2-month-old *ad libitum*-fed rats. Co-analysis of the binding data by the LIGAND program indicated a significant preference for a two-site model in 2-month-old pituitaries ( $P < 0.05$ ). As previously reported [20, 21], this mathematical model was no longer preferred in 18-month-old pituitaries from *ad libitum*-fed rats ( $P = 0.257$ ) and a one-site model best fitted the data from saturation studies. In this group, the high

affinity GRF binding site was blunted and the  $K_d$  was 79 times lower than the  $K_{d1}$  from 2-month-old rat pituitaries (Table 2,  $P < 0.005$ ). Moreover, their total number of binding sites was 3 times lower than that of 2-month-old rat pituitaries (Table 2,  $P < 0.02$ ). In 18-month-old pituitaries from calorie-restricted rats, co-analysis of the data indicated a significant preference for a two-site model ( $P < 0.05$ ). The affinity of the high affinity class of sites ( $K_{d1}$ ) reverted to a low nM value, even if it remained lower than that of 2-month-old rat pituitaries ( $1.73 \pm 0.35$  vs  $0.68 \pm 0.15$ ; Table 2,  $P < 0.025$ ). The  $K_{d2}$  and the binding capacity of the high affinity class of sites ( $B_{max1}$ ) also reverted to values normally observed in 2-month-old rat pituitaries (Table 2,  $P > 0.25$ ). The binding capacity of the low affinity class of binding sites ( $B_{max2}$ ) was not modulated by CR and remained significantly lower than that of 2-month-old rat pituitaries.

As shown in Table 3, a short-term CR, started at 16 months of age, did not have beneficial effects on pituitary GRF receptor binding sites. Co-analysis of the binding data indicated a preference for the one-site model, as seen in 18-month-old *ad libitum*-fed rat pituitaries ( $P = 1$ ). The total capacity of binding sites was significantly decreased in the pituitary of calorie-restricted rats when compared to 18-month-old *ad libitum*-fed rats (Table 3,  $P < 0.005$ ).

#### *Immunoreactive serum total $T_4$ , free $T_4$ and total IGF-1 concentrations*

The effects of age and a long-term 40% CR, on serum total  $T_4$ , free  $T_4$  and total IGF-1 concentrations, are presented in Table 4. All hormone levels were significantly decreased in 18-month-old calorie-restricted and *ad libitum*-fed rats compared to 2-month-old rats. Total  $T_4$  levels were respectively 2.2 ( $P < 0.005$ ) and 2.5 times ( $P < 0.0005$ ) lower, free  $T_4$  levels were 1.6 and 1.7 times ( $P < 0.01$ ) lower and IGF-1 levels were 3.5 and 2.8 times ( $P < 0.005$ ) lower. However, they were not significantly different in 18-month-old CR and *ad libitum*-fed rats ( $P > 0.1$ , 0.4 and 0.1 respectively).

## Discussion

Aging is associated with several changes in the somatotroph axis, leading to decreased levels of circulating GH and IGF-1 [8]. Because these hormones are crucial in insuring a proper rate of protein synthesis, muscle mass, skin thickness and bone density [8], it would be desirable to curtail their diminution during the aging process. Moderate CR, the most diversified anti-aging laboratory maneuver, is recognized to prevent or delay age-related diseases, functional deteriorations of tissues and organs [26] and declines in tissues protein synthesis [34, 35]. This nutritional condition also extends mean and maximum life span in rodents [26] and possibly in nonhuman primates [36]. Studies on the effects of life-long CR in rats, either started at 6 weeks or 6 months of age, have proven the salutary results of this regimen. A link, between such benefits and a modulatory effect of this diet on the somatotroph axis, has been established since the amplitude of GH pulses of 26-month-old calorie-restricted rats is restored to that of 2-month-old rats [28].

In our studies, we privileged a long-term CR (10 months) 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 GRF somatotroph sensitivity in longer-lived mammals. Recent data, showing that a 35-day CR could, as a long-term CR, ameliorate the cortical microvasculature of aged rats [27], prompted us to compare the effect of a long-term CR to that of a 50-day CR, started at 16 months of age, on pituitary GRF receptor binding sites.

The general health condition, BW and femur and tibia sizes of the long-term calorie-restricted rats were similar to those previously reported in rats submitted to a long-term CR started at 6 months of age [37]. It indicates that CR, implanted in adult rats, represents a valuable condition to study nutritional modulations of the somatotroph function in aging. We report that, a long-term 40% CR, started in 8-month-old rats, effectively protects pituitary GRF receptor binding sites from the age-related alterations that are normally observed at 18 months. Data from Deslauriers *et al.* [5] showing, in 12-month-old rats, a diminution of the GRF-induced GH response *in vivo* and in isolated pituitary cells [5] and from Sonntag

*et al.* [28, 38], clearly indicating that a long-term CR restores GH secretory profiles in rats, suggest that a maintenance of high affinity pituitary GRF receptor binding sites reflects a maintenance of functional GRF receptors. On the contrary, a short-term CR did not impact on GRF receptor binding parameters in aged rats. This result either indicate that CR must be implemented before age-related alterations of GRF receptor binding sites become be too severe or that CR has to be carried out for a long period of time, independently of the age at wich it begins. However, since has been proposed that CR protects again age-related deterioration by playing a crucial role in the maintenance of cellular homeostasis, we believe that this mechanism would better operate through a long-term CR begun at adulthood rather than in aged mammals. [39].

Some potential mechanisms by which long-term CR could regulate GRF receptor binding sites have been investigated in this study. Recently, Tam *et al.* have reported that GRF receptor mRNA levels depend upon the thyroid hormone status [31]. In 2-month-old rats, a treatment with blockers of thyroid hormone synthesis induced a 35% decrease of pituitary GRF receptor mRNA after 1 week and a 55% decrease after 3 weeks, leading to a compensatory increase of hypothalamic GRF mRNA levels [31]. After a 3-week treatment, we have found that the respective concentration of high and low affinity [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>10</sup>]hGRF(1-44)NH<sub>2</sub> binding sites were decreased by 78% and 94% (Boulanger *et al.*, submitted elsewhere). In addition, Miki *et al.* have demonstrated that thyroid hormone supplementation normalized GRF receptor mRNA levels in 3-4-month-old thyroidectomized rats [40]. Altogether, these findings are consistent with the identification of a thyroid hormone-responsive element in the promoter region of the GRF receptor [41] and stress the importance of thyroid hormones for its optimal expression. In that perspective and considering that serum total and free T<sub>4</sub> are lowered in aged rats [42], it was of interest to measure their levels in *ad libitum*-fed and long-term calorie-restricted 18-month-old rats. In comparison to young rats, the levels of this hormone were similarly decreased in both 18-month-old groups, suggesting that long-term CR did not induce a strong T<sub>4</sub>-regulated increase of the GRF receptor gene expression. However, we cannot exclude that CR could increase the rate of conversion of T<sub>4</sub> to T<sub>3</sub> and/or the concentration of thyroid hormone receptors, since a number of protein and enzymatic activities are

increased by CR [26, 28, 34, 35]. This could in turn positively modulate levels of GRF receptor gene expression.

FFA have been pointed out as potential modulators of GRF binding in the pituitary. We have previously used caprylic acid, in rat pituitary dispersed cells, to mimic the effects of FFA on GRF binding parameters and found that a 3 mM concentration is necessary to decrease the affinity of rGRF(1-29)NH<sub>2</sub> from 0.87±0.14 to 3.05±0.65 nM (P<0.02) [43]. In the present study, the circulating levels of FFA were approximately 7 times lower in 18-month-old long-term calorie-restricted and *ad libitum*-fed rats and 18 times lower in 18-month-old short-term calorie-restricted rats compared to the above *in vitro* experimental condition. Since short-term CR decreased drastically serum FFA levels in aged rats without influencing GRF receptor binding sites, it cannot be proposed as a primary mechanism to explain changes of pituitary GRF binding parameters that are observed in long-term calorie-restricted aged rats.

Changes in IGF-1 levels could also affect hypothalamic GRF neurons and consequently pituitary GRF receptors. It has been proposed that IGF-1 negatively regulate GRF synthesis and secretion through direct or indirect mechanisms [44, 45]. As previously reported [28], we have found that serum total IGF-1 levels were decreased in aged rats when compared to young animals, indicating that an IGF-1-mediated mechanism does not appear to be involved in the regulation of GRF receptor binding sites in *ad libitum*-fed and in calorie-restricted 18-month-old rats. A proposed explanation for the maintenance of low circulating levels of IGF-1 in calorie-restricted rats, despite a restoration of GH secretion, is that CR may alter GH receptors and/or transduction systems [46]. However, a direct action of GH on a number of organs could account for the beneficial effects of CR [46]. Increased circulating GH could therefore induce a paracrine secretion of IGF-1 in a number of tissues and/or enhance tissue response to IGF-1, through an increase of IGF-1 type 1 receptors [47].

At the central level, changes in the hypothalamic GRF content or release could also affect the pituitary GRF receptor. It has recently been shown, for example, that passive immunization of neonatal rats to GRF decreased GRF receptor

mRNA levels [48]. In 24-month-old rats, GRF mRNA levels in the whole hypothalamus and GRF-like immunoreactivity in the median eminence are significantly reduced [12-13]. However, when comparing GRF immunoreactive contents in the hypothalamus of our *ad libitum*-fed and long-term calorie-restricted 18-month-old rats, preliminary results do not indicate a significant difference between the two groups (unpublished observations). This may suggest that CR does not exert a major influence on GRF hypothalamic neurons, but it could also suggest that CR exerts a stimulatory effect on GRF synthesis and release, resulting in no apparent changes of its immunoreactive content.

Others regulators of the GRF receptor expression, such as glucocorticoids and the transcription factor Pit-1, may be of interest. Stimulatory and inhibitory effects of glucocorticoids on GH and GRF synthesis and secretion have been reported in rat and humans, depending on the experimental conditions, animal species and methods of dosage [49]. However, it has been shown that glucocorticoids are required to maintain an optimal GRF receptor binding capacity in the rat pituitary [50] likely by stimulating GRF receptor gene expression through a ligand-activated glucocorticoid receptor interaction [51]. In addition, despite unchanged total plasma corticosterone profiles, mean 24-h plasma free corticosterone levels are increased in aging CR rats compared to those of *ad libitum*-fed rats [52]. Altogether, it may suggest a potential mechanism by which CR could affect pituitary GRF receptor binding sites. However, further experimentation will be needed to elucidate it. With respect to Pit-1, Korykto *et al.* [53] have recently reported that mRNA levels of this transcription factor, believed to be required for GRF receptor gene expression [2, 54], as well as those of GRF receptor are not significantly different in 70-day- and 12-month-old rats. However, levels of Pit-1 and GRFreceptor mRNA levels remain to be investigated in older *ad libitum*-fed and CR rats.

In conclusion, the present findings indicate that, in male Sprague-Dawley rats, long-term CR, started at adulthood, has a marked effect on pituitary GRF receptor binding sites, protecting them from age-related alterations. In our view, this contributes to the maintenance of a pulsatile GH secretion and to that of organ and tissue functions in aging rats. Identification of molecular and cellular



mechanisms responsible for these actions will deserve attention in order to identify centrally and/or peripherally active classes of molecules that could preserve, in aging mammals, the functionality of the somatotroph axis through selective regulation of pituitary GRF receptors.

## References

1. **Tannenbaum GS, Ling N:** The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm and GH secretion. *Endocrinology* 1984; 115: 1952-1957.
2. **Mayo KE:** Molecular cloning and expression of a pituitary specific receptor for growth hormone-releasing factor. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1734-1744.
3. **Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S:** 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* 1992; 89: 251-255.
4. **Frohman LA, Jasson JO:** Growth hormone-releasing hormone. *Endocr Rev* 1986; 7: 223-253.
5. **Deslauriers N, Gaudreau P, Aribat T, Renier G, Petitclerc D and Brazeau P:** Dynamics of growth hormone responsiveness to growth hormone releasing factor in aging rats: peripheral and central influences. *Neuroendocrinology* 1991; 53: 439-446.
6. **Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J:** Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology* 1980; 107: 1875-1879.
7. **Takahashi S, Gottschall PE, Quigley KL, Goya RG, Meites J:** Growth hormone secretory pattern in young, middle-age and old female rats. *Neuroendocrinology* 1987; 46: 137-142.
8. **Corpas E, Harman M, Blackman MR:** Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev* 1993; 14: 20-39.
9. **Rudman D:** Growth hormone, body composition and aging. *J Am Geriatr Soc* 1985; 33: 800-807.
10. **Borst SE, Millard WJ, Lowenthal DT:** Growth hormone, exercise and aging: the future of therapy for the frail elderly. *J Am Geriatr Soc* 1994; 42: 528-435.
11. **Meites J, Goya RG, Takahashi S:** Why the neuroendocrine system is important in aging processes. *Exp Gerontol* 1987; 22: 1-15.

12. **Morimoto N, Kawakami F, Makino S, Chibara K, Hasegawa M, Iбата Y:** Age-related changes in growth hormone-releasing factor and somatostatin in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1988; 47: 459-464.
13. **De Gennaro Colonna V, Zoli M, Cocchi D, Maggi A, Marrama P, Agnati F, Müller EE:** Reduced growth hormone-releasing factor (GHRF)-like immunoreactivity and GHRF gene expression in the hypothalamus of aged rats. *Peptides* 1989; 10: 705-708.
14. **Ge F, Tsagarakis LH, Rees LH, Besser GM, Grossman A:** 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* 1989; 123: 53-58.
15. **Martinoli MG, Ouellet J, Rhéaume J, Pelletier G:** Growth-hormone and somatostatin gene expression in adult and aging rats as measured by quantitative in situ hybridization. *Neuroendocrinology* 1991; 54: 607-615.
16. **Sonntag WE, Boyd RL, Boozee RM:** Somatostatin gene expression in hypothalamus and cortex of aging male rats. *Neurobiol Aging* 1990; 11: 409-416.
17. **Sonntag WE, Gottschall PE, Meites:** Increased secretion of somatostatin 28 from hypothalamic neurones of aged rat in vitro. *Brain Res* 1986; 380: 229-234.
18. **Walker RF, Yang SW, Bercu BB:** Robust growth hormone secretion in aged female rats co-administered GH-releasing hexapeptide (GHRP-6) and growth hormone-releasing peptide. *Life Sci* 1991; 49: 1499-1504.
19. **Gregerman RI:** Mechanisms of age-related alteration of hormone secretions and actions. An overview of 30 years of progress. *Exp Gerontology* 1986; 21: 345-365.
20. **Abribat T, Deslauriers N, Brazeau P and Gaudreau P:** Alterations of pituitary growth hormone-releasing factor binding sites in aging rats. *Endocrinology* 1991; 128: 633-635.
21. **Lefrançois L, Boulanger L, Gaudreau P:** Effects of aging on pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites: in vitro mimicry by guanyl nucleotides and reducing agents. *Brain Res* 1995; 673: 39-46.

22. **Robberecht P, Gillard M, Waelbroeck M, Camus JC, DeNeff P, Christophe J:** Decreased stimulation of adenylate cyclase by growth hormone-releasing factor in the anterior pituitary of old rats. *Neuroendocrinology* 1986; 44: 429-432.
23. **Parenti M, Cocchi D, Ceresoli G, Marcozzi C, Müller EE:** Age-related changes of growth hormone secretory mechanisms in the rat pituitary gland. *J Endocrinol* 1991; 131: 251-257.
24. **Spik K, Sonntag WE:** Increased pituitary response to somatostatin in aging male rats: relationship to somatostatin receptor number and affinity. *Neuroendocrinology* 1988; 50: 489-494.
25. **Schlienger JL, Pradignac A, Grunenberger F:** Nutrition of the elderly: a challenge between facts and needs. *Hormone Res* 1995; 43: 46-51.
26. **Weindruch R, Walford RL:** The retardation of aging and disease by dietary restriction. Springfield IL, Charles C Thomas, 1988, pp. 7-215.
27. **Poe B, Lynch C, Cooney P, Brunso-Bechtold JK, Sonntag WE, Huntchins PM:** Caloric restriction increases cortical microvasculature in aged animals. Abstract program of Society for Neuroscience, Washington DC, 1996, vol 22, No 492.14.
28. **D'Costa AP, Ingram RL, Lenham JE, Sonntag WE:** The regulation and mechanisms of action of growth hormone and insulin-like growth factor 1 during aging. *J Reprod Fert* 1993; 46: 87-98.
29. **Lowry DH, Rosebrough NJ, Farr AL:** Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
30. **Gaudreau P, Boulanger L, Aribat T:** Affinity of human growth hormone-releasing factor (1-29)NH<sub>2</sub> analogues for GRF binding sites in rat adenopituitary. *J Biol Chem* 1992; 35: 1864-1869.
31. **Tam S-P, Lam KSL, Srivastava G:** Gene expression of hypothalamic somatostatin, growth hormone-releasing factor, and their pituitary receptors in hypothyroidism. *Endocrinology* 1996; 137: 418-424.
32. **Dole VP, Meinertz H:** Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J Biol Chem* 1960; 235: 2595-2599.
33. **Munson PJ, Rodbard D:** LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 1980; 107: 220-239.

34. **Ricketts WG, Birchenall-Sparks MC, Hardwick JP, Richardson A:** Effect of age and dietary restriction on protein synthesis by isolated kidney cells. *J Cell Physiol* 1985; 125:492-498.
35. **Ward WF:** Enhancement by food restriction of liver protein synthesis in the aging Fisher 344 rat. *J Gerontol Biol Sci* 1988; 43: B50-B53.
36. **Lane MA, Baer DJ, Rumpler WV, Weindruch R, Ingram DK, Tilmont, EM, Cutler, RG, Roth GS:** Calorie restriction lowers body temperature in rhesus monkeys, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1996; 93: 4159-4164.
37. **Kalu Dn, Hardin RH, Cockerham R, Yu BP:** Aging and dietary modulation of rat skeleton and parathyroid hormone. *Endocrinology* 1984; 115: 1239-1247.
38. **Sonntag WE, Xu X, Ingram RL, D'Costa A:** Moderate caloric restriction alters the subcellular distribution of somatostatin mRNA and increase growth hormone pulse amplitude in aged animals. *Neuroendocrinology* 1995; 81: 601-608.
39. **Yu BP:** How diet influences the aging process of the rat. *Proceedings of the Soc Exp Biol Med* 1994; 205: 97-104.
40. **Miki N, Ono M, Murata Y, Ohsaki E, Tamitsu K, Ri T, Denmura H, Yamada M:** Thyroid hormone regulation of gene expression of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 217: 1087-1093.
41. **Godfery PA, Mayo K:** Structure of the rat GHRH receptor gene and characterization of two receptor isoforms. Abstract program of the 77th Annual Meeting of the Endocrine Society, Washington DC, 1995, No P3-129.
42. **Quigley K, Goya R, Nachreiner R, Meites J:** Effects of underfeeding and refeeding on GH and thyroid secretion in young, middle-aged and old rats. *Exp Gerontology* 1990; 25: 447-457.
43. **Renier G, Aribat A, Brazeau P, Deslauriers N, Gaudreau P:** Cellular mechanism of caprilic acid-induced growth hormone suppression. *Metabolism* 1990; 39: 1108-1112.

44. **Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL:** Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 1981; 212: 1279-1281.
45. **Harel Z, Tannenbaum GS:** Synergistic interaction between insulin-like growth factors I and II in central regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 1992; 131: 758-764.
46. **Thissen JP, Ketelslegers J-M, Underwood LE:** Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 1994; 15: 80-101.
47. **D'Costa AP, Lenham JE, Ingram RL, Sonntag WE:** 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* 1993;692: 253-255.
48. **Horikawa R, Hellmann P, Cella SG, Torsello A, Day RN, Muller EE, Thorner MO.** Growth hormone-releasing factor (GRF) regulates the expression of its own receptor. *Endocrinology* 1996; 137: 2642-2645.
49. **Mehls O, Tönshoff B, Kovács G, Mayer C, Schurek J, Oh J:** Interaction between glucocorticoids and growth hormone. *Acta Paediatr Suppl* 1993; 388: 76-82.
50. **Seifert H, Perrin M, Rivier J, Vale W:** Binding sites for growth hormone-releasing factor on rat anterior pituitary cells. *Nature* 1985; 313: 487-489.
51. **Tamaki M, Sata M, Matsubara S, Wada, Takahara J:** Dexamethaxone increases growth-hormone(GH)-releasing hormone (GRH) receptor mRNA levels in cultured rat anterior pituitary cells. *J Neuroendocrinol* 1996; 8:475-480.
52. **Sabatino F, Masoro EJ, McMahan A, Kuhn RW:** Assessment of the role of the glucocorticoid system in aging processes and in the action of food restriction. *J Gerontol* 1991; 46: B171-179.
53. **Korytko A, Zeitler P, Cuttler L:** Developmental regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression in the rat. *Endocrinology* 1996; 137: 1326-1331.
54. **Lin C, Lin S-C, Chang C-P, Rosenfeld MG:** Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone-releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 1992; 360: 375-378.

**Acknowledgements**

We acknowledge the valuable contribution of Isabelle Dion for measuring serum FFA and of Dominique Mainville for taking care of the aging rats.

This work was supported by the Medical Research Council of Canada (PG) and by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (GF). LB is recipient of a studentship from the Faculty of Graduate Studies of the University of Montreal. PG is recipient of a scholarship from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec".

**TABLE 1** Body weight, femur and tibia size and serum concentration of free fatty acids of 18-month-old rats compared to 2-month-old rats: effects of a long-term and short-term 40% calorie restriction

Group	Long-term CR				Long-term CR			
	BW (g)	FFA ( $\mu\text{mol/l}$ )	Femur Lenght (cm)	Width (mm)	Tibia Lenght (cm)	Width (mm)	BW (g)	FFA ( $\mu\text{mol/l}$ )
2-mo <i>ad libitum</i> -fed nth-old	235 $\pm$ 3	433 $\pm$ 15	ND	ND	ND	ND	287 $\pm$ 7	388 $\pm$ 52
18-month-old <i>ad libitum</i> -fed	942 $\pm$ 72 <sup>a</sup>	409 $\pm$ 38	3.99 $\pm$ 0.01	7.10 $\pm$ 0.02	4.69 $\pm$ 0.02	4.40 $\pm$ 0.10	662 $\pm$ 29 <sup>h</sup>	358 $\pm$ 40
18-month-old calorie-restricted	474 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	365 $\pm$ 17 <sup>c</sup>	3.89 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	6.50 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	4.61 $\pm$ 0.02 <sup>f</sup>	4.10 $\pm$ 0.10 <sup>g</sup>	522 $\pm$ 11 <sup>i</sup>	149 $\pm$ 20 <sup>j</sup>

Values represent the mean $\pm$ SEM of 6-12 rats for body parameters and of 4-6 individual samples tested in duplicate for FFA.  
 ND: not determined.

<sup>a</sup> P < 0.0005 when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed control rats of the long-term CR protocol.

<sup>b</sup> P < 0.0005 when compared to 2- and 18-month-old *ad libitum*-fed rats of the long-term CR protocol.

<sup>c</sup> P < 0.025 when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats of the long-term CR protocol.

<sup>d</sup> P < 0.0005, <sup>e</sup> P < 0.025, <sup>f</sup> P < 0.005, <sup>g</sup> P < 0.05 when compared to 18-month-old *ad libitum*-fed rats of the long-term CR protocol.

<sup>h</sup> P < 0.0005 when compared to 2-month-old *ad libitum*-fed rats of the short-term CR protocol.

<sup>i</sup> P < 0.0005 when compared to 2- and 18-month-old *ad libitum*-fed rats of the short-term CR protocol.

<sup>j</sup> P < 0.0005 when compared to 2- and 18-month-old *ad libitum*-fed rats of the short-term CR protocol.



**TABLE 2** Estimate of GRF binding parameters in pituitary homogenates of 18-month-old rats compared to 2-month-old rats: effect of a long-term 40% calorie restriction started at 8 months of age

Group	$K_{d1}$ (nM)	$K_{d2}$ (nM)	$B_{max1}$ (fmol/mg prot)	$B_{max2}$ (pmol/mg prot)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	0.68±0.15	350±47	219±53	84±9
18-month-old <i>ad libitum</i> -fed	54.0±11.0 <sup>a</sup>		26±6 pmol/mg prot <sup>b</sup>	
18-month-old calorie-restricted	1.73±0.35 <sup>c</sup>	310±41 <sup>d</sup>	183±55 <sup>e</sup>	30±3 <sup>f</sup>

Estimates of binding parameters were derived from cold saturation studies.

Values represent the mean±SEM of 3 to 4 independent experiments performed in triplicate or duplicate.

<sup>a</sup> P < 0.005 when compared to  $K_{d1}$  or  $K_{d2}$  in 2-month-old pituitaries.

<sup>b</sup> P < 0.02 and P < 0.005 when compared respectively to  $B_{max1}$  or  $B_{max2}$  in 2-month-old pituitaries.

<sup>c</sup> P < 0.005 when compared to  $K_d$  in 18-month-old pituitaries from *ad libitum fed*-rats and P < 0.025 when compared to  $K_{d1}$  in 2-month-old pituitaries.

<sup>d</sup> P < 0.005 when compared to  $K_d$  in 18-month-old pituitaries from *ad libitum fed*-rats.

<sup>e</sup> P < 0.05 when compared to  $B_{max}$  in 18-month-old pituitaries from *ad libitum fed*-rats.

<sup>f</sup> P < 0.005 when compared to  $B_{max2}$  in 2-month-old pituitaries.

**TABLE 3** Estimate of GRF binding parameters in pituitary homogenates of 18-month-old rats compared to 2-month-old rats: effect of a short-term 40% calorie restriction started at 16 months of age

Group	$K_{d1}$ (nM)	$K_{d2}$ (nM)	$B_{max1}$ (fmol/mg prot)	$B_{max2}$ (pmol/mg prot)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	0.82±0.22	331±66	139±34	30±4
18-month-old <i>ad libitum</i> -fed	33.9±4.0 <sup>a</sup>			17±2 pmol/mg prot <sup>b</sup>
18-month-old calorie- restricted	24.5±4.6 <sup>a</sup>			7.6±1.5 <sup>b,c</sup>

Estimates of binding parameters were derived from cold saturation studies.

Values represent the mean±SEM of 4 to 5 independent experiments performed in triplicate or duplicate.

<sup>a</sup> P < 0.005 when compared to  $K_{d1}$  or  $K_{d2}$  in 2-month-old pituitaries.

<sup>b</sup> P < 0.005 and P < 0.01 when compared respectively to  $B_{max1}$  and  $B_{max2}$  in 2-month-old pituitaries.

<sup>c</sup> P < 0.005 when compared to  $B_{max}$  in 18-month-old pituitaries from *ad libitum*-fed rats.

**TABLE 4** Serum concentrations of total T<sub>4</sub>, free T<sub>4</sub> and total IGF-1 in 18-month-old rats compared to 2-month-old rats: effects of a long-term 40% calorie restriction started at 8 months of age

	Total T <sub>4</sub> (nmol/l)	Free T <sub>4</sub> (pmol/l)	Total IGF-1 (ng/ml)
2-month-old <i>ad libitum</i> -fed	65.3±2.9	37.1±3.3	2306±87
18-month-old <i>ad libitum</i> -fed	25.8±3.4 <sup>a</sup>	23.5±1.9 <sup>c</sup>	663±135 <sup>a</sup>
18-month-old calorie restriction	30.0±3.5 <sup>b</sup>	22.2±2.9 <sup>c</sup>	814±100 <sup>a</sup>

Values represent the mean ± SEM of 3-6 individual samples tested in duplicate.  
<sup>a</sup>P< 0.0005, <sup>b</sup>P<0.005, <sup>c</sup>P<0.01 when compared to the same parameter in 2-month-old rats.

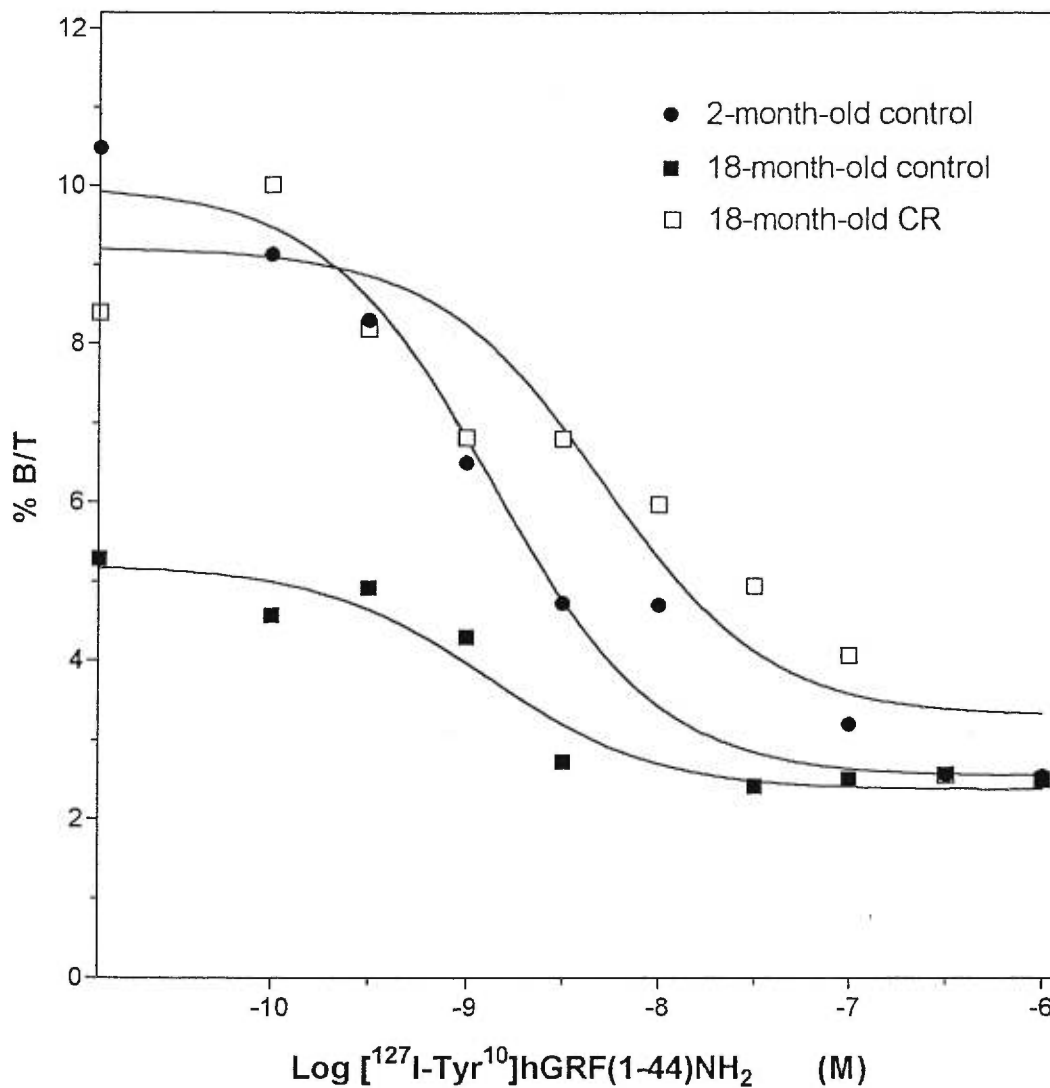


Figure 1. Representative  $[^{125}\text{I}]\text{GRF}$  binding profile in anterior pituitary homogenates from 2-month-old control (●), 18 month-old control (■) and 18-month-old CR rats (□). Data were expressed as the ratio of specific binding, corrected for 72 ug prot., over the total amount of radioligand added (B/T).

- 3.2 Girard N, Boulanger L, Denis, S, Gaudreau P (1998). Differential *In Vivo* regulation of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor by GHRH in young and aged rats. *Endocrinology*. Sous presse.**

**Differential *In Vivo* regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor by GHRH in young and aged rats**

NATHALIE GIRARD, LUCE BOULANGER, STÉPHAN DENIS AND  
PIERRETTE GAUDREAU

Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, CHUM Research Center, Campus Notre-Dame and Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Correspondence and requests for reprints should be addressed to: Dr Pierrette Gaudreau, Neuroendocrinology Laboratory, Louis-Charles Simard Research Center, Notre-Dame Hospital, Rm M-5226, 1560 east Sherbrooke street, Montreal, Quebec, Canada, H2L 4M1

Tel: (514) 281-6000 extension 7159

Fax: (514) 896-4762

e-mail: [gaudreap@ere.umontreal.ca](mailto:gaudreap@ere.umontreal.ca)

Running title: Regulation of the pituitary GHRH receptor by GHRH in young and aged rats

## Abstract

In aging, alterations of pituitary GH-releasing hormone (GHRH) receptor (GHRH-R)-binding sites have been proposed as one of the initiating factors contributing to the loss of somatotroph responsiveness to GHRH. Changes in the characteristics and/or the concentrations of functional GHRH-R could take place in the course of aging and reduce the sensitivity of the somatotroph axis to GHRH. Because a chronic exposure to GHRH has been proposed to resensitize aged somatotroph cells, a better knowledge of its effects on the regulation of the somatotroph axis is required, particularly at the level of GHRH-R. Two- and 18-month-old male Sprague-Dawley rats were treated for 14 days with a daily sc injection of 0.5 or 1.0 mg/kg BW human GHRH (1-29)NH<sub>2</sub> or saline. In 2-month-old rats, treatment with 0.5 mg/kg GHRH increased the number of high affinity pituitary GHRH-R binding site by 2-fold ( $P < 0.05$ ) and hypothalamic somatostatin (SRIF) content by 45% ( $P < 0.05$ ). It did not affect hypothalamic GHRH content, serum total insulin-like growth factor I (IGF-I), or body weight gain. Treatment with 1.0 mg/kg GHRH decreased the number of high affinity pituitary GHRH-R binding sites by 2.4-fold compared with that in rats treated with 0.5 mg/kg BW ( $P < 0.05$ ) and increased hypothalamic SRIF content by 45% ( $P < 0.05$ ), but did not affect GHRH content. It also decreased circulating levels of IGF-I by 13% ( $P < 0.05$ ) and slowed the growth rate by 17% ( $P < 0.05$ ). In 18-month-old rats, treatment with 0.5 mg/kg GHRH for 14 days was not sufficient to rejuvenate GHRH binding parameters. However, treatment with 1.0 mg/kg GHRH restored the affinities of high and low affinity classes of GHRH-binding sites to values similar to those found in 2-month-old rats. Binding capacities of the high and low affinity classes of sites were increased by 1.8 and 3-fold, respectively, although significance was only reached for the low affinity site ( $P < 0.05$ ). These changes were associated with a normalization of the level of 2.5-kb GHRH-R messenger RNA transcript, which was decreased by 31% in aging rats ( $P < 0.05$ ), and by a trend for an increase in the 4-kb GHRH-R messenger RNA transcript, which was already increased by 49% in 18-month-old rats ( $P < 0.05$ ). A normalization of serum IGF-I levels, which were decreased by 11% in 18-month-old control rats ( $P < 0.01$ ), was also observed. No treatment effect was detected on body weight or hypothalamic SRIF and

GHRH contents. We conclude that a 14-day administration of GHRH induces a differential GHRH-R-mediated regulation at the level of the pituitary and probably the hypothalamus as a function of age.



## Introduction

In the anterior pituitary, GH pulsatile release is under the dual control of two hypothalamic peptides: GH-releasing hormone (GHRH) and somatostatin (SRIF) (1). These peptides stimulate specific  $G_s$  and  $G_i$  protein-coupled plasma membrane receptors on somatotroph cells (2, 3). The resulting activation of adenylate cyclase and production of cAMP constitute the primary events leading to GH secretion and synthesis (4, 5).

In mammals, middle and late adulthood is characterized by a decrease in spontaneous and stimulated GH secretion and circulating levels of insulin-like growth factor I (IGF-I). It is thought that these endocrine changes are responsible for a diminution of muscle mass, an increase of adipose tissue mass, and a deterioration of several tissue and organ functions (6-9). It has been hypothesized that the age-related decline of GH secretion, and consequently IGF-I, results more from a decreased responsiveness of the somatotrophs to GHRH (6, 10-13) than a defect in the mechanisms of GH release (14). In 24-month-old rats, it has been partly related to a decrease in both GHRH hypothalamic content (15, 16) and gene expression (16), but not to a loss of GHRH-containing neurons (15). The contribution of hypothalamic SRIF to decreased GH secretion remains controversial, as divergent results were reported on levels of messenger RNA (mRNA) expression, peptide content, and release (10-12, 15, 17-19). We have shown that a significant diminution of the maximal GHRH-induced GH response appears *in vitro* and *in vivo* in male rats around 12 months of age (10). This is accompanied by an approximately 15% decrease in pituitary GH mRNA levels (17), which is not translated to a decrease in the immunoreactive content (10). In 20- to 24-month-old rats, the GHRH-induced GH response is severely depressed (10), and GH mRNA levels and immunoreactive content are diminished by 50% (17) and 30% (10), respectively. Alterations of pituitary GHRH receptor (GHRH-R)-binding sites, starting around 8 months of age in male rats, have been proposed as one of the initiating factors contributing to the loss of somatotroph responsiveness to GHRH in aging (20, 21). In 18-month-old rats, this leads to a blunting of the high affinity GHRH-R binding sites and a reduction of the total

number of binding sites (20, 21). In addition, a 45% reduction of the maximal GHRH-induced cAMP production is seen in 20- to 24-month-old rats (22). Changes in the characteristics and/or the concentrations of functional GHRH-R could therefore take place in the course of aging and reduce the sensitivity of the somatotroph axis to GHRH.

One strategy to resensitize aged somatotroph cells could be the stimulation of *de novo* synthesis of pituitary GHRH-R by a chronic *in vivo* administration of GHRH. In aged men, the effects of chronic treatment with GHRH include an increase in GHRH-stimulated release of GH and mean 24-h GH levels (23-25). In young and aged rats, variable results for GH mRNA levels and GH secretion have been reported after GHRH treatment depending upon sex, dosage, and route, frequency, and duration of administration (23, 26-29).

Because new therapeutic applications may be developed in the near future for GHRH, a better knowledge of its chronic effects on the regulation of the somatotroph axis is required. To understand the desensitization/resensitization mechanisms of the somatotroph axis to GHRH, particularly through GHRH-R regulation, 2- and 18-month-old male rats were treated with either 0.5 or 1.0 mg/kg BW human (h) GHRH(1-29)NH<sub>2</sub>, sc, for 14 days. Pituitary GHRH-R binding parameters and mRNA levels were examined and immunoreactive hypothalamic GHRH and SRIF contents and serum total IGF-1 concentrations were measured.

## Materials and Methods

### *Animals and experimental procedures*

Two- and 18-month-old male Sprague-Dawley rats (Camm Research Laboratory Animals, Wayne, NJ) were housed in Plexiglas cages in groups of four and two, respectively, under controlled temperature (22 C), humidity (65%), and lighting (cycles of 12 hrs; lights on at 0700 h) conditions. Chow and water were available *ad libitum*. After 2-3 days of acclimatization to our animal facilities, the rats were weighted to determine hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> dosage and reweighted after 7 days of treatment to readjust it. In the first experiment, 2-month-old rats received in the back a daily sc injection of 0.5 or 1.0 mg/kg BW hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> (GHRH) for 14 days between 0815-0900 h. In the second experiment, 18-month-old rats received a daily sc injection of 0.5 or 1.0 mg/kg BW of the peptide: hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> (synthesized in our laboratory) (30) was solubilized in physiological saline each morning and kept on ice until administration. Control 2- and 18-month-old rats received an isovolumetric amount of saline. The doses of GHRH were selected on the basis of our previous data indicating that sc administration of 1.0 mg/kg BW hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> to 2-month-old male Sprague-Dawley rats induces a GH peak equivalent to that obtained with the iv GHRH dose of 3 µg/kg BW (approximate ED<sub>50</sub>). Rats were killed by decapitation, in a block design fashion, 24 hrs after the last injection. The animal protocol was approved by the animal care committee of Notre-Dame Hospital Research Center in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

### *Tissue handling*

For binding assays, the anterior pituitaries were collected in ice-cold 50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.4, containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM EDTA and used within 15 min. For determination of GHRH-R mRNA levels and hypopyhalamic GHRH and SRIF immunoreactive contents, tissues were snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80 C until use. For determination of total IGF-I immunoreactive concentrations, trunk blood was collected, and serum was kept at -80 C.

### *Binding assay*

Tissue preparation and cold saturation studies were performed as previously reported, using [ $^{125}$ I-Tyr $^{10}$ ] hGHRH (1-44) NH $_2$  ([ $^{125}$ I]GHRH; 2000 Ci/mmol, purchased from Amersham Canada, Oakville, Canada) as radioligand (20, 21). For each saturation curve, two anterior pituitaries from 2-month-old rats and one anterior pituitary from an 18-month-old rat were homogenized for 8-10 sec, with a microultrasonic cell disrupter (Kontes, Vineland, NJ), in 0.5 ml ice-cold 50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.4, containing 5 mM MgCl $_2$  and 5 mM EDTA. The homogenates were further diluted to 1.3 ml, and 50  $\mu$ l of this preparation were used in each assay tube [51-85  $\mu$ g protein, as determined by the Lowry method (31)] with 35-50 pM [ $^{125}$ I]GHRH and increasing concentrations of [ $^{27}$ I-Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$  (0.1-1000 nM) in a total volume of 300  $\mu$ l of Tris-acetate, pH 7.4 containing 5 mM MgCl $_2$ , 5 mM EDTA, and 0.42% BSA. Incubations were carried out at 23 C for 60 min and were stopped by centrifugation (12,000 x g, 5 min, 4 C). Nonspecific binding was determined in presence of 1.0  $\mu$ M rat (r) .HRH(1-29)NH $_2$ . [ $^{127}$ I-Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$  and rGHRH(1-29)NH $_2$  were synthesized in our laboratory (30). In the first experiment, percentages of specific binding were 76 $\pm$ 1%, 76 $\pm$ 2% and 76 $\pm$ 1% for 2-month-old control rats, 2-month-old rats treated with 0.5 mg/kg BW GHRH, and 2-month-old rats treated with 1.0 mg/kg BW GHRH, respectively. In the second experiment, they were 70 $\pm$ 1%, 66 $\pm$ 1%, 68 $\pm$ 1%, and 69 $\pm$ 1% for 2-month-old control rats, 18-month-old control rats, 18-month-old rats treated with 0.5 mg/kg BW GHRH, and 18-month-old rats treated with 1.0 mg/kg BW GHRH, respectively. Control pituitaries from 2-month-old rats were always assayed along with those of 2-month-old treated rats, whereas control pituitaries from 2- and 18-month-old rats were assayed with those of 18-month-old treated rats.

### *RIAs*

Each hypothalamus was homogenized in 0.1 N acetic acid, boiled 10 min, and centrifuged (12,000 x g, 30 min, 4 C). Immunoreactive contents of GHRH and SRIF were determined in supernatants using commercial RIA kits (Advanced

Chemtech, Inc., Louisville, KY) and were expressed per mg protein (31). The sensitivities of the GHRH and SRIF assays were 2.5 and 4.0 pg/tube, respectively. Serum total IGF-I concentrations were measured after acid-ethanol treatment, using a commercial RIA kit (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX). The sensitivity of the assay was 21 ng/ml. For each RIA, all samples from each experiment were determined in duplicate in a single assay. Intraassay coefficients of variation were 4.4%, 4.4%, and 6.1% for GHRH, SRIF, and total IGF-I, respectively.

#### *Northern blot hybridization*

Total RNA was isolated from each anterior pituitary using a single step acid guanidinium-phenol/chloroform procedure with Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Aliquots of 18 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] solution. They were subjected to electrophoresis on 1.2% agarose gels containing 17.5% formaldehyde, using a 33 mM MOPS buffer, pH 7.0, containing 5 mM sodium acetate and 1 mM EDTA (pH 8.0). RNA was transferred by capillary elution to a nylon membrane (GeneScreen, NEN Research Products, Boston, MA) and covalently attached by UV cross-linking (Stratagene, La Jolla, CA) and heating (80 C, 2 hrs). Blots were hybridized with the RPR-64 complementary DNA (cDNA) specific for the rat GHRH-R (2). The probe was labeled with [<sup>32</sup>P]deoxy-CTP (Amersham Canada), using random hexamer primers and the Klenow fragment of *Esheria coli* DNA polymerase (Life Technologies, Burlington, Canada) and purified by chromatography, using a G-50 column (Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Quebec). Hybridization was performed overnight at 42 C in 50% formamide, 5xSSC (1x SSC = 150 mM NaCl and 15 mM Na citrate, pH 7.0), 10% dextran sulfate, 1x Denhart's reagent, 20mM Tris (pH 7.5), 1% SDS and 100 µg/ml DNA salmon sperm. Membranes were subsequently washed (2xSSC-1% SDS, room temperature; 1xSSC-1% SDS, 65 C; 0.5xSSC-1% SDS, 65 C; 30 min each time) and exposed to Kodak XAR film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) at -80 C, for 24 h with an intensifying screen. The membranes were then stripped in a boiling aqueous solution of 0.1% SDS and sequentially

rehybridized with a 1.2 kb rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and 28S ribosomal RNA probes (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Amounts of GHRH-R mRNA were normalized in each lane with GAPDH. Compared with the expression levels of 28S ribosomal RNA, GAPDH mRNA levels were constant in all our experimental conditions.

#### *Data analysis*

The Ligand program was used to analyze cold saturation studies (32). The F test was used to compare the goodness of the fit between the one-site model, corrected or not for nonspecific binding, and the two-site model. If the F test indicated that  $P > 0.05$ , the less complex model was accepted as the model that better fit the experimental data. The sum of the square error values for the three models along with their corresponding degree of freedom were used to define the F value. As quantification of each GHRH-R mRNA transcript, visible in the anterior pituitary as a doublet at about 2.5 and 4 kb, could not be performed independently with accuracy even after overnight gel migration, the total densities of each doublet at 2.5 and 4 kb were determined using an IS1000 Digital imaging system (Alpha Innotech Corp./Canberra Packard, Montreal, Canada). Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM. The statistical significance of differences was determined by unpaired Student's *t* test and was established at  $P < 0.05$ .

## Results

### *Body weight*

In the first experiment, 2-month-old control rats increased their body weight (BW) by 40% (initial BW,  $245 \pm 3$  g; final BW,  $342 \pm 7$  g; ( $P < 0.005$ )) during the 14-day treatment with GHRH, whereas 2-month-old rats treated with 0.5 or 1.0 mg/kg GHRH increased their BW by 35% and 33%, respectively (initial BW,  $251 \pm 2$  and  $250 \pm 3$  g; final BW,  $339 \pm 6$  and  $333 \pm 6$  g, respectively). The rats treated with the higher dose of GHRH had a 17% slower growth rate than the controls ( $P < 0.05$ ).

In the second experiment, 2-month-old control rats increased their BW by 45% (initial BW,  $222 \pm 1$  g; final BW,  $321 \pm 4$  g; ( $P < 0.05$ )) over the 14-day treatment with GHRH, whereas 18-month-old control rats or rats treated with 0.5 or 1.0 mg/kg GHRH exhibited only a slight weight gain. Their respective BW increased by 4 %, 7 % and 6 % (initial BW,  $689 \pm 11$ ,  $702 \pm 22$  and  $679 \pm 6$  g; final BW,  $718 \pm 14$ ,  $752 \pm 23$ , and  $717 \pm 10$  g). No significant difference was observed between 18-month-old control and treated rats.

### *Anterior pituitary GHRH binding parameters*

The effect of a 14-day daily sc administration of GHRH on pituitary GHRH binding parameters in 2-month-old rats is shown in Table 1. As previously reported (20, 21), coanalysis of binding data derived from cold saturation studies revealed the presence of high and low affinity classes of binding sites in this tissue. Administration of 0.5 or 1.0 mg/kg GHRH did not alter the preference of the Ligand program for the two-site model ( $P < 0.05$ ) and did not significantly affect the  $K_{d1}$ ,  $K_{d2}$ , or  $B_{max2}$  values. However, it differentially regulated the binding capacity ( $B_{max}$ ) of the high affinity class of sites depending upon the dose of GHRH. Treatment with 0.5 mg/kg GHRH increased the  $B_{max1}$  by 2-fold compared with that in control rats ( $P < 0.05$ ), whereas treatment with 1.0 mg/kg GHRH decreased the  $B_{max1}$  by 2.4-fold compared with that of rats treated with 0.5 mg/kg GHRH ( $P < 0.05$ ).

The effect of 14-day daily sc administration of GHRH on pituitary binding parameters in 18-month-old rats is summarized in Table 2 and Fig. 3. As previously reported (20, 21), the two-site model was no longer preferred in 18-month-old control rats. In this group, the high affinity site was blunted and the  $K_d$  was 159 times lower than the  $K_{d1}$  and 11 times higher than the  $K_{d2}$  in pituitaries from 2-month-old control rat (Table 2;  $P < 0.01$ ). Moreover, the total number of binding sites was 10 times lower than that in 2-month-old control rats (Table 2;  $P < 0.01$ ). As observed in 2-month-old rats, [ $^{125}$ I]GHRH binding parameters were differentially regulated by GHRH treatment, depending upon dosage. Pituitaries from 18-month-old rats treated with 0.5 mg/kg GHRH exhibited one class of binding sites, similarly to their age-matched controls. As in 18-month-old control rats, the high affinity site was blunted. The  $K_d$  was 103 times lower than the  $K_{d1}$  and 17 times higher than the  $K_{d2}$  of pituitaries from 2-month-old control rats (Table 2;  $P < 0.01$ ). The total number of binding sites was 22 times lower than that in 2-month-old control rats (Table 2;  $P < 0.01$ ). In addition, the  $K_d$  and  $B_{max}$  appeared diminished compared with those for pituitaries from 18-month-old control rats ( $P < 0.05$ ). In pituitaries from 18-month-old treated with 1.0 mg/kg GHRH, analysis of the data showed a significant preference for the two-site model ( $P < 0.05$ ).  $K_{d1}$  and  $K_{d2}$  values reverted to those observed in pituitaries from 2-month-old control rat and were different from the  $K_d$  of 18-month-old control rats or rats treated with 0.5 mg/kg GHRH ( $P < 0.01$ ). In addition, the  $B_{max1}$  and  $B_{max2}$  were increased by 1.8 and 3-fold, respectively, compared with those of pituitaries from 2-month-old control rats. However, only the  $B_{max2}$  value reached significance ( $P < 0.01$ ).

#### *Anterior pituitary GHRH receptor mRNA levels*

Quantification of mRNA levels performed by the IS1000 digital imaging system showed a linear increase of signals with the amount of RNA loaded, within the range of 5-35  $\mu$ g total RNA, for the 2.5- and 4-kb GHRH-R mRNA doublets, GAPDH mRNA and 28S ribosomal RNA (data not shown). As shown in Fig. 1, the presence of approximately 2.5- and 4-kb GHRH-R mRNA transcripts (doublet) was detected in the anterior pituitaries of 2- and 18-month-old rats. In



pituitaries from 18-month-old control rats, the relative intensity of the 2.5 kb doublet decreased by 31% ( $P<0.05$ ), and that of the 4-kb doublet increased by 49% compared with those of 2-month-old control rats ( $P<0.05$ ) (Figs. 1, 2). Combined levels of 2.5- and 4-kb transcripts were not significantly different in these two groups.

In 18-month-old rats, the effect of a 14-day daily sc administration of 1.0 mg/kg GHRH on levels of 2.5- and 4-kb GHRH-R mRNA transcripts is shown in Figs. 1 and 2. The intensity of the 2.5-kb doublet was normalized to that of pituitaries from 2-month-old control rats and increased by 35% ( $P<0.05$ ) compared with pituitaries from 18-month-old controls. The intensity of the 4-kb doublet was increased by 126% compared with that in pituitaries from 2-month-old control rats ( $P<0.02$ ) and by 51% compared with that in pituitaries from 18-month-old control rats, although this increase did not reach significance. Combined levels of 2.5- and 4-kb transcripts were increased by 36% in 18-month-old treated rats compared with those in 18-month-old controls ( $P<0.05$ ).

*Immunoreactive hypothalamic GHRH and SRIF contents and serum total IGF-I concentration.*

As shown in Table 3, a 14-day daily sc administration of 0.5 and 1.0 mg/kg GHRH had no significant effect on hypothalamic GHRH content of 2-month-old rats. However, it increased the hypothalamic SRIF content by 45% ( $P<0.05$ ). Serum total IGF-I concentration was not significantly altered by a 14-day daily sc administration of 0.5 mg/kg GHRH, but was decreased by 13 % by a 1.0 mg/kg GHRH treatment ( $P<0.05$ ). As also shown in Table 4, no significant changes in hypothalamic GHRH and SRIF contents were observed between 2-, 18-month-old control and 18-month-old treated rats. However, serum total IGF-I concentration was decreased by 12% in 18-month-old control rats compared with that in 2-month-old controls ( $P<0.01$ ) and was normalized by a 14-day daily sc administration of 1.0 mg/kg GHRH.

## Discussion

In aged men, chronic administration of GHRH has been shown to increase GH secretion and circulating levels of IGF-I (23-25). In 14-month-old female, but not male, Sprague-Dawley rats, 3-day treatment with rGHRH(1-43)OH (5 µg/rat/day, subdivided in three iv injections delivered at 0800, 1400, and 2000 h) elicited a slight, but unequivocal, priming effect on the *in vitro* subsequent GHRH-induced cAMP maximal response (28). However, this priming effect was not sufficient to impact on GHRH-induced GH secretion in cultured anterior pituitary cells (28). In 2-month-old male and female Sprague-Dawley rats, the same GHRH treatment was shown to significantly decrease the subsequent *in vitro* response to GHRH (28). In the present study we report the description of a model of hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> administration in 18-month-old male Sprague-Dawley rats that successfully mimics GHRH treatment in aged men, as serum total IGF-I levels were normalized to those in 2-month-old rats.

Analysis of the regulation of the somatotroph axis by 14-day administration of GHRH revealed striking differences between young and aged male rats. In 2-month-old rats, administration of 0.5 mg/kg GHRH significantly increased the number of high affinity pituitary GHRH-R binding sites. Treatment with 1.0 mg/kg GHRH probably also induced a short period of up-regulation, followed by an observable process of down-regulation at the end of the treatment. These results indicate that depending upon its circulating level, GHRH is capable to up- or down-regulate its own receptor. Horikawa *et al.* (33) and Miki *et al.* (34) reported modulatory effects of GHRH on pituitary GHRH-R expression in neonatal or 3-month-old rats. The first group demonstrated that passive immunization with GHRH decreased GHRH-R mRNA levels. The second group showed that a pharmacologically induced GHRH deficiency led to an increase in GHRH-R mRNA levels, whereas replacement therapy normalized GHRH-R mRNA levels to those in control rats. In addition, Bilezikijan *et al.* reported that incubation of 2-month-old rat primary pituitary cells with GHRH induced a 50% reduction of GHRH binding sites (35), whereas Wehrenberg *et al.* showed down-regulation of pituitary GHRH-R binding sites by iv infusions of GHRH (60-900 µg/kg BW) (36). Aleppo *et al.* showed that in pituitary cell cultures from 2-month-old rats, GHRH inhibits the production of its own receptor by a receptor-

mediated, cAMP-dependent reduction of GHRH-R mRNA accumulation (37). As studies from the Mayo Clinic indicate that the cloned GHRH-R, probably originating from a 2.5 mRNA transcript, exhibits high affinity binding and functionality (2), our data suggest that in 2-month-old rats, the GHRH-R high affinity binding site is more sensitive to up- and down-regulation by circulating levels of GHRH than the low affinity site. The mechanisms of action of GHRH on rat GHRH-R gene expression or GHRH-R mRNA stability, however, remain to be investigated.

Treatment with 0.5 mg/kg also induced a 45% increase in hypothalamic SRIF content, but had no effect on GHRH content. This negative feedback counterbalanced a potential increase in GH secretion resulting from up-regulated GHRH-R high affinity binding sites and did not lead to a significant reduction of IGF-I circulating levels and BW gain. Interestingly, treatment with 1 mg/kg GHRH induced a 45 % increase in hypothalamic SRIF content and down-regulation of pituitary GHRH-R high affinity binding sites, leading to a significant reduction of IGF-I circulating levels and BW gain. The resulting peripheral endocrine and metabolic effects that we observed after chronic treatment with 1 mg/kg BW GHRH were similar to those reported by Kovacs *et al* (38), using treatment with a GHRH-R antagonist. Young rats, treated for 2 weeks with [Ibu<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Phe(4-Cl)<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>]hGHRH(1-28)Agm exhibited a 21% reduction of body weight gain, a 15% decrease in serum IGF-I levels, and a 48% diminution of pituitary GHRH-R concentration (38). Together, these data reinforce the important sensor role of the pituitary GHRH-R in the maintenance of a functional somatotroph axis. At the central level, our results suggest the existence of functional GHRH-R on hypothalamic SRIF neurons that would be activated by exogenous GHRH or one of its bioactive metabolites and involved in a negative feedback mechanism of GH secretion. Although the presence of GHRH-R mRNA has been reported in the periventricular, arcuate, and ventromedial nuclei of the hypothalamus (39), its precise localization on SRIF neurons will have to be established.

In 18-month-old rats, administration of 0.5 mg/kg GHRH for 14 days was not sufficient to rejuvenate GHRH binding parameters. Interestingly, treatment with

1.0 mg/kg GHRH restored the high and low affinity class of GHRH binding sites, leading to binding affinities similar to those observed in 2-month-old rats. This GHRH treatment also increased the binding capacity of the high and low affinity classes of sites; however, significance was only reached for the low affinity site. These changes were associated with a normalization of the 2.5-kb GHRH-R mRNA transcript, which is decreased in aging rats, and by a trend for an increase in the 4-kb pituitary GHRH-R mRNA transcript, which is already increased in aged rats, thus resulting in an increase in combined levels of transcripts. This suggests that GHRH can stimulate *de novo* synthesis of high and low affinity GHRH-R binding sites in aged rats. Whether they represent the 2.5- and the 4.0-kb GHRH-R mRNA transcripts, respectively, requires further investigation. These sites, however, seem to exhibit a different level of sensitivity to regulation by circulating levels of GHRH compared with those of 2-month-old pituitaries. Elucidation of transcriptional and/or posttranscriptional mechanisms regulating the expression of high and low affinity pituitary GHRH-R binding sites in aging and by GHRH administration in aged rats will now be required. Among the numerous transcription factors regulating GHRH-R expression, the pituitary-specific factor Pit-1 has been shown to be essential (40). Although, no difference of Pit-1 mRNA levels has been reported in the pituitaries of 70-day-old and 12-month-old rat (41), it will be necessary to determine Pit-1 protein and mRNA concentrations in older rats treated, or not, with GHRH.

At the hypothalamic level, the sensitive negative feedback GHRH mechanism seen in 2 month-old rats did not seem to operate in 18-month-old rats. Thus, 14-day administration of 1.0 mg/kg BW GHRH was not sufficient to increase SRIF hypothalamic content and counteract the effects of GHRH. The resulting peripheral effect of this GHRH treatment was therefore a normalization of circulating IGF-I, with no effect on BW. Similarly, De Geranno Colonna *et al.* reported the presence of GH negative feedback effects on hypothalamic GHRH and SRIF mRNA levels of 8-month-old, but not 20-month-old, rats, submitted to 4-day treatment with hGH (125 µg, ip, twice daily) (42). These results were interpreted as diminished sensitivity of the GHRH and SRIF neurons to GH, related to either altered GH receptor signalling processes or peptide gene

expression (42). Whether hypothalamic GHRH-R characteristic/concentration and /or signalling pathways are altered in aging rats remains to be investigated.

Together, our results indicate that a 14-day sc administration of GHRH differentially regulates the high and low affinity classes of pituitary GHRH-R binding sites and GHRH-R mRNA transcripts in 2- and 18-month-old male rats depending upon dosage. It might be hypothesized that different cellular mechanisms are triggered in the somatotroph depending upon the abundance and functional state of plasma membrane GHRH-R and the intensity and duration of GHRH-R stimulation. For example, a high level of GHRH-R stimulation could induce massive internalization of GHRH-R, leading to decreased levels of intracellular cAMP, phosphorylated CREB, and GHRH-R gene expression (43), whereas a moderate level of GHRH-R stimulation may not affect normal GHRH-R internalization processes, thus leading to increased levels of the intracellular messengers responsible for GHRH-R gene expression.

Chronic administration of GHRH to rejuvenate the somatotroph axis in aging mammals therefore appears to be an attractive replacement therapy, as appropriate dosage and duration of treatment should normalize the pituitary high affinity GHRH-R binding site concentration and serum IGF-I levels without affecting hypothalamic GHRH and SRIF functions. However, optimal conditions of long term replacement therapy will have to be developed as a function of age and based upon residual somatotroph function.

**Acknowledgements**

We thank Dr. Kelly E. Mayo (Department of Biochemistry, Molecular Biology and Cell Biology, Northwestern University, Evanston, IL) for providing the RPR-64 rGHRH-R cDNA, and Dr. Pierre Chartrand (University of Montreal, Montreal, Canada) for the supply of GAPDH cDNA. This work was supported by the Medical Research Council of Canada. LB was recipient of a studentship from the Faculty of Graduate Studies of the University of Montreal. PG is recipient of a scholarship from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec".

## References

1. **Tannenbaum GS, Ling N** 1984 The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm and GH secretion. *Endocrinology* 115: 1952-1957.
2. **Mayo KE** 1992 Molecular cloning and expression of a pituitary specific receptor for growth hormone-releasing factor. *Mol Endocrinol* 6: 1734-1744.
3. **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.
4. **Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale W, Rosenfeld MG, Evans RM:** Independent effects of growth hormone-releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 1985; 314: 279-281.
5. **Bilezikjian LM, Vale W** 1983 Stimulation of adenosine 3', 5' monophosphate production by growth hormone-releasing factor and somatostatin in anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 113: 1726-17313.
6. **Corpas E, Harman M, Blackman MR** 1993 Human growth hormone and human aging. *Endocrine Rev* 14: 20-39.
7. **Rudman D** 1985 Growth hormone, body composition and aging. *J Am Geriatric Soc* 33: 800-807.
8. **Borst SE, Millard WJ, Lowenthal DT** 1994 Growth hormone, exercise and aging: the future of therapy for the frail elderly. *J Am Geriatric Soc* 42: 528-435.
9. **Meites J, Goya RG, Takahashi S** 1987 Why the neuroendocrine system is important in aging processes. *Exp Gerontol* 22: 1-15.
10. **Deslauriers N, Gaudreau P, Aribat T, Renier G, Petitclerc D and Brazeau P** 1991 Dynamics of growth hormone responsiveness to growth hormone-releasing factor in aging rats: peripheral and central influences. *Neuroendocrinology* 53: 439-446.

11. **Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J** 1980 Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology* 107: 1875-1879.
12. **Takahashi S, Gottschall PE, Quigley KL , Goya RG, Meites J** 1987 Growth hormone secretory pattern in young, middle-age and old female rats. *Neuroendocrinology* 46: 137-142.
13. **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.
14. **Walker RF, Yang SW, Bercu BB** 1991 Robust growth hormone secretion in aged female rats co-administered GH-releasing hexapeptide (GHRP-6) and growth hormone-releasing factor. *Life Sci* 49: 1499-1504.
15. **Morimoto N, Kawakami F, Makino S, Chibara K, Hasegawa M, Iyata Y** 1988 Age-related changes in growth hormone-releasing factor and somatostatin in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 47: 459-464.
16. **De Gennaro Colonna V, Zoli M, Cocchi D, Maggi A, Marrama P, Agnati F, Müller EE** 1989 Reduced growth hormone-releasing factor (GHRF)-like immunoreactivity and GHRF gene expression in the hypothalamus of aged rats. *Peptides* 10: 705-708.
17. **Martinoli MG, Ouellet J, Rhéaume J, Pelletier G** 1991 Growth-hormone and somatostatin gene expression in adult and aging rats as measured by quantitative in situ hybridization. *Neuroendocrinology* 54: 607-615.
18. **Sonntag WE, Boyd RL, Boozee RM** 1990 Somatostatin gene expression in hypothalamus and cortex of aging male rats. *Neurobiol Aging* 11: 409-416.
19. **Sonntag WE, Gottschall PE, Meites** 1986 Increased secretion of somatostatin 28 from hypothalamic neurons of aged rat in vitro. *Brain Res* 380: 229-234.
20. **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.



21. **Lefrançois L, Boulanger L, Gaudreau P** 1995 Effects of aging on pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites: in vitro mimicry by guanyl nucleotides and reducing agents. *Brain Res* 673: 39-46.
22. **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.
23. **Iovino M, Monteleone P, Steardo L** 1989 Repetitive growth hormone-releasing hormone administration restores the attenuated growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone testing in normal aging. *J Clin Endocrinol Metab* 69:910-913.
24. **Corpas E, Harman SM, Pineyro MA, Roberson R, Blackman MR** 1992 Growth hormone (GH)-releasing hormone (1-29) twice daily reverses the decreased GH and insulin-like growth factor-I levels in old men. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 530-5.
25. **Vittone J, Blackman MR, Busby-Whitehead J, Tsiao C, Stewart KJ, Tobin J, Stevens T, Bellantoni MF, Rogers MA, Baumann G, Roth J, Harman SM, Spencer RG** 1997 Effects of a single nightly injections of growth hormone-releasing hormone (GHRH 1-29) in healthy elderly men. *Metabolism: Clin Exp* 46: 89-96.
26. **Hu Z, Friberg RD, Barkan AL** 1993 Ontogeny of GH mRNA and secretion in male and female rats: regulation by GH-releasing hormone. *Am J Physiol* 265: E236-242.
27. **Sato M, Murao K, Niimi M, Tamaki M, Takahara J** 1993 Effects of long-term infusion of growth hormone (GH)-releasing factor on pulsatile GH secretion in the male rat. *Life Sci* 54: 79-86.
28. **Parenti M, Dall' Ara A, Rusconi L, Cocchi D, Muller EE** 1987 Different regulation of GHRH-sensitive adenylate cyclase in the anterior pituitary of young and old rats. *Endocrinology* 121: 1649-1653.
29. **Kovacs M, Fancsik A, Hrabovsky E, Mezo I, Teplan I, Flerko B** 1995 Effects of continuous and repetitive administration of a potent analog of GH-RH (1-30)NH<sub>2</sub> on the GH release in rats treated with monosodium glutamate. *J Neuroendocrinology* 7: 703-712.

30. **Gaudreau P, Boulanger L, Aribat T** 1992 Affinity of human growth hormone-releasing factor (1-29)NH<sub>2</sub> analogues for GRF binding sites in rat adenopituitary. *J Biol Chem* 35: 1864-1869.
31. **Lowry DH, Rosebrough NJ, Farr AL** 1951 Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
32. **Munson PJ, Rodbard D** 1980 LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 107: 220-239.
33. **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.
34. **Miki N, Ono M, Murata Y, Ohsaki E, Tamitsu K, Yamada M, Demura H** 1996 Regulation of pituitary growth hormone-releasing factor (GRF) receptor gene expression by GRF. *Biochem Biophys Res Comm* 224: 586-590.
35. **Bilezikjian LM, Seifert H, Vale W** 1986 Desensitization to growth hormone releasing factor (GRF) is associated with down-regulation of GRF-binding sites. *Endocrinology* 118: 2045-2052.
36. **Wehrenberg WB, Seifert H, Bilezikjan LM, Vale W** 1986 Down-regulation of growth hormone-releasing factor receptors following continuous infusion of growth hormone-releasing factor in vivo. *Neuroendocrinology* 43: 266-268.
37. **Aleppo G, Moskal II SF, De grandis PA, Kineman RD, Frohman LA** 1997 Homologous down-regulation of growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 138: 1058-1065.
38. **Kovacs M, Zarandi M, Halmos G, Groot K, Shally AV** 1996 Effects of acute and chronic administration of a new potent antagonist of growth hormone-releasing hormone in rats: mechanisms of action. *Endocrinology* 137: 5364-5369.
39. **Takahashi T, Okimura O, Yoshimura K, Shigeyoshi Y, Kaji H, Abe H, Chihara K** 1995 Regional distribution of growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor mRNA in the rat brain. *Endocrinology* 136: 4721-4724.

40. **Lin C, Lin S-C, Chang C-P, Rosenfeld MG** 1992 Pit-1 dependent expression of the receptor for growth hormone-releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360: 765-768.
41. **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.
42. **De Gennaro Colona V, Fidone F, Cocchi D, Müller EE** 1996 Feedback effects of growth hormone on growth hormone-releasing factor and somatostatin are not evident in aged rats. *Neurobiol Aging* 14: 503-507.
43. **Mayo KE, Godfrey PA, Suhr ST, Kulik DJ, Rahal JO** 1995 Growth hormone-releasing hormone: synthesis and signaling. *Recent Prog Horm Res* 50:35-73.

**TABLE 1.** Estimate of GHRH binding parameters in pituitary homogenates from 2-month-old rats: effect of a daily sc administration of hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> for 14 days.

Group	K <sub>d1</sub> (nM)	K <sub>d2</sub> (nM)	B <sub>max1</sub> (fmol/mg protein)	B <sub>max2</sub> (pmol/mg protein)
2-month-old control	0.33 ± 0.04	564 ± 63	64 ± 7	54 ± 5
2-month-old 0.5 mg/kg GHRH	0.58 ± 0.14	567 ± 112	131 ± 29 <sup>a</sup>	70 ± 12
2-month-old 1.0 mg/kg GHRH	0.28 ± 0.07	734 ± 176	55 ± 11 <sup>b</sup>	60 ± 13

Estimates of binding parameters were derived from cold saturation studies. Values represent the mean ± SEM of three to four independent experiments performed in triplicate or duplicate.

<sup>a</sup> *P* < 0.05 when compared to B<sub>max1</sub> in control pituitaries

<sup>b</sup> *P* < 0.05 when compared to B<sub>max1</sub> in pituitaries from rats treated with 0.5 mg/kg GHRH

**TABLE 2.** Estimate of GHRH binding parameters in pituitary homogenates from 2- and 18-month-old rats: effect of a daily sc administration of hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> for 14 days in 18-month-old rats.

Group	K <sub>d1</sub> (nM)	K <sub>d2</sub> (nM)	K <sub>d</sub> (nM)	B <sub>max1</sub> (fmol/mg protein)	B <sub>max2</sub> (pmol/mg protein)	B <sub>max</sub> (pmol/mg protein)
2-month-old control	0.31 ± 0.14	541 ± 112		43 ± 16	100 ± 19	
18-month-old control			49.2 ± 3.6 <sup>a</sup>			9.70 ± 0.69 <sup>b</sup>
18-month-old 0.5 mg/kg GHRH			32.1 ± 4.6 <sup>a,c</sup>			4.60 ± 0.74 <sup>b,d</sup>
18-month-old 1.0 mg/kg GHRH	0.62 ± 0.14 <sup>e</sup>	714 ± 40 <sup>e</sup>		78 ± 17 <sup>f</sup>	302 ± 15 <sup>f,g</sup>	

Estimates of binding parameters were derived from cold saturation studies. Values represent the mean ± SEM of three to six independent experiments performed in triplicate or duplicate.

<sup>a</sup>  $P < 0.01$  when compared to K<sub>d1</sub> or K<sub>d2</sub> in 2-month-old control pituitaries

<sup>b</sup>  $P < 0.01$  when compared to B<sub>max1</sub> and B<sub>max2</sub> in 2-month-old control pituitaries

<sup>c</sup>  $P < 0.05$  when compared to K<sub>d</sub> in 18-month-old control pituitaries

<sup>d</sup>  $P < 0.05$  when compared to B<sub>max</sub> in 18-month-old control pituitaries

<sup>e</sup>  $P < 0.01$  when compared to K<sub>d</sub> in 18-month-old control pituitaries and pituitaries from rats treated with 0.5 mg/kg GHRH

<sup>f</sup>  $P < 0.01$  when compared to B<sub>max</sub> in 18-month-old control pituitaries and pituitaries from rats treated with 0.5 mg/kg GHRH

<sup>g</sup>  $P < 0.01$  when compared to B<sub>max2</sub> in 2-month-old control pituitaries

**TABLE 3.** Immunoreactive hypothalamic GHRH and SRIF contents and serum total IGF-1 concentration in 2-month-old rats: effect of a daily sc administration of hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> for 14 days.

Group	GHRH (ng/mg protein)	SRIF (ng/mg protein)	IGF-I (ng/ml)
2-month-old control	2.00 ± 0.40	20.2 ± 3.0	1758 ± 90
2-month-old 0.5 mg/kg GHRH	2.70 ± 0.33	29.3 ± 2.4 <sup>a</sup>	1677 ± 81
2-month-old 1.0 mg/kg GHRH	2.29 ± 0.41	29.4 ± 4.2 <sup>a</sup>	1537 ± 52 <sup>a</sup>

Values represent the mean ± SEM of six to eight individual determinations, performed in duplicate.  
<sup>a</sup> *P* < 0.05 when compared to 2-month-old rats

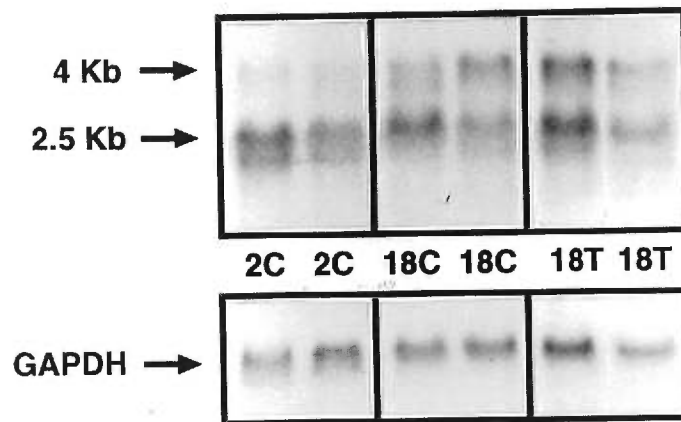
**TABLE 4.** Immunoreactive hypothalamic GHRH and SRIF contents and serum total IGF-1 concentration in 2- and 18-month-old rats: effect of a daily sc administration of hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> for 14 days in 18-month-old rats.

Group	GHRH (ng/mg protein)	SRIF (ng/mg protein)	IGF-I (ng/ml)
2-month-old control	2.91 ± 0.51	20.8 ± 3.6	1800 ± 29
18-month-old control	3.78 ± 0.43	26.0 ± 3.1	1585 ± 111 <sup>a</sup>
18-month-old 1.0 mg/kg GHRH	2.98 ± 0.63	19.2 ± 4.4	1818 ± 64 <sup>b</sup>

Values represent the mean±SEM of six to eight individual determinations, performed in duplicate.

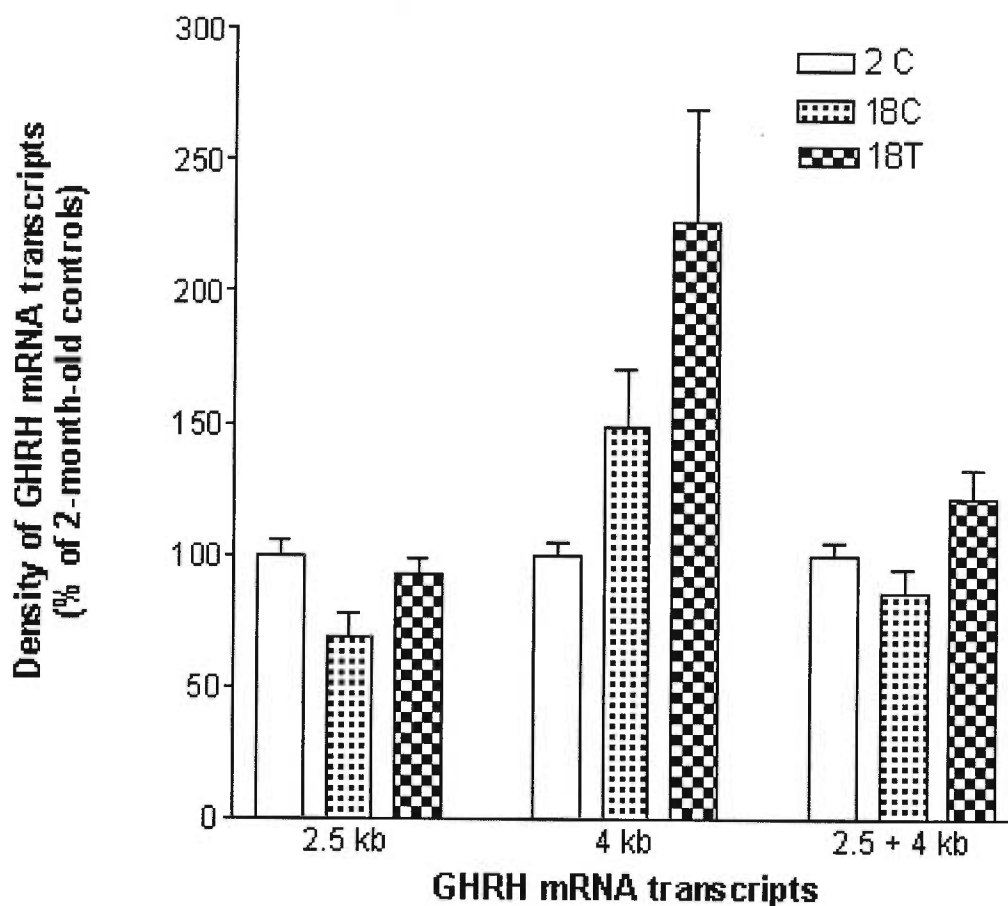
<sup>a</sup>P < 0.05 when compared to 2-month-old rats

<sup>b</sup>P < 0.01 when compared to 18-month-old rats



**Figure 1.** Northern blot autoradiographic analysis of pituitary GHRH-R mRNA levels in 2-month-old control (2 C), 18-month-old control (18 C) and 18-month-old treated (18 T) rats with 1.0 mg/kg GHRH.



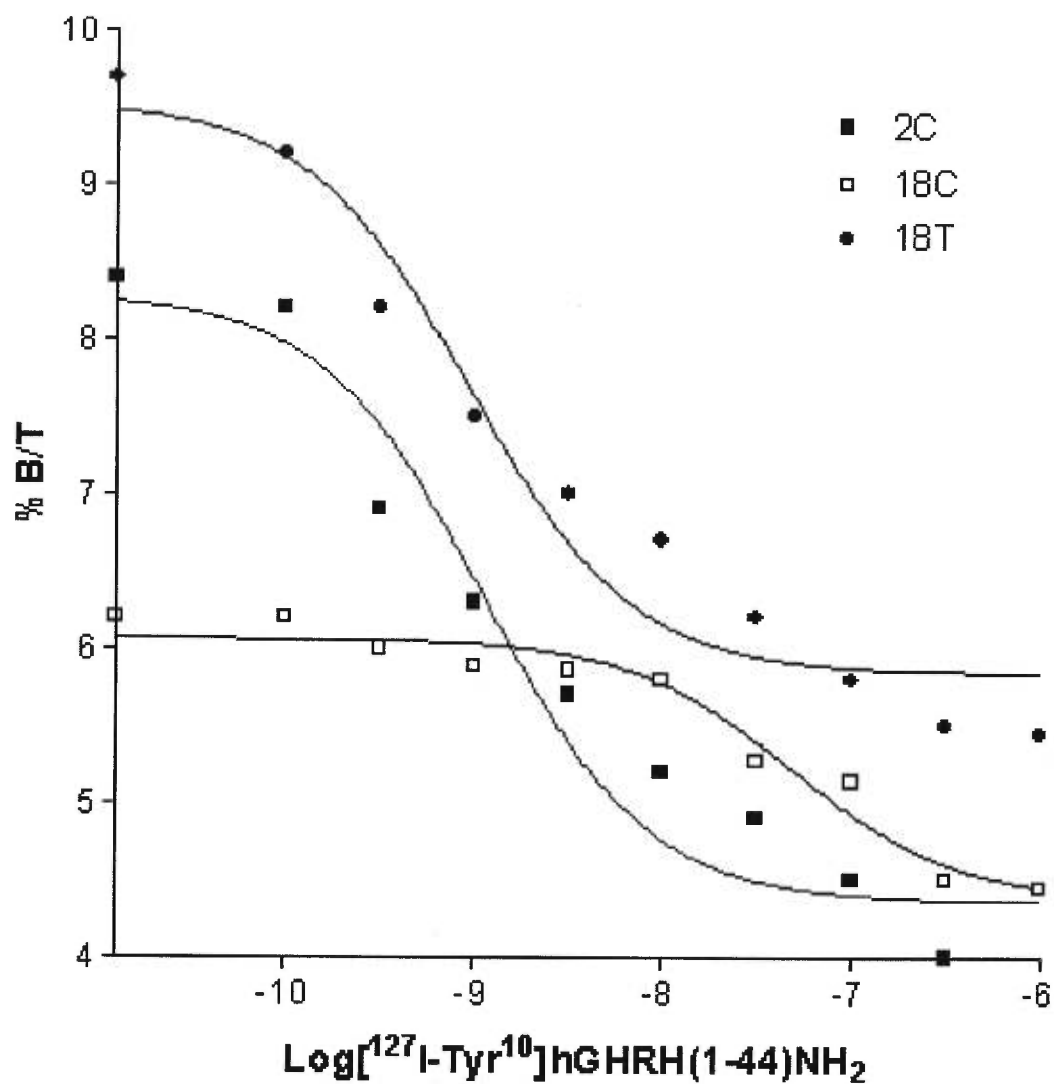


**Figure 2.** Densities of pituitary GHRH-R mRNA transcripts in 2-month-old control rats (2 C), 18-month-old control rats (18 C) and 18-month-old rats treated with 1.0 mg/kg GHRH (18 T).

Data were expressed as a percentage of the 2-month-old control values in arbitrary density units and represent the mean  $\pm$  SEM of four individual samples performed in duplicate for each group.

\*,  $P < 0.05$  when 2.5- or 4- kb transcripts from 18-month-old control rats were compared with those from 2-month-old control rats or when combined densities of 2.5- and 4-kb transcripts from 18-month-old treated rats were compared with those of 18-month-old control rats.

\*\*,  $P < 0.02$  when the 4-kb transcript from 18-month-old treated rats was compared with that from 2-month-old control rats.



**Figure 3.** Representative  $[^{125}\text{I}]\text{GHRH}$  binding profile in anterior pituitary homogenates from 2-month-old control rats (■; 2 C), 18-month-old control rats (□; 18 C), and 18-month-old rats treated with 1.0 mg/kg GHRH (●; 18 T).

Data were expressed as the ratio of specific binding, corrected for 75  $\mu\text{g}$  protein, over the total amount of radioligand added (B/T).

- 3.3 Girard N, Boulanger L, Gaudreau P (1998) *In vivo* regulation of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor in aged rats: effect of a chronic treatment with thyroxine. *Endocrinology*. Soumis**

***In Vivo* Regulation of the Pituitary Growth Hormone-Releasing Factor Receptor in Aged Rats: Effect of a chronic Treatment with Thyroxine**

NATHALIE GIRARD, LUCE BOULANGER AND PIERRETTE GAUDREAU

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

Correspondence and requests for reprints should be addressed to: Dr Pierrette Gaudreau, Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, Notre-Dame Hospital Research Center, Rm M-5226, 1560 east Sherbrooke street, Montreal, Quebec, Canada, H2L 4M1

Tel: (514) 281-6000 extension 7159

Fax: (514) 896-4762

e-mail: gaudreap@ere.umontreal.ca

Running title: Regulation of the pituitary GRF receptor by T<sub>4</sub> in aging

## Abstract

A reduction of growth hormone (GH) spontaneous and GRF-stimulated release are observed in aged rats, together with a diminution of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and thyroxine ( $T_4$ ) circulating levels. Although GH release is primarily regulated by the opposing action of hypothalamic growth hormone-releasing factor (GRF) and somatostatin on their pituitary receptors, other hormones such as thyroid hormones exert direct and indirect modulatory effects on the GRF-GH-IGF-1 axis. Because surgically- or chemically-induced hypothyroidism, such as aging, cause alterations of pituitary GRF-R leading to a reduction of GH/IGF-1 secretion, we investigated the effect of a 14-day  $T_4$  replacement therapy, on the pituitary GRF-R, serum IGF-1 levels and hypothalamic GRF contents of 18-month-old male Sprague-Dawley rats. A 14-day-treatment with the physiological dose of 2 mg  $T_4$ /100g bw, administered subcutaneously, normalized their circulating levels of total  $T_4$  and IGF-1 to that of 2-month-old rats, without affecting body weight. In 18-month-old rat pituitaries, alterations of  $^{125}\text{I}$ -hGRF(1-44) $\text{NH}_2$  binding parameters were visible for the high and low affinity classes of GRF binding sites. The high affinity class of sites was blunted and the  $K_d$  was 39 times lower than the  $K_{d1}$  from 2-month-old control rat pituitaries ( $P < 0.005$ ). Only 11% of the total number of binding sites found in 2-month-old rat pituitaries were detectable in 18-month-old controls ( $P < 0.005$ ). In  $T_4$ -treated 18-month-old rats, the low affinity class of pituitary GRF binding sites reverted to values similar to that of 2-month-old control rats. The apparent affinity was however 1.7-fold lower than that of the  $K_{d2}$  from 2-month-old rat ( $P < 0.005$ ) and the apparent maximal binding capacity was 1.3-fold higher than that of the  $B_{\text{max}2}$  from 2-month-old rats ( $P < 0.005$ ). In this group, the high affinity class of GRF binding sites was detectable with an affinity 3.5-fold higher than that of the  $K_{d1}$  from 2-month-old rats ( $P < 0.005$ ) and an apparent maximal binding capacity 10.8-fold lower than that of the  $B_{\text{max}1}$  from 2-month-old rats ( $P < 0.005$ ). The  $T_4$ -treatment reduced the level of 2.5 and 4 kb pituitary GRF-R mRNA transcripts by 46% and 45%, respectively ( $P < 0.005$ ), compared to 18-month-old control rats. In 18-month-old rats, the GRF hypothalamic content was not significantly changed by aging or the  $T_4$ -treatment. Altogether the present results suggest that, in aged rats, the decrease of circulating levels of thyroid hormones is involved in a loss of high and

low affinity pituitary GRF-R binding sites. Thus, a normalization of serum  $T_4$  levels may exert a partial rejuvenation although its precise molecular mechanism need clarification.

## Introduction

In aging mammals, a progressive decline of the somatotrophic function is correlated with a reduction of growth hormone (GH) spontaneous and GRF-stimulated release together with a diminution of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) circulating levels. It has been proposed that these endocrine changes are responsible for a decrease of muscle mass, an increase of adipose tissue mass and a deterioration of several tissue and organ functions (1-4). In anterior pituitary somatotroph cells, GH pulsatile release is primarily regulated by the action of hypothalamic growth hormone-releasing factor (GRF) and somatostatin (SRIF) (5) upon specific Gs- and Gi-protein-coupled plasma membrane receptors (6, 7). However, other hormones such as thyroid hormones exert direct and indirect modulatory effects on the GRF-GH-IGF-1 axis. Thyroid hormones stimulate GH gene transcription (8-14), increase GH (15-17) and GH receptor (GH-R) (18-19) mRNA levels and promote GH synthesis and secretion (20-22). Although these effects contribute to enhance IGF-1 secretion, thyroid hormones exert additional permissive actions to increase IGF-1 and IGF-1 binding protein concentrations (23-24). A lack of thyroid hormone results in a fairly rapid increase of hypothalamic GRF mRNA levels (26-30) and in a decrease of the GRF immunoreactive content (25-26) resulting from an increased peptide release (26-30). On the other hand, a decrease of hypothalamic SRIF content and mRNA levels become observable only after long-term hypothyroidism (26, 31). Moreover, pituitary GRF receptor (GRF-R) but not type-2 SRIF receptor mRNA levels are rapidly diminished in the absence of physiological levels of thyroid hormones (26, 32-33).

Previous observations by us and others indicated that serum total and free  $T_4$  levels are significantly decreased in aged rats (34-36). Because surgically- or chemically-induced hypothyroidism, such as aging (34, 37, 38) cause alterations of pituitary GRF-R and consequently depress GH/IGF-1 secretion, we investigated the effect of a 14-day  $T_4$  replacement therapy, on the pituitary GRF-R, serum IGF-1 levels and hypothalamic GRF content of 18-month-old male Sprague-Dawley rats.

## Materials and Methods

### *Animals and experimental procedures*

Two and 18-month-old male Sprague-Dawley rats (Camm Research Laboratory Animals, Wayne, NJ) were housed in plexiglass cages by groups of 4 and 2 respectively, in a room under controlled temperature (22 °C), humidity (65%) and lighting (cycles of 12 hrs: lights on at 07:00). Rat chow and water were available *ad libitum*. After 2-3 days of acclimatization to our animal facilities, the rats were weighted to determine thyroxine ( $T_4$ ) dosage and weighted again after 7 days of treatment to readjust it. Treated 18-month-old rats received in the back a daily subcutaneous (sc) injection of 2 ug/100g body weight (bw) L-thyroxine sodium salt (Sigma Chemical Co, St-Louis, MO) for 14 days, between 08:15-09:00 hrs.  $T_4$  was dissolved in 50% propyleneglycol and diluted 4 times with  $3.3 \times 10^{-3}$  N NaOH before sc administration. Two- and 18-month-old control animals received an isovolumetric amount of the vehicle. The dosage of  $T_4$  chosen was described by Miki *et al.* as a physiological dosage for a replacement therapy (30, 33). Rats were sacrificed by decapitation 24 hrs after the last injection. The animal protocol was approved by the Animal Care Committee of Notre-Dame Hospital Research Center, in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

### *Tissue handling*

Some anterior pituitaries were collected in ice-cold 50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.4, containing 5 mM  $MgCl_2$  and 5 mM EDTA and used within 15 min to perform the GRF binding assay. Other pituitaries and whole hypothalami were snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C, to respectively determine GRF-R mRNA levels and GRF immunoreactive contents. Blood was also collected and sera were kept at -80°C for determination of total  $T_4$  and total IGF-1 immunoreactive levels.



### *Binding assay*

Tissue preparation and cold saturation studies were performed as previously reported, using [ $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{10}$ ] hGRF (1-44) NH $_2$  ([ $^{125}\text{I}$ ]GRF; 2000 Ci / mmol, purchased from Amersham Canada, Oakville, Ontario) as radioligand (34, 37, 38). For each saturation curve, 2 anterior pituitaries from 2-month-old rats and 1 anterior pituitary from 18-month-old rats were homogenized for 8-10 sec, with a micro ultrasonic cell disruptor (Kontes, Vineland, NJ), in 0.5 ml of ice-cold 50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.4, containing 5 mM MgCl $_2$  and 5 mM EDTA. The homogenates were further diluted to 1.3 ml and 50 ml of this preparation was used in each assay tube (40-101 mg prot., as determined by the Lowry method (39)) with 35-50 pM [ $^{125}\text{I}$ ]GRF and increasing concentrations of [ $^{127}\text{I}$ -Tyr $^{10}$ ]hGRF(1-44)NH $_2$  (0.1-1000 nM), in a total volume of 300 ml of Tris-acetate, pH 7.4 containing 5 mM MgCl $_2$ , 5 mM EDTA and 0.42% bovine serum albumin. Incubations were carried out at 23°C for 60 min and stopped by centrifugation (12000g, 5 min, 4°C). Non-specific binding was determined in presence of 1.0 mM rGRF(1-29)NH $_2$ . [ $^{127}\text{I}$ -Tyr $^{10}$ ]hGRF(1-44)NH $_2$  and rGRF(1-29)NH $_2$  were synthesized in our laboratory (40). Percentages of specific binding were respectively 70 $\pm$ 2%, 67 $\pm$ 5% and 67 $\pm$ 2% for 2-month-old control rats, 18-month-old control rats and 18-month-old rats treated with 2 mg/100 g bw T $_4$ . Control pituitaries from 2- and 18-month-old rats were always assayed along with those of 18-month-old treated rats.

### *Radioimmunoassays*

Each hypothalamus was homogenized in 0.1 N acetic acid, boiled 10 min and centrifuged (12000 g, 30 min, 4°C). Immunoreactive contents of GRF was determined in supernatants, using a commercial RIA kit (Advanced Chemtech, Louisville, KY) and expressed per mg protein (39). The sensitivity of the GRF assay was 2.5 pg/tube. Serum total IGF-1 concentrations were measured after acid-ethanol treatment, using a commercial RIA kit (Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, TX). The sensitivity of the assay was 21 ng/ml. Serum total T $_4$  concentrations were measured using a commercial RIA kit (Immunocorp Sci Inc, Montreal, Canada). The sensitivity of the assay was 3.9

nmol/l. For each RIA, all samples were determined in duplicate, in a single assay. Intra-assay coefficients of variation were respectively 4.4%, 6.2% and 6.1% for GRF, T<sub>4</sub> and IGF-1.

#### *Northern blot hybridization*

Total RNA was isolated from each anterior pituitary using a single step acid guanidinium-phenol/chloroform procedure with Trizol (Gibco BRL Life Technology, Gaithersburg, MD). Aliquots of 18 mg of 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) solution and subjected to electrophoresis on 1.2% agarose gels containing 17.5% formaldehyde and using a 33 mM MOPS buffer, pH 7.0, containing 5 mM sodium acetate and 1 mM EDTA (pH 8.0). RNA was transferred by capillarity to a nylon membrane (GeneScreen, NEN Research Products, Boston, MA) and covalently attached by UV cross-linking (Stratagene, La Jolla, CA) and heating (80°C, 2 hrs). The blots of pituitary RNA were hybridized with the RPR-64 cDNA specific for the rat GRF-R (6). The probe was labelled with [<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham Canada, Oakville, Ontario), using random hexamer primers and the Klenow fragment of *E coli* DNA polymerase (Gibco/Life Technologies, Burlington, Ontario) and, purified by chromatography using a G-50 column (Pharmacia Biotechnology, Baie d'Urfé, Quebec). Hybridization was performed overnight at 42 °C, in 50% formamide, 5xSSC (1x SSC: 150 mM NaCl, 15 mM Na citrate, pH 7.0), 10% dextran sulfate, 1x Denhart's reagent, 20mM Tris pH 7.5, 1% sodium dodecyl sulfate and 100 mg/ml DNA salmon sperm. Membranes were subsequently washed (2xSSC/1% SDS, RT; 1xSSC/1% SDS, 65°C; 0.5xSSC/1% SDS, 65°C, 30 min each) and exposed to Kodak XAR films (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) at -80°C, for 24 hrs with an intensifying screen. The membranes were then stripped in a boiling aqueous solution of 0.1% SDS and rehybridized with a 1.2 kb rat GAPDH and 28S rRNA probes (American Type Culture Collection, Rochville, MD). Amounts of GRF-R mRNA were normalized in each lane with GAPDH. When compared to the expression levels of 28S rRNA, GAPDH mRNA levels were constant in all our experimental conditions.

### *Data analysis*

The LIGAND program was used to analyse cold saturation studies (41). The *F*-test was used to compare the goodness of the fit between the one-site (corrected or not for non-specific binding) and the two-site models. If the *F*-test indicated that the probability value was greater than 0.05, the less complex model was accepted as the model which better fitted the experimental data. The sum of the square error values for the three models along with their corresponding degree of freedom were used to define the *F* value. Quantification of mRNA levels was performed using an IS1000 Digital imaging system (Alpha Innotech Corp/Canberra Packard, Montreal, Canada). Statistical significance of differences was determined by the unpaired Student's *t*-test. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM.

## Results

### *Body weight and Immunoreactive serum total $T_4$ concentration*

The 2-month-old control rats increased their body weight (bw) by 43 % (initial bw,  $245 \pm 4$  g, final bw,  $351 \pm 6$  g) ( $P < 0.005$ ) during the 14 day-treatment with  $T_4$  whereas the 18-month-old control and treated rats did not exhibit a significant change of weight over the same period (initial bw were  $707 \pm 8$  and  $705 \pm 11$  g and final bw,  $671 \pm 8$  and  $653 \pm 12$  g, for control and treated rats respectively).

Efficacy of the hormonal treatment was ascertained in 18-month-old rats by determining their serum total  $T_4$  levels in comparison to those of 18- and 2-month-old control rats (Table 1). Aged rats exhibited a 23% reduction of  $T_4$  levels compared to 2-month-old rats ( $P < 0.05$ ). The 14 day-treatment with 2 mg/100g bw  $T_4$  normalized their levels to those of 2-month-old control rats.

### *Anterior pituitary GRF binding parameters*

Table 2 summarizes the effect of a 14-day daily sc administration of  $T_4$  on pituitary GRF binding parameters of 18-month-old rats, compared to those of 18- and 2-month-old controls. As previously reported (34, 37, 38), co-analysis of binding data derived from cold saturation studies revealed the presence of high and low affinity classes of binding sites in 2-month-old control rat pituitaries. In 18-month-old rat pituitaries, the two-site model was no longer preferred. The high affinity GRF binding site was blunted and the  $K_d$  was 39 times lower than the  $K_{d1}$  from the 2-month-old control rat pituitaries ( $P < 0.005$ ). Moreover, only 11% of the total number of binding sites found in 2-month-old rat pituitaries were detectable in 18-month-old controls ( $P < 0.005$ ). In treated aged rats, co-analysis of the binding data indicated a significant preference for the two-site model ( $P < 0.05$ ). The low affinity class of sites reverted to values similar to that of 2-month-old rats, although the apparent affinity was 1.7-fold lower than their  $K_{d2}$  ( $P < 0.005$ ) and the apparent maximal binding capacity was 1.3-fold higher than their  $B_{max2}$  ( $P < 0.005$ ). The high affinity class of sites exhibited more drastic changes of binding characteristics. The apparent affinity was 3.5-fold higher than the  $K_{d1}$  of 2-month-

old rats ( $P < 0.005$ ) and the apparent maximal binding capacity was 10.8-fold lower than their  $B_{\max 1}$  ( $P < 0.005$ ).

#### *Anterior pituitary GRF receptor mRNA levels*

As shown in Figs. 2 and 3, the 14-day treatment of 18-month-old rats with  $T_4$  reduced the level of the 2.5 kb GRF-R mRNA transcript by 46% ( $P < 0.005$ ) and that of the 4 kb transcript by 45% ( $P < 0.005$ ), compared to 18-month-old control rats.

#### *Immunoreactive hypothalamic GRF content and serum total IGF-1 concentration*

The effect of a 14-day daily sc administration of  $T_4$  on serum total IGF-1 and hypothalamic GRF content are shown in Table 1. IGF-1 circulating concentrations were decreased by 19% in 18-month-old control rats compared to 2-month-old control rats. The hormonal treatment normalized them to that of 2-month-old rats. GRF hypothalamic contents were not significantly altered by aging or the  $T_4$  treatment in aged rats.

## Discussion

The present study examined the effects of a 14-day treatment with thyroxine, on the regulation of pituitary GRF-R in aged male rats and its impact on hypothalamic GRF contents and serum IGF-1 levels. Miki *et al.* have reported that a dose-range of 1-2 mg  $T_4$ /100g bw administered subcutaneously represents a physiological and effective regimen for a replacement therapy in young hypothyroid rats (30, 33). For example, a treatment with 2 mg/100g bw for 7 to 14 days normalized their weight gain, serum  $T_4$  levels, hypothalamic GRF contents and increased their serum IGF-1 levels from 61% to 86% of control levels (30). A treatment with 2 mg/100g bw for 7 or 14 days increased the GH content of thyroidectomized rats from 1 to 46% and 1 to 82% of control pituitaries, respectively (30). Finally, a treatment with 1 mg/100g bw for 5 days was effective to increase the density of protected GRF-R mRNA bands of hypothyroid rats from 61% to 86% of control pituitaries (33).

Quigley *et al.* have reported a 40% decrease of serum free  $T_4$  levels in 17.5-18.5-month-old male rats compared to 5.5-6.5-month-old animals (35). Girard *et al.* have found a 60% and 37% reduction of serum total and free  $T_4$  serum levels, respectively, in 18-month-old male rats compared to 2-month-old rats (34). In the present study, a 23% decrease of serum total  $T_4$  levels was observed in 18-month-old male rats, which was normalized by subcutaneous administration of 2 mg  $T_4$ /100g bw for 14 days, without affecting body weight. This hormonal therapy was also effective to normalize IGF-1 circulating levels to those of young rats, suggesting a restoration of the somatotroph axis functionality.

Although the moderate hypothyroid status of aged rats contrasts with the severe hypothyroidism induced in young rats by a chemical or surgical thyroidectomy, the effects of a normalization of  $T_4$  levels on the pituitary GRF-R may be compared. In 2-month-old rats, chemically-induced hypothyroidism drastically reduces the maximal binding capacity of high and low affinity  $^{125}I$ -GRF binding sites (personal unpublished results) and decreases the abundance of the 2.5 and 4 kb pituitary GRF-R mRNA transcripts (26). Because a  $T_4$  replacement therapy has a significant impact on the restoration of pituitary GRF-R mRNA levels, it was

proposed that thyroid hormones exert a direct positive effect on GRF-R gene expression (26, 33). Along with that, Godfrey and Mayo have reported a nucleotide sequence for consensus thyroid hormone responsive element (TRE) in the 5'-flanking promoter region of the rat GRF-R gene (42). Such TRE was not identified in the 2 kb of 5'-flanking region of the human GRF-R gene (43). In 18-month-old rats, it could be proposed that aged-induced hypothyroidism is at least partly responsible for the loss of high affinity GRF-R binding sites and apparent reduction of the total number of sites. However, the  $T_4$  therapy could only induce the synthesis of a low level of *de novo* high affinity GRF-R binding sites while it restored the low affinity GRF-R binding sites to a level similar to that of young rats. These results could not be explained by corresponding increased of GRF-R mRNA transcript levels. On the contrary, the 14-day treatment with  $T_4$  depressed GRF-R mRNA levels. A first possible mechanism to explain such a result would be that other TRE exist on the GRF-R gene, exerting opposite temporal effects on transcription levels of the GRF-R, depending in aged rats, upon the status of others hormonal factors. At the present time, no other TRE apart from that reported by Godfrey and Mayo (42) has however been identified in the rat GRF-R gene structure. Another possibility is that the transcription level and/or rate of the GRF-R gene are similar in aged control and treated rats, but that the  $T_4$  treatment increased the translational rate of GRF-R mRNA. In such a case, it would appear that the mechanism is more efficient to promote the synthesis of low affinity GRF-R binding sites. Since studies from Mayo indicate that the cloned GRF-R, likely originating from a 2.5 mRNA transcript, exhibits high affinity binding and functionality (6), whether or not this level of high affinity GRF-R binding sites is sufficient to normalize circulating levels of GH and consequently IGF-1 remains to be further explored. However, since GH content are not depressed in 18-month-old male rats (44), it might be suggested that the activation of these functional receptors would be sufficient to increase enough GH serum levels to achieve normalization of circulating concentrations of IGF-1. Finally, while in hypothyroid young rats, a feedback, due to a suppression of pituitary GH synthesis (30), is exerted at the hypothalamus level and lead to an increased synthesis and release of GRF (25-30), in aged-induced moderate hypothyroidism, GRF content are not altered.

Altogether the present results suggest that, in 18-month-old rats, the decrease of circulating levels of thyroid hormones is involved in a loss of high and low affinity pituitary GRF-R binding sites. Thus, a normalization of serum  $T_4$  levels may exert a partial rejuvenation of GRF-R although the precise molecular mechanism of this hormonal action needs clarification. Finally, it will be of interest to investigate whether or not longer treatment periods, with a physiological dosage of  $T_4$ , could induce stronger beneficial effects in aging mammals.



**Acknowledgements**

We wish to thank Dr Kelly E Mayo (Department of Biochemistry, Molecular Biology and Cell Biology, Northwestern University, Evanston, IL) for providing the RPR-64 cDNA and Dr Pierre Chartrand (University of Montreal, Montreal, Canada) for the supply of GAPDH cDNA. This work was supported by the Medical Research Council of Canada. LB was recipient of a studentship from the Faculty of Graduate Studies of the University of Montreal. PG is recipient of a scholarship from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec".

## References

1. **Corpas E, Harman M, Blackman MR** 1993 Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev* 14: 20-39.
2. **Rudman D** 1985 Growth hormone, body composition and aging. *J Am Geriatr Soc* 33: 800-807.
3. **Borst SE, Millard WJ, Lowenthal DT** 1994 Growth hormone, exercise and aging: the future of therapy for the frail elderly. *J Am Geriatr Soc* 42: 528-435.
4. **Meites J, Goya RG, Takahashi S** 1987 Why the neuroendocrine system is important in aging processes. *Exp Gerontol* 22: 1-15.
5. **Tannenbaum GS, Ling N** 1984 The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm and GH secretion. *Endocrinology* 115: 1952-1957.
6. **Mayo KE** 1992 Molecular cloning and expression of a pituitary specific receptor for growth hormone-releasing factor. *Mol Endocrinol* 6: 1734-1744.
7. **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.
8. **Evans RM, Birnberg NC, Rosenfeld MG** 1982 Glucocorticoid and thyroid hormones transcriptionally regulate growth hormone gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 79: 7659-7663.
9. **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: 11744-8.
10. **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: 5670-4.
11. **Glass CK, Franco R, Weinberger C, Albert VR, Evans RM, Rosenfeld MG** 1987 A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone. *Nature* 329: 738-41.

12. **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: 887-96.
13. **Murphy D, Pardy K, Seah V, Carter D** 1992 Posttranscriptional regulation of rat growth hormone gene expression: increased message stability and nuclear polyadenylation accompany thyroid hormone depletion. *Mol Cell Biol* 12: 2624-2632.
14. **Force WR, Spindler SR** 1994 3, 5, 3'-L-triiodothyronine (thyroid hormones)-induced protein-DNA interactions in the thyroid hormone response elements and cell type-specific elements of the rat growth hormone gene revealed by in vivo dimethyl sulfate footprinting. *J Biol Chem* 269: 9682-9686.
15. **Martial JA, Baxter JD, Goodman HM, Seeburg PH** 1977 Regulation of growth hormone mRNA by thyroid and glucocorticoid hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 1816-1820.
16. **Seo H, Vassart G, Broca H, Refetoff S** 1977 Triiodothyronine stimulates specifically growth hormone mRNA in rat pituitary tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 2054-2058.
17. **Volpato CB, Nunes MT** 1994 Role of thyroid hormone in the control of growth gene expression. *Brazilian J Med Biol Res* 27: 1269-1272.
18. **Shen XY, Rodriguez-Arno J, Ross RJ** 1995 Regulation of hepatic mRNA levels for growth hormone receptor in rats with altered thyroid status. *Growth regulation* 5: 199-202.
19. **Duchamp C, Burton KA, Herpin P, Dauncey MJ** 1996 Perinatal ontogeny of porcine growth hormone receptor gene expression is modulated by thyroid status. *Eur J Endocrinol* 134: 524-531.
20. **Peake GT, Birge CA, Daughaday W** 1973 Alterations of radioimmunoassayable growth hormone and prolactin during hypothyroidism. *Endocrinology* 92: 487-93.
21. **Vale W, Vaughan J, Yamamoto, G, Spiess J, Rivier J** 1983 Effects of synthetic human pancreatic (tumor) GH releasing factor and somatostatin, triiodothyronine and dexamethasone on GH secretion in vitro. *Endocrinology* 112: 1553-5.

22. **Takeuchi A, Suzuki M, Tsuchiya S** 1978 Effect of thyroidectomy on the secretory profiles of growth hormone, thyrotropin, and corticosterone in the rat. *Endocrinol Jpn* 25: 381-390.
23. **Nanto-Salonen k, Müller HL, Hoffman AR, Vu TH, Rosenfeld RG** 1993 Mechanisms of thyroid hormone action on the insulin-like growth factor system: all thyroid hormone effects are not growth hormone mediated. *Endocrinology* 132: 781-788.
24. **Frystyk J, Gronbaek H, Skjaerbaek C, Flyvbjerg A** 1995 Effect of hyperthyroidism on circulating level of free and total IGF-1 and IGF-BPs in rats. *Am J Physiol* 269: E840-845.
25. **Katakami H, Downs TR, Frohman LA** 1986 Decreased hypothalamic growth hormone-releasing hormone content and pituitary responsiveness in hypothyroidism. *J Clin Invest* 77: 1704-1711.
26. **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.
27. **Downs TR, Chomczynski P, Frohman LA** 1990 Effects of thyroid hormone deficiency and replacement on rat hypothalamic growth hormone (GH)-releasing hormone gene expression in vivo are mediated by GH. *Endocrinology* 126: 402-408.
28. **Jones PM, Burrin JM, Ghatei MA, O'Halloran DJ, Legon S, Bloom SR** 1990 The influence of thyroid hormone status on the hypothalamo-hypophyseal growth hormone axis. *Endocrinology* 126: 1374-1379.
29. **Root AW, Shulman D, Root J, Diamond F** 1986 The interrelationships of thyroid and growth hormones: effect of growth hormone-releasing hormone in hypo- and hyperthyroid male rats. *Acta Endocrinol Suppl* 279: 367-75.
30. **Miki N, Ono M, Hizuka N, Aoki T, Demura H** 1992 Thyroid hormone modulation of the hypothalamic growth hormone (GH)-releasing factor-Pituitary GH axis in the rat. *J Clin Invest* 90:113-120.
31. **Martin D, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT, Prelot M, Kordon C, Durand** 1985 Thyroidectomy abolishes pulsatile growth hormone secretion without affecting hypothalamic somatostatin. *Neuroendocrinology* 41: 476-81.

32. **Carmignac DF, Flavell DM, Robinson IC** 1996 Pituitary growth hormone-releasing factor receptor expression in normal and dwarf rats. *Neuroendocrinology* 64: 177-185. GRF- R mRNA increase in GH deficiency by hypothyroid.
33. **Miki N, Ono M, Murata Y, Ohsaki E, Tamitsu K, Ri T, Demura H, Yamada M** 1995 Thyroid hormone regulation of gene expression of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 217: 1087-93.
34. **Girard N, Ferland G, Boulanger L, Gaudreau P** 1998 Long-term calorie restriction protects rat pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites from age-related alterations. *Neuroendocrinology* 68: 21-29.
35. **Quigley K, Goya R, Nachreiner R, Meites J** 1990 Effects of underfeeding and refeeding on GH and thyroid hormone secretion in young, middle-aged and old rats. *Exp Gerontology* 25: 447-457.
36. **Console GM, Gomez Dumm CL, Goya RG** 1995 Immunohistochemical and radioimmunological assessment of thyrotrophs in the pituitary of aging rats. *Acta Anatomica* 152:28-32.
37. **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.
38. **Lefrançois L, Boulanger L, Gaudreau P** 1995 Effects of aging on pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites: in vitro mimicry by guanyl nucleotides and reducing agents. *Brain Res* 673: 39-46.
39. **Lowry DH, Rosebrough NJ, Farr AL** 1951 Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
40. **Gaudreau P, Boulanger L, Abribat T** 1992 Affinity of human growth hormone-releasing factor (1-29)NH<sub>2</sub> analogues for GRF binding sites in rat adenopituitary. *J Med Chem* 35: 1864-1869.
41. **Munson PJ, Rodbard D** 1980 LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 107: 220-239.

42. **Godfrey PA, Mayo KE** 1995 Structure of the rat GHRH receptor gene and characterization of two receptor isoform. Program of the 77th Annual Meeting of the Endocrine Society, Washington DC, P3-129 (abstract).
43. **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.
44. **Deslauriers N, Gaudreau P, Abribat T, Renier G, Petitclerc D and Brazeau P** 1991 Dynamics of growth hormone responsiveness to growth hormone releasing factor in aging rats: peripheral and central influences. *Neuroendocrinology* 53: 439-446.

**TABLE 1.** Immunoreactive serum total T<sub>4</sub> and total IGF-1 concentrations and hypothalamic GRF contents in 18- and 2-month-old rats: effect of a 14-day sc administration of thyroxine in 18-month-old rats

Group	Total T <sub>4</sub> (ng/ml)	IGF-1 (ng/ml)	GRF (ng/mg prot.)
18-month-old control	54.7±4.2 <sup>a</sup>	1583±21 <sup>c</sup>	4.08±0.71
18-month-old treated	76.3±8.9 <sup>b</sup>	1708±116 <sup>b</sup>	4.74±0.69
2-month-old control	71.3±7.3	1954±96	5.37±0.57

Values represent the mean±SEM of 4 to 8 individual determinations, performed in duplicate.

<sup>a</sup> P < 0.05 and <sup>c</sup> P < 0.005 when compared to 2-month-old control rats.

<sup>b</sup> P < 0.05 when compared to 18-month-old control rats.

**TABLE 2.** Estimate of GRF binding parameters in pituitary homogenates from 18- and 2-month-old rats: effect of a 14 day- sc administration of thyroxine in 18-month-old rats

Group	$K_{d1}$ (nM)	$K_{d2}$ (nM)	$B_{max1}$ (fmol/mg prot.)	$B_{max2}$ (pmol/mg prot.)
18-month-old control		27±4 <sup>a</sup>	8.6±1.2 pmol/mg prot <sup>b</sup>	
18-month-old treated	0.20±0.06 <sup>c, f</sup>	574±39 <sup>c, g</sup>	18±4 <sup>d, h</sup>	100±6 <sup>e, i</sup>
2-month-old control	0.70±0.07	346±26	196±24	75±6

Estimates of binding parameters were derived from cold saturation studies.

Values represent the mean±SEM of 3 to 7 independent experiments performed in triplicate or duplicate.

<sup>a</sup>  $P < 0.005$  when compared to  $K_{d1}$  and  $K_{d2}$  in 2-month-old control pituitaries.

<sup>b</sup>  $P < 0.005$  when compared to  $B_{max1}$  and  $B_{max2}$  in 2-month-old control pituitaries.

<sup>c</sup>  $P < 0.005$  when compared to  $K_d$  in 18-month-old control pituitaries.

<sup>d</sup>  $P < 0.01$  when compared to  $B_{max}$  in 18-month-old control pituitaries.

<sup>e</sup>  $P < 0.005$  when compared to  $B_{max}$  in 18-month-old control pituitaries.

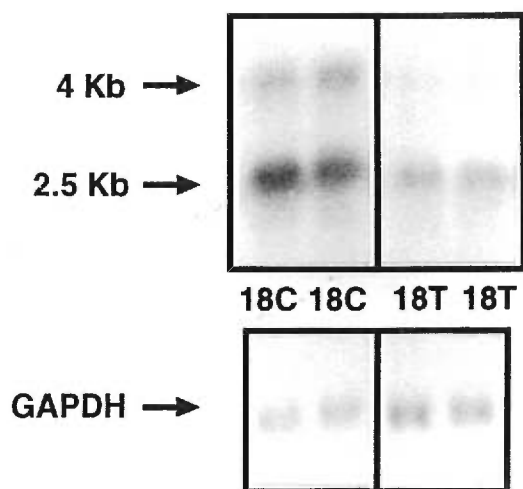
<sup>f</sup>  $P < 0.005$  when compared to  $K_{d1}$  in 2-month-old control pituitaries.

<sup>g</sup>  $P < 0.005$  when compared to  $K_{d2}$  in 2-month-old control pituitaries.

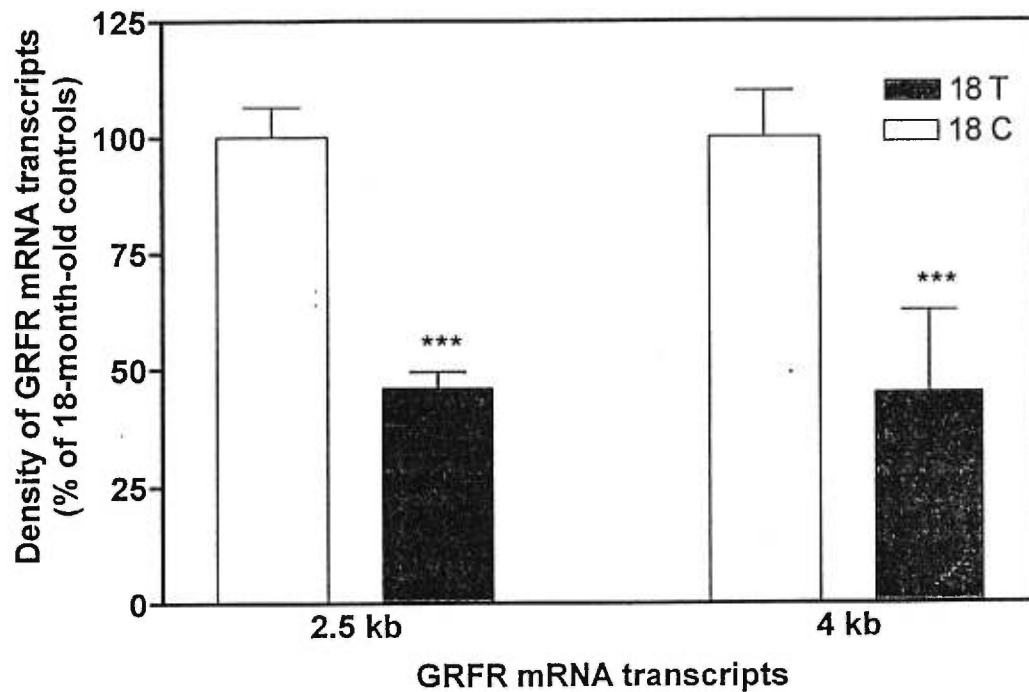
<sup>h</sup>  $P < 0.005$  when compared to  $B_{max1}$  in 2-month-old control pituitaries.

<sup>i</sup>  $P < 0.005$  when compared to  $B_{max2}$  in 2-month-old control pituitaries.





**Figure 1.** Northern blot autoradiographic analysis of pituitary GRF-R mRNA levels in 18-month-old control (18 C) and treated (18 T) rats with with 2 ug T<sub>4</sub>/kg bw.



**Figure 2.** Densities of pituitary GRF-R mRNA transcripts in 18-month-old control (18 C) and treated (T) rats with with 20 ug  $T_4$ /kg bw. Data were expressed in % of 18-month-old control values in arbitrary density units and represent mean  $\pm$  SEM of 4 individual samples performed in duplicate for each group.

\*\*\*  $P < 0.005$  when 2.5 and 4 kb transcripts from 18-month-old treated rats were compared to those of 18-month-old control rats.

## 4. DISCUSSION

Le vieillissement est associé à de nombreux changements au niveau de l'axe somatotrope qui mènent à une diminution des concentrations circulantes de GH et d'IGF-1 [Corpas *et al* (1993)]. Or, ces hormones sont essentielles pour le maintien des taux optimaux de masse musculaire, d'épaisseur de la peau, de densité osseuse et de la fonction de plusieurs organes [Corpas *et al* (1993)]. Il serait donc souhaitable de prévenir ou retarder leur diminution au cours du vieillissement.

Nous avons choisi d'utiliser le rat mâle Sprague-Dawley comme modèle. Il s'agit d'une espèce dont la longévité est seulement de 30 mois et pour laquelle l'endocrinologie et le métabolisme au cours du vieillissement sont déjà bien documentés dans la littérature. De plus, le vieillissement affecte de façon similaire la sécrétion de la GH chez l'humain et le rat.

L'altération progressive du GHRH-R constitue un des premiers facteurs déclenchant la perte de sensibilité des somatotropes au GHRH [Atribat *et al* (1991)]. Nous avons utilisé trois approches diététiques ou hormonales pour tenter de maintenir l'intégrité du GHRH-R dans le but de conserver la fonctionnalité de l'axe somatotrope chez le rat âgé.

#### **4.1 Restriction calorique modérée**

La restriction calorique modérée est considérée comme l'une des méthodes anti-vieillessement les plus efficaces. Implantée à l'âge du sevrage chez les rongeurs, elle permet de prévenir la détérioration fonctionnelle des organes et tissus reliée à l'âge, de retarder l'apparition ou la progression de pathologies et d'augmenter l'espérance de vie. Kalu *et al* (1984) ont démontré qu'une restriction calorique implantée à l'âge adulte (six mois) permet d'obtenir des résultats aussi bénéfiques, au niveau des taux circulants d'hormones parathyroïdiennes (PTH), de la densité osseuse et du contenu calcique des os, qu'une restriction calorique débutée au sevrage. Nous avons donc étudié un modèle de restriction calorique modérée de 40% implantée chez le rat adulte de huit mois. Ceci permet d'éviter des interférences de la diète avec la période de croissance rapide. Ce modèle permet également de prédire les impacts d'une

restriction calorique commencée à l'âge adulte sur le maintien de la sensibilité des somatotropes au GHRH chez les mammifères dont la vie est plus longue, comme l'humain.

Certains effets de la restriction calorique sont observés rapidement après la mise en place de la restriction. En effet, Poe *et al* (1996) ont constaté une amélioration de la microvasculature corticale des rats âgés suite à une restriction calorique de seulement 35 jours. Nous avons donc comparé les effets d'une restriction calorique de 50 jours implantée à l'âge de 16 mois chez le rat avec ceux d'une restriction calorique à long terme.

Nos résultats indiquent qu'une restriction calorique modérée de 40% débutée à l'âge de huit mois permet, chez le rat de 18 mois, de protéger les sites de liaison du GHRH contre les altérations normalement observées au cours du vieillissement. En effet, les rats de 18 mois nourris *ad libitum* ne possèdent plus la classe de sites de liaison à haute affinité qu'on suppose être le récepteur fonctionnel du GHRH [Aribat *et al* (1991); Deslauriers *et al* (1991)]. La restriction calorique permet de maintenir cette classe de site à haute affinité et de conserver des paramètres de liaison similaires à ceux des jeunes rats. D'Costa *et al* (1993) ont démontré, chez les rats de 26 mois en restriction calorique depuis l'âge de six semaines, que l'amplitude des pics de sécrétion de GH est similaire à celle observée chez des rats de huit mois. La sécrétion moyenne quotidienne de GH est donc supérieure chez les rats âgés en restriction calorique comparativement aux rats âgés nourris *ad libitum*. Cette augmentation de GH pourrait donc être due au maintien de l'intégrité du récepteur du GHRH. De futurs travaux devront toutefois confirmer que les profils de sécrétion de GH sont améliorés dans notre modèle.

Nous avons déterminé qu'une restriction calorique de 40% à court terme n'avait aucun impact sur la régulation des sites de liaison du récepteur hypophysaire du GHRH chez les rats âgés. Ceci suggère que la restriction calorique doit être mise en place avant que les altérations réceptorielles soient trop sévères car celles-ci seraient irréversibles. Une autre possibilité est que la restriction calorique doit être maintenue durant une période plus longue que 50 jours pour

avoir un impact sur le GHRH-R. Toutefois, la première hypothèse nous apparaît valable compte tenu que la restriction calorique a été proposée comme la stratégie idéale de maintien de l'homéostasie cellulaire [Yu (1994)].

Nous avons investigué certains mécanismes potentiels ayant pu contribuer au maintien des deux classes de sites de liaison du GHRH, au cours du vieillissement, chez les rats ayant été soumis à une restriction calorique de longue durée. Au niveau périphérique, nous avons vérifié si les hormones thyroïdiennes, l'IGF-1 et les taux sériques d'acides gras libres pouvaient contribuer à la régulation des sites de liaison du GHRH dans l'adénohypophyse.

Les hormones thyroïdiennes jouent un rôle important en tant que modulateurs de l'axe somatotrope. Elles stimulent la transcription et la synthèse de la GH [Evans *et al* (1982); Casanova *et al* (1985); Koenig *et al* (1987); Sap *et al* (1990)]. Tam *et al* (1996) ont également rapporté qu'un traitement avec des bloqueurs de la synthèse des hormones thyroïdiennes, résulte en une réduction de 35% et de 55% des niveaux d'ARNm du GHRH-R après une et trois semaines de traitement respectivement. De plus, une supplémentation hormonale chez des rats thyroïdectomisés permet de normaliser les niveaux d'ARNm de GHRH-R [Miki *et al* (1995)]. Boulanger *et al* (1998) ont démontré récemment qu'un traitement de trois semaines avec des bloqueurs de synthèse d'hormones thyroïdiennes induit une réduction respective de 78% et 94% des sites à haute et à basse affinité de GHRH-R. Ces résultats viennent appuyer les travaux de Godfrey et Mayo (1995) décrivant la présence d'un élément de réponse aux hormones thyroïdiennes sur le gène du GHRH-R. Les hormones thyroïdiennes sont donc essentielles pour le maintien de niveaux optimaux de GHRH-R et de la fonction somatotropique. Considérant que les taux d'hormones thyroïdiennes sont diminués chez les rats âgés [Quigley *et al* (1990)], nous avons examiné si la restriction calorique normalise les taux de T<sub>4</sub> chez les rats âgés contribuant ainsi au maintien de l'intégrité du GHRH-R. Nous n'avons constaté aucun impact de la restriction calorique sur les taux de T<sub>4</sub> libre ou totale. Ce qui suggère que cette hormone n'est pas impliquée dans le maintien de la classe des sites à haute affinité pour le GHRH observé chez les rats de 18 mois en restriction calorique. Toutefois, nous ne pouvons exclure

que les taux de conversion entre  $T_4$  et  $T_3$  ou les quantités de récepteurs de ces hormones ne soient affectés par la restriction calorique car, celle-ci affecte plusieurs activités enzymatiques [Ricketts *et al* (1985); Ward (1988) Weindruch et Walford (1988); D'Costa *et al* (1993)].

Nous avons également déterminé que la conservation des paramètres de liaison du GHRH-R, chez les rats en restriction calorique à long terme, n'est pas reliée à une diminution des taux circulants d'acides gras libres. Il a été suggéré que des altérations des sites de liaison du GHRH au cours du vieillissement puissent être, en partie, causées par une augmentation des taux sériques d'acides gras libres. *In vitro*, l'utilisation d'un acide gras hydrosoluble (l'acide caprilique) sur des cellules hypophysaires de rats, a permis d'établir qu'une concentration de 3 mM peut diminuer l'affinité de GHRH(1-29)NH<sub>2</sub> de rat de  $0.87 \pm 0.14$  à  $3.05 \pm 0.65$  nM [Rénier *et al* (1990)]. Or, les taux sériques d'acides gras libres chez les animaux de 18 mois nourris *ad libitum* ne sont pas significativement différents de ceux des rats de deux mois. De plus, les deux groupes présentaient des concentrations sériques d'acides gras libres bien en deçà des concentrations nécessaires pour affecter l'affinité des sites de liaison tel que rapporté dans l'étude de Rénier *et al* (1990). Ces évidences sont appuyées par le fait qu'une restriction calorique à court terme réduit de façon drastique les niveaux d'acides gras libres chez les rats âgés sans affecter les paramètres de liaison du GHRH.

Nous avons évalué les taux circulants d'IGF-1 afin de mesurer l'impact fonctionnel de la restriction calorique au niveau de l'axe somatotrope. Nous avons déterminé que les taux d'IGF-1 sont diminués dans les deux groupes d'animaux âgés nourris *ad libitum* et en restriction calorique en comparaison aux niveaux observés chez les rats de deux mois. Ceci ne suggère pas de régulation différentielle entre ces deux groupes de rats qui puisse expliquer les différences entre les paramètres de liaison. D'autre part, le fait que les taux circulants d'IGF-1 ne reflètent pas l'augmentation de la sécrétion de GH précédemment décrite chez les rats en restriction calorique, est en corrélation avec les résultats obtenus par Sonntag *et al* (1995). Il est possible que GH agissent plutôt directement sur différents tissus et organes pour induire une

sécrétion paracrine d'IGF-1 [Thissen *et al* (1994)] ou en améliorant la réponse tissulaire par l'augmentation du nombre de récepteurs d'IGF-1 [D'Costa *et al* (1993)]. En effet, la restriction calorique induit une augmentation de la concentration des récepteurs d'IGF-1 dans le foie, le cœur et les muscles squelettiques de rats. De plus, bien qu'il n'y ait pas d'augmentation significative des taux d'IGF-1 circulants, une action directe au niveau des organes et tissus est possible par une augmentation de l'amplitude des pics de GH qui stimule la sécrétion paracrine d'IGF-1 dans plusieurs tissus [D'Costa AP *et al* (1993)]. Nos résultats suggèrent également que les taux circulants d'IGF-1, qui exercent un rôle dans les mécanismes de rétrocontrôle de l'axe somatotrope [Berelowitz *et al* (1981); Harel et Tannenbaum (1992)], ne modulent pas les paramètres de liaison chez les rats âgés nourris *ad libitum* ou en restriction calorique.

Des modifications au niveau central pourraient également être à l'origine des modifications des paramètres de liaison du GHRH-R. Les niveaux d'ARNm et d'immunoréactivité de GHRH dans l'éminence médiane de rats de 24 mois sont diminués [Morimoto *et al* (1988); De Gennaro Colonna *et al* (1989)]. Or, il a été démontré que l'immunisation de rats nouveau-nés au GHRH conduit à une réduction d'ARNm du GHRH-R [Horikawa *et al* (1996)]. Des niveaux optimaux de GHRH semblent donc nécessaires pour maintenir les niveaux de son récepteur. Un maintien des niveaux de GHRH au cours du vieillissement chez nos animaux en restriction calorique, pourrait donc contribuer à des niveaux supérieurs de GHRH-R et à des sites de liaison comparables à ce qui est observé chez les jeunes rats. Toutefois, nous n'avons détecté de différences entre les contenus hypothalamiques immunoréactifs de GHRH chez les rats de deux et 18 mois nourris *ad libitum* [Girard *et al* (1998) : manuscrit sur le traitement chronique au GHRH]. Le GHRH ne semble donc pas avoir un rôle dans contrôle différentiel des sites de liaison du GHRH-R chez les animaux âgés.

Lors de travaux futurs, d'autres régulateurs potentiels du GHRH-R devront être évalués pour comprendre quels mécanismes cellulaires et moléculaires sont responsables du maintien de l'intégrité des sites de liaison du GHRH. Parmi ceux qui présentent un intérêt particulier, les glucocorticoïdes possèdent des



actions stimulatrices et inhibitrices sur la synthèse et la sécrétion de GH et GHRH [Mehls *et al* (1993)]. Toutefois, les effets des glucocorticoïdes sur la sécrétion de GH sont variables et complexes. L'espèce animale, le temps entre le traitement aux glucocorticoïdes et la réponse au GHRH, le fait que les études aient été faites *in vitro* en mesurant la sécrétion de GH de cellules hypophysaires ou *in vivo*, sont tous des éléments qui contribuent à la variabilité des résultats. *In vitro*, les glucocorticoïdes stimulent la synthèse et la sécrétion de GH par les cellules somatotropes [Vale *et al* (1983); Ooesterum R *et al* (1984)] en activant la transcription de GH [Tushinski *et al* (1977); Moore *et al* (1985)] et en augmentant le nombre de GHRH-R [Seifert *et al* (1985)] grâce à un élément de réponse pour leurs récepteurs situés dans la séquence promotrice du gène du GHRH-R [Tamaki *et al* (1996); Petersenn (1998)]. En traitant des cellules hypothalamiques en culture avec une dose saturante pour les récepteurs des glucocorticoïdes, Fernández-Vazquez *et al* (1995) ont observé une augmentation du contenu immunoréactif de GHRH dans ces cellules alors qu'avec des doses supérieures, ils observent plutôt une réduction. *In vivo*, ces stéroïdes possèdent également une double action sur les composantes de l'axe somatotrope. Chez l'homme, un traitement avec des doses pharmacologiques de glucocorticoïdes résulte en la suppression de la réponse hypophysaire en GH par GHRH [Kaufman *et al* (1988)]. Des doses élevées et à long terme peuvent supprimer significativement la sécrétion spontanée de GH [Pantelakis *et al* (1972)]. Toutefois, des excès modérés de glucocorticoïdes augmentent la sécrétion pulsatile de GH chez des hommes normaux [Veldhuis *et al* (1992)]. A l'inverse, Pralong *et al* (1991) ont plutôt rapporté qu'un traitement de quatre jours au dexaméthasone chez des hommes normaux, n'a pas résulté en une altération significative de sécrétion de GH. Toutefois le patron de sécrétion de la GH était altéré: les niveaux observés au cours de la journée étaient augmentés et alors que les pics nocturnes étaient atténués. Chez les rats âgés en restriction calorique, les niveaux moyens de corticostérone libre sur 24 heures sont augmentés comparativement au rats nourris *ad libitum* [Sabatino *et al* (1991)]. Ces profils différentiels supportent un rôle potentiel comme modulateur des sites de liaison du GHRH-R par la restriction calorique.

Un autre candidat potentiellement impliqué dans la régulation des sites de liaison du GHRH-R est le facteur de transcription Pit-1. Ce facteur est essentiel à la transcription du GHRH-R [Lin *et al* (1992)]. Toutefois Boulanger *et al* (1998) ont déterminé, par immunobuvardage de type Western que les niveaux de Pit-1 ne varient pas avec le vieillissement. On ne sait toutefois pas si son efficacité transcriptionnelle est altérée par le vieillissement et quel impact la restriction calorique pourrait avoir sur cette protéine.

Il sera intéressant, lors d'études futures de vérifier si les effets de la restriction calorique chez le rat et les autres espèces étudiés jusqu'à maintenant sont similaires chez des espèces dont l'espérance de vie est plus grande, dont l'humain. L'extension de l'espérance de vie maximale grâce à la restriction calorique a été rapportée chez les rats et les souris mais aussi chez les poissons, les araignées, les Daphnia et d'autres espèces non-rongeurs. Il n'y a toutefois pas d'informations définitives sur les bénéfices à long terme de la restriction calorique chez les humains. Des études en cours chez des primates (singes rhésus) suggèrent que certains effets physiologiques de la restriction calorique, qui se produisent chez les rongeurs, sont observés chez les primates. Parmi ces effets, on retrouve une diminution des niveaux de glucose sanguin et de la concentration d'insuline, une augmentation de la sensibilité à l'insuline, une diminution de la température corporelle. Ces études à long terme chez les primates et chez les humains devront être poursuivies afin de déterminer si les mécanismes de régulation de l'axe somatotrope sont similaires à ceux observés chez le rat.

Un autre champ d'études futures réside dans la modulation de macronutriments. S'il est possible de modifier la diète d'une façon moins drastique qu'en réduisant l'apport calorique de 40%, par exemple, en modifiant seulement la proportion ou le type des protéines ou des acides aminés de la diète, il serait plus facile d'adopter une diète bénéfique pour le maintien optimal de la fonction endocrine. Masoro *et al* (1989) et Iwasaki *et al* (1988) ont trouvé qu'en remplaçant les protéines alimentaires animales (caséine) par les protéines végétales (soya), dans un scénario de diète *ad libitum*, ils observent une augmentation de l'espérance de vie moyenne d'environ 15%. De plus, ce

changement du type des protéines consommées permet la modulation de certains taux hormonaux tels les niveaux sériques d'hormones parathyroïdiennes. L'importance de certains types spécifiques d'acides aminés dans la diète, a été mise en évidence dans des modèles de rat au jeûne. Le jeûne supprime de façon importante la sécrétion spontanée de GH [Tannenbaum *et al* (1979)]. Une réduction dramatique de l'ARNm préproGHRH [Bruno *et al* (1990); Bruno *et al* (1991)] serait à l'origine du moins en partie de ce phénomène. Ce dernier groupe a démontré en 1993, qu'à elle seule la quantité de protéines consommées était suffisante pour réguler les niveaux de ARNm hypothalamiques de prépro-GHRH [Bruno *et al* (1993)]. De surcroît, s'ils fournissaient exclusivement de l'histidine à des rats soumis à une diète sans protéine, ils pouvaient restaurer jusqu'à 70% des taux normaux d'ARNm. De plus, Orentreich *et al* (1993) ont démontré qu'une réduction de la concentration de L-méthionine de 0.86% à 0.17% résulte en une augmentation de l'espérance de vie de 30% chez les rats mâles Fischer 344. Donc, plusieurs pistes au niveau de certaines modulations de macronutriments intéressantes existent et doivent être examinées plus en profondeur pour déterminer les niveaux caloriques et protéiques optimaux pour le maintien d'une fonction somatotrope au cours du vieillissement.

#### **4.2 Traitement chronique au GHRH(1-29)NH<sub>2</sub> humain**

Chez le rat de huit mois, une administration de GH deux fois par jour pour une durée de quatre jours ne cause aucune modification des niveaux d'IGF-1. Par contre chez le rat de 20 mois, ce même traitement résulte en une augmentation des taux circulants d'IGF-1, menant à une normalisation des taux à des niveaux similaires à ceux des rats de 8 mois [De Gennaro Colonna *et al* (1994)]. Ces travaux suggèrent que des mécanismes de rétrocontrôle interviennent chez les animaux de huit mois, pour éviter l'augmentation exagérée des niveaux d'IGF-1 alors que le cerveau des rats âgés semble insensible aux niveaux de GH circulants. Les auteurs ont avancé que cette insensibilité apparente serait due à un effet plancher des niveaux de GH, c'est à dire que les sécrétions de la GH et de GHRH sont réduites au cours du vieillissement et, le traitement permet seulement un retour aux niveaux normaux retrouvés chez les jeunes rats. En

conséquence, ces niveaux ne sont pas suffisants pour déclencher des mécanismes de rétrocontrôle négatif hypothalamique et hypophysaire [De Gennaro Colonna *et al* (1994)]. Chez les jeunes rats Sprague-Dawley mâles, un traitement intraveineux de trois jours, avec 5 µg/rat/jour de GHRH(1-43)OH de rat, diminue l'induction maximale d'AMPc, en réponse au GHRH, par l'hypophyse [Hu *et al* (1993)]. Par contre, chez les rats femelles de quatorze mois, ce même traitement a un effet resensibilisateur faible mais non-équivoque de la réponse de AMPc induite *in vitro* par GHRH [Parenti *et al* (1987)].

Chez l'homme âgé, l'administration chronique de GHRH augmente la sécrétion de GH et les niveaux circulants d'IGF-1 [Corpas *et al* (1992); Vittone *et al* (1997)]. On observe donc, dans la littérature un certain essor des travaux dont le sujet d'étude porte sur le traitement chronique au GHRH chez l'humain. Toutefois outre les travaux mentionnés ci-haut, peu d'études sur le traitement chronique avec le GHRH ont été effectuées chez le rat âgé pour tenter de mimer et de comprendre les mécanismes impliqués dans la restauration des niveaux de GH et d'IGF-1 chez l'humain. Nous avons mis au point un modèle de traitement au GHRH(1-29)NH<sub>2</sub> humain chez le rat mâle de 18 mois qui semble reproduire un traitement au GHRH chez les hommes âgés. En effet chez ces rats âgés, les niveaux d'IGF-1 sont normalisés à des niveaux similaires à ceux observés chez les rats mâles de deux mois. Ce modèle nous permet donc d'investiguer les mécanismes impliqués dans la réponse au GHRH et il nous permet de mettre en relief les différences de régulation qui existent chez le rat jeune et âgé.

Nos études ont révélé des différences importantes entre l'impact d'un traitement chronique au GHRH chez les rats jeunes et âgés. Chez les jeunes rats, l'administration de 0.5 mg/kg de poids corporel de GHRH augmente le nombre des sites à haute affinité du GHRH-R. En considérant ces résultats et ceux de Lin *et al* (1992) qui suggèrent que GHRH peut induire la synthèse de son propre récepteur hypophysaire, il est possible que le système de transduction GHRH/GHRH-R mène à une stimulation de la transcription du facteur de transcription Pit-1. Celui-ci pourrait alors stimuler à son tour la transcription du

gène de GHRH-R et mener à une augmentation des concentrations de GHRH-R à la surface des cellules somatotropes. Une autre alternative est que l'AMPc produite lors de la stimulation du GHRH-R; induit la phosphorylation de CREB qui peut alors stimuler la transcription du gène de GHRH-R via des éléments de réponse (CRE) dans son promoteur. Des travaux futurs devront permettre d'élucider quelle hypothèse est exacte. Nous avons trouvé qu'un traitement avec 0.5 mg/kg induit également une augmentation de 46% du contenu en SRIF alors que le contenu hypothalamique en GHRH demeure inchangé par le traitement. Ce mécanisme de rétrocontrôle compense donc pour les niveaux accrus de GHRH-R et résulte en une réduction non-significative de 10% des niveaux circulants d'IGF-1 chez ces jeunes rats.

Chez les rats de deux mois injectés avec 1.0 mg/kg de GHRH, les paramètres de liaison ne sont pas significativement différents de ceux observés chez les témoins. Nous proposons que ceci reflète un mécanisme de régulation à la baisse des niveaux augmentés de GHRH-R observés chez les rats traités avec 0.5mg/kg de GHRH, suite à la présence excessive et prolongée d'une stimulation au GHRH. Il y a ainsi inhibition de la synthèse *de novo* de GHRH-R, ce qui résulte en des niveaux de GHRH-R similaires à ceux observés chez les animaux témoins. Un mécanisme de rétrocontrôle négatif est également détecté au niveau hypothalamique se traduisant par un contenu de SRIF augmenté. La combinaison d'une réduction du nombre de sites de liaison du GHRH et d'une augmentation du contenu en SRIF résulte en une diminution supplémentaire des niveaux circulants d'IGF-1 comparativement aux rats témoins. Il est intéressant de noter, chez les animaux qui ont été traités avec 1.0 mg/kg de GHRH, que les gains de poids corporels sont réduits lorsqu'on les compare avec ceux des rats contrôles et traités avec 0.5 mg/kg.

Nos résultats suggèrent donc que GHRH est en mesure de stimuler ou inhiber son propre récepteur. Ceci corrèle avec les travaux de Horikawa *et al* (1996) et Miki *et al* (1996) qui ont démontré des effets modulateurs de GHRH sur l'expression de son récepteur chez des rats nouveau-nés et des rats de trois mois. En induisant pharmacologiquement une déficience en GHRH, ils ont observé que les niveaux d'ARNm de GHRH-R sont réduits alors que dans les

animaux ayant été soumis à une thérapie de remplacement, les niveaux étaient normalisés.

Chez les rats de 18 mois, un traitement de quatorze jours avec 0.5 mg/kg n'altère pas significativement les sites de liaison du GHRH-R si on les compare à ceux des rats témoins de 18 mois. En effet, nous avons observé une seule classe de sites de liaison. Les deux groupes d'animaux ont donc perdu une majorité des sites à haute affinité ce qui résulte en une classe de sites de liaison possédant une affinité inférieure à celle de la classe de sites à haute affinité mais supérieure à celle de la classe de sites de basse affinité. Cette classe de sites de liaison intermédiaire possède également une capacité inférieure à la capacité totale des sites de liaison dans l'hypophyse des rats de deux mois. Un traitement quotidien avec 1.0mg/kg de hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> chez des rats âgés de 18 mois résulte en une restauration de la classe de sites à haute affinité dont les paramètres sont similaires à ceux observés chez les rats de deux mois à l'exception de la capacité de la classe de sites à basse affinité qui est augmentée de 200%. L'analyse des niveaux d'ARNm de GHRH-R par buvardage de type Northern corrobore ces résultats. En effet, les niveaux de transcrits de 2.5 kb, codant pour le récepteur fonctionnel, sont diminués de 31% chez les rats âgés témoins. Chez les rats traités avec 1.0 mg/kg de GHRH, ils sont restaurés au niveau observé chez les rats de deux mois. En ce qui concerne le transcrit de 4.0 kb, dont l'identité et le rôle sont présentement sous investigation, nous avons déterminé que les niveaux demeurent inchangés chez les rats âgés traités ou témoins mais ils sont augmentés comparativement aux rats de deux mois. Des travaux futurs devront élucider les mécanismes transcriptionnels et traductionnels impliqués dans l'altération du GHRH-R au cours du vieillissement et leur régulation par un traitement chronique au GHRH.

Cette étude a également permis de mettre en évidence chez les rats de 18 mois, l'absence de mécanismes de rétrocontrôle hypothalamique par le GHRH. En effet, nous n'avons observé aucune différence significative entre les contenus hypothalamiques en GHRH et en SRIF des rats de 18 mois traités et ceux des témoins.

Nous pouvons conclure que, chez les rats âgés, le traitement chronique avec 1.0 mg/kg de GHRH résulte donc en une augmentation du nombre de GHRH-R fonctionnels. Ces récepteurs induisent vraisemblablement une sécrétion accrue de GH qui stimule la sécrétion d'IGF-1. Les concentrations sériques de cette dernière sont alors normalisés à des niveaux comparables à ceux des rats de deux mois et ce, sans que des mécanismes de rétrocontrôle entravent ce mécanisme.

### 4.3 Traitement chronique à la thyroxine

Nous, ainsi que d'autres équipes, avons rapporté que les niveaux de  $T_4$  libre et totale sont diminués d'environ 37-40% et 60% respectivement chez les rats âgés comparativement aux jeunes rats [Quigley *et al* (1990); Console *et al* (1995); Girard *et al* (1998)]. Il a été rapporté, dans la littérature que les gènes de GH et GHRH-R portent des éléments TRE. De plus, les hormones thyroïdiennes sont essentielles pour maintenir le patron de sécrétion de GH [Martin D *et al* (1985); Godfrey et Mayo (1995)] et un niveau optimal de GHRH-R [Miki *et al* (1995)]. Miki *et al* (1992 et 1995) avaient précédemment rapporté que des doses entre 1 et 2  $\mu\text{g}$  / 100 g administrées de façon sous-cutanées constituaient une thérapie de remplacement efficace chez les jeunes rats hypothyroïdiens. Ce traitement leur permettait, sur une période de sept à quatorze jours, de normaliser le gain de poids, les niveaux circulants de  $T_4$ , les contenus hypothalamiques en GHRH, les niveaux sériques d'IGF-1 et les contenus hypophysaires de GH à des taux correspondants respectivement à 61% à 86% et 46% et 86% ceux observés chez des témoins [Miki *et al* (1992)]. De plus, un traitement de 1  $\mu\text{g}$  / 100 g de thyroxine pour une période de 5 jours, leur permet de restaurer la quantité des ARNm de GHRH-R chez les rats hypothyroïdiens à des niveaux entre 61% à 86% ceux des rats témoins normaux [Miki *et al* (1995)]. Il peut donc être proposé que, chez les rats de 18 mois, une hypothyroïdie due au vieillissement pourrait être en partie responsable des altérations du GHRH-R. Nous avons donc évalué l'effet d'une thérapie de supplémentation de 2  $\mu\text{g}$  / 100 g de poids corporel de thyroxine chez des rats Sprague-Dawley mâles âgés de 18 mois pour vérifier l'impact de ce traitement sur le GHRH-R et l'axe somatotrope chez des animaux âgés.

Nos résultats indiquent que des injections sous-cutanées quotidiennes pour une période de quatorze jours permettent de restaurer les niveaux de  $T_4$  circulants à des niveaux similaires à ceux observés chez les rats de deux mois sans affecter le poids corporel des animaux. Le traitement permet également de normaliser les taux d'IGF-1 total circulant à des niveaux similaires à ceux observés chez les rats de deux mois. Ceci suggère une restauration de l'intégrité de l'axe somatotrope. Toutefois, malgré le fait que la classe de sites à haute affinité est détectable chez les rats de 18 mois, le traitement s'avère insuffisant pour restaurer la capacité de cette classe de sites à des niveaux similaires à ceux des jeunes rats. En effet, les rats de 18 mois traités présentent une classe de sites à haute affinité avec une capacité de 9% celle des témoins de deux mois. Par contre, les sites à basse affinité ont pu être restaurés à des niveaux similaires à ceux observés chez les rats de deux mois. Ces résultats n'ont pu être expliqués par des augmentations des transcrits d'ARNm de GHRH-R. En effet, nous avons observé que le transcrit de 2.5 kb, de même que celui de 4.0 kb étaient réduits chez les rats âgés traités à la thyroxine lorsque comparés à la fois aux rats témoins de deux mois et à ceux de 18 mois. Il semble donc que l'élément TRE décrit par Godfrey et Mayo (1995) sur le gène du GHRH-R a un effet répresseur sur l'activité du promoteur menant à une transcription réduite du gène. Une autre possibilité est que les niveaux et/ou vitesses de transcription sont similaires chez les rats âgés traités et témoins mais que le traitement à la thyroxine induit une réduction de la demi-vie des ARNm de GHRH-R.

Malgré le fait que le GHRH-R ne semble pas favorablement modulé par la thyroxine, il est intéressant de noter que les rats âgés traités à la thyroxine possèdent des taux circulants d'IGF-1 qui ne sont pas significativement différents de ceux observés chez les rats de deux mois. Il est possible que l'augmentation d'IGF-1 observée est causée par une sécrétion accrue de GH suite à la restauration de la classe de sites à haute affinité. Même si sa capacité est réduite de façon importante comparativement aux rats jeunes, la présence de cette classe de site peut permettre d'augmenter la sensibilité des somatotropes au GHRH sécrété par l'hypothalamus. Une autre hypothèse



permettant d'expliquer les niveaux accrus d'IGF-1 chez les rats traités est que les éléments TRE présents à la fois sur le promoteur et dans le gène de la GH permettent une activation de la transcription du gène de GH. Une sécrétion accrue de la GH est alors possible à chaque stimulation ce qui permet par conséquent, une sécrétion accrue d'IGF-1.

Nous pouvons conclure que, chez les rats de 18 mois, une diminution des niveaux circulants d'hormones thyroïdiennes est impliquée dans la perte de sites à haute et à basse affinité du GHRH. Une thérapie de remplacement de  $T_4$  permet de rajeunir partiellement l'axe somatotrope cependant, les mécanismes moléculaires impliqués demeurent à être élucidés. Il sera intéressant de vérifier si des traitements de plus longue durée peuvent induire des effets bénéfiques plus accentués chez les rats âgés.

## 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons étudié des stratégies d'intervention diététiques et hormonales chez le rat Sprague-Dawley mâle dans le but de prévenir, retarder ou renverser les altérations que subit le GHRH-R au cours du vieillissement.

Nous avons démontré qu'une restriction calorique de 40% de longue durée implantée à l'âge adulte est efficace pour protéger les sites de liaison du GHRH-R contre les altérations qui surviennent avec l'âge. Contrairement à une restriction calorique de courte durée implantée chez le rat âgé. Par son action sur le GHRH-R, la restriction calorique de longue durée permet aux rats âgés de conserver un profil de sécrétion de GH similaire à celui observé chez les jeunes animaux. Nous n'avons pu élucider quels étaient les modulateurs responsables du maintien des paramètres de liaison du GHRH-R chez les rats ayant été soumis à une restriction de longue durée. Toutefois, nous avons identifié des modulateurs candidats tels que les glucocorticoïdes et le ratio  $T_3/T_4$  libre. L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de l'intégrité du GHRH-R devra faire partie de travaux futurs. Une optimisation des macronutriments nécessaires au maintien de l'axe somatotrope est également souhaitable pour faciliter l'application d'un tel traitement à l'humain. En effet, une restriction calorique de 40% représente un changement de diète drastique et, sans doute, peu invitant pour une majorité des individus. Si une modification mineure dans la quantité ou le type de protéines consommées permettait les mêmes effets bénéfiques qu'une restriction calorique de 40%, l'adoption d'une telle diète serait plus aisée pour l'humain. A long terme, il sera donc intéressant d'évaluer les effets d'une restriction calorique chez l'humain. Comme les études, chez des primates, suggèrent que certains effets physiologiques de la restriction calorique, qui se produisent chez les rongeurs, sont observés chez les primates, il est vraisemblable que ces effets seraient également observés chez les humains.

Notre deuxième modèle visait à effectuer un traitement de quatorze jours par voie sous-cutanée avec le GHRH(1-29)NH<sub>2</sub> humain (0.5 ou 1.0 mg/kg de poids corporel/jour) chez des rats de 18 huit mois. Nous avons comparé ces résultats

à ceux d'un traitement similaire chez des rats de 2 mois. Chez les jeunes rats, un traitement avec une ou l'autre des doses déclenche des mécanismes de rétrocontrôle négatif contribuant à éviter la sécrétion excessive de GH et du facteur insulinique de type 1. Chez les rats âgés traités avec 1.0 mg/kg, les niveaux sériques d'IGF-1 sont normalisés à des taux similaires à ceux observés chez les jeunes rats et sans que des mécanismes de rétrocontrôle négatif n'interviennent. Cette normalisation des taux d'IGF-1 est causée par la synthèse *de novo* de récepteurs au GHRH qui est détectable par la restauration de la classe de sites à haute affinité et une concentration accrue d'ARNm de GHRH-R observée dans l'hypophyse antérieure de ces animaux. Il sera important lors de travaux futurs de vérifier les effets d'un tel traitement à long terme pour s'assurer qu'on ne retrouve pas chez ces individus, de tumorigénèse accrue due aux effets de la GH et d'IGF-1 sur la mitose et la survie cellulaire.

Finalement, nous avons évalué l'impact d'un traitement à la thyroxine ( $2\mu$ g/100g de poids corporel/jour) durant une période de deux semaines sur la restauration de l'intégrité de l'axe somatotrope et, plus particulièrement, du GHRH-R chez le rat âgé. Nous avons déterminé que, chez les rats âgés une diminution des niveaux circulants d'hormones thyroïdiennes est impliquée dans la perte des sites à haute et à basse affinité du GHRH-R. Une thérapie de remplacement de  $T_4$  permet de rajeunir partiellement l'axe somatotrope en restaurant partiellement la classe de sites à haute affinité et les niveaux d'IGF-1.

En parallèle aux études dont le but sera d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de l'intégrité du GHRH-R dans les modèles qui ont fait l'objet de ce mémoire, il sera important de comprendre de quelle façon est modifiée le GHRH-R et quels sont les éléments régulateurs affectés au cours du vieillissement normal. Ces connaissances pourront fournir des cibles spécifiques pour empêcher les altérations du GHRH-R.

Les travaux présentés dans ce mémoire suggèrent donc plusieurs nouvelles avenues de recherche à explorer. Ils suggèrent également des traitements qui

pourront éventuellement être utilisés chez l'humain pour maintenir dans un état optimal l'axe somatotrope et plus particulièrement du GHRH-R au cours du vieillissement.

## 6. SOURCES DOCUMENTAIRES

- Abribat T, Boulanger L, Gaudreau P** (1990) Characterization of [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>10</sup>] human growth hormone-releasing factor (1-44) amide binding to rat pituitary: evidence for high and low affinity classes of sites. *Brain Research* 528: 291-299.
- Abribat T, Deslauriers N, Brazeau P, Gaudreau P** (1991) Alterations of pituitary growth hormone-releasing factor binding sites in aging rats. *Endocrinology* 128: 633-635.
- Aguila MC** (1994) Growth hormone-releasing factor increases somatostatin release and mRNA levels in the rat periventricular nucleus via nitric oxide by activation of guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 782-786.
- Aguila MC, McCann SM** (1991) The influence of hGRF, CRF, TRH and LH-RH on SRIF release from median eminence fragments. *Brain Res* 348: 180-182.
- 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.
- Aleppo G, Moskal SF 2nd, De Grandis PA, Kinemen RD, Frohman LA** (1997) Homologous down-regulation of growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 138: 1058-1065.
- Alvares XA, Cacabelos R** (1990) Effects of GRF(1-29)NH<sub>2</sub> on short-term memory: neuroendocrine and neuropsychological assessment in healthy young subjects. *Methods Findings Exp Clin Pharmacol* 12: 493-499.
- Andreasen T, Helmgard L, Gaudreau P, Andersen PH** (1996) Growth hormone-releasing substances. In: *The Complexity of Endocrine Systems*. Ranke MB, Christiansen JS (éds). J&J-Verlag, Mannheim. pp. 1-22.
- 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.

- Baes M, Vale WW** (1990) Characterization of the glucose-dependent release of growth hormone-releasing factor and somatostatin from superfused rat hypothalami. *Neuroendocrinology* 51: 202-207.
- Becker K, Stegenga S, Conway S** (1995) Role of insulin-like growth factor 1 in regulating growth hormone release and feedback in the male rat. *Neuroendocrinology* 61: 573-583.
- Bell GI, Reisine T** (1993) Molecular biology of somatostatin receptors. *Trends Neurosci* 16: 34-38.
- Bengtsson B-A, Brummer RJM, Edén S, Rosén T, Sjöström L** (1992) Effect of growth hormone on fat mass and fat distribution. *Acta Paediatr* 383 (suppl): 62-65.
- Berelowitz M, Perlow MJ, Hoffman HJ, Frohman LA** (1981) Effects of growth hormone excess and deficiency on hypothalamic somatostatin content and release and on tissue somatostatin distribution. *Endocrinology* 109: 714-719.
- Berelowitz M, Saab 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.
- Bertherat J, Dournaud P, Berod A, Normand E, Bloch B, Rostene W, Kordon C, Epelbaum J** (1992) Growth hormone-releasing hormone-synthesizing neurons are a subpopulation of somatostatin receptor-labelled cells in the rat arcuate nucleus: a combined in situ hybridization and receptor light-microscopic radioautographic study. *Neuroendocrinology* 56: 25-31.
- Bilezikjian LM, Vale WW** (1984) Chronic exposure of cultured rat anterior pituitary cells to GRF causes partial loss of responsiveness to GRF. *Endocrinology* 115: 2032-2034.
- Binnerts A, Wilson JHP, Lamberts SWJ** (1988) The effects of human growth hormone administration in elderly adults with recent weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 67: 1312-1316.
- Blazejowski CA, Webster GC** (1984) Effect of age on peptide chain initiation and elongation in preparations from brain, liver, kidney and skeletal muscle of the C57B1/6J mouse. *Mechan Ageing Devel* 25: 323-333.



- Bodkin NL, Ortmeyer HK, Hansen BC** (1995) Long-term dietary restriction in older-aged rhesus monkeys: effects on insulin resistance. *J Gerontol* 50: B142-147
- Borges JLC, Blizzard RM, Evans WS, Furlanetto R, Rogol AD, Kaiser DI, Rivier J, Vale WC, Thorner MO** (1984) Stimulation of growth hormone (GH) and somatomedin-C in idiopathic GH-deficient subjects by intermittent pulsatile administration of synthetic human pancreatic tumour GH-releasing factor. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 1-6.
- Boulanger L, Andersen PH, Gaudreau P** (1998) Development of a site-directed polyclonal antibody against the adenopituitary growth hormone-releasing factor receptor and its use to estimate GHRH receptor content in normal and hypothyroid rats. *Neuroendocrinology*. Sous presse.
- Bouvier M, Moffett S, Loisel TP, Mouillac B, Hébert T** (1994) La palmylation: une modification post-traductionnelle impliquée dans la régulation des voies de signalisation couplées aux protéines G. *Med Sci* 10 (Suppl 1): 10-17.
- Brazeau P, Ling N, Esch F, Bohlen P, Mouglin C, Guillemin R** (1982) Somatocrin (growth hormone releasing factor) in vitro bioactivity;  $Ca^{++}$  involvement, cAMP mediated action and additivity of effect with PGE 2. *Biochem Biophys Res Commun* 109: 588-594.
- Bruno JF, Berelowitz M** (1993) Somatostatin receptor: orphan that found family and function. *Mol Cell Neurosci* 4: 307-9.
- Bruno JF, Song J, Xu Y, Berelowitz M** (1993) Regulation of hypothalamic preprogrowth hormone-releasing factor messenger ribonucleic acid expression in food-deprived rats: a role for histaminergic neurotransmission. *Endocrinology* 133: 1377-1381.
- Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M** (1993) Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology* 133: 2561-2567.
- Bruno JF, Song J, Berelowitz M** (1991) Regulation of rat hypothalamic preprogrowth hormone-releasing factor messenger ribonucleic acid by dietary protein. *Endocrinology* 129: 1226-1232.

- Bruno JF, Olchovsky D, White JD, Leidy JW, Song J, Berelowitz M** (1990) Influence of food deprivation in the rat on the hypothalamic expression of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 127: 2111-2116.
- Canonino PL, Cronin MJ, Thorner MO, Macleod RM** (1983) Human pancreatic GRF stimulates phosphatidyl inositol labelling in cultured anterior pituitary cells. *Am J Physiol* 245: E587-590.
- 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.
- Cartee GD, Dean DJ** (1994) Glucose transport with brief dietary restriction: heterogenous responses in muscles. *Am J Physiol* 266: E946-952.
- 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.
- Casanueva FF** (1992) Physiology of growth hormone secretion and action. *Clin North Am* 21:483-517.
- 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.
- Chen C, Vincent J-D, Clarke IJ** (1994) Ion channels and the signal transduction pathways in the regulation of growth hormone secretion. *Trends Endocrinol Metab* 5: 227-233.
- Chung MH, Kasai H, Nishimura S, Yu BP** (1992) Protection of DNA damage by dietary restriction. *Free Rad Biol Med* 12 : 523-525.
- Clemmons DR, Van Wyk JJ** (1984) Factors controlling blood concentration of Somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab* 13: 113-143.
- Cocchi D, Calderini G, Ganzetti I, Galbiati E, Parenti M, Muller EE** (1986) Aspects of the control of prolactin and growth hormone secretion in aging. In: *Neuroendocrine Perspectives* (vol. 5) pp.191-204. EE Muller et RM ManLeod (eds), Elsevier, Amsterdam.
- Cohicks WS, Clemmons DR** (1993) The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 14: 20-39.

- Coiro V, Voiri R, Cavazzini U, Bertoni P, Corradi A, Bianconi L, Davoli C, Rossi G, Chiodera P** (1991) Restoration of normal growth hormone responsiveness to GHRH in normal aged men by infusion of low amounts of theophylline *J Gerontol* 46: M155-158.
- Console GM, Gomez Dumm CL, Goya RG** (1995) Immunohistochemical and radioimmunological assessment of thyrotrophs in the rat pituitary of aging rats. *Endocrinology* 128: 633-635.
- Corpas E, Harman, Pineyro MA, Roberson R, Blackman MR** (1992) Growth hormone (GH)- releasing hormone (1-29) twice daily reverses the decreased GH and insulin-like growth factor-1 levels in old men. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 530-535.
- Corpas E, Harman SM, Blackman MR** (1993) Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev* 14: 20-39.
- Cotecchia S, Exum S, Caron MG, Lefkowitz RJ** (1990) Regions of the  $\alpha_1$ -adrenergic receptor involved in coupling to phosphatidyl inositol hydrolysis and enhanced sensitivity of biological function. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2896-2900.
- Cuttler L, Glaum SR, Collins BA, Miller RJ** (1992) Calcium signalling in single growth hormone-releasing factor-responsive pituitary cells. *Endocrinology* 130: 945-953.
- Daughaday WH** (1989) A personal history of the origins of the Somatomedin hypothesis and recent challenges to its validity. *Perspect Biol Med* 32: 194-211.
- Dawson-Hughes B, Stern D, Goldman J** (1986) Regulation of growth hormone and somatomedin-C secretion in postmenopausal women: effect of physiological estrogen replacement therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 424-432.
- D'Costa AP, Ingram RL, Lenham JE, Sonntag WE** (1993) The regulation and mechanisms of action of growth hormone and insulin-like growth factor 1 during normal ageing. *J Reprod Fert Suppl* 46: 87-98.
- 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.

- De Gennaro Colonna V, Zoli M, Cocchi D, Maggi A, Marrama P, Agnati F, Muller EE** (1989) Reduced growth hormone-releasing factor (GHRF)-like immunoreactivity and GHRF gene expression in the hypothalamus of aged rats. *Peptides* 10: 705-708.
- De Gennaro Colonna V, Cella SG, Parenti M, Locatelli V, Cocchi D, Muller EE** (1994) Neuroendocrine aging: its impact on somatotrophic function. *Neurochem Int* 25: 5-10.
- Delitala G, Tomasi P, Viridis R** (1988) Neuroendocrine regulation of human growth hormone secretion. Diagnostic and clinical applications. *J Endocrinol Invest* 11:441-462.
- Delitala G, Tomasi P, Viridis R** (1987) Prolactin, growth hormone and thyrotropin-thyroid hormone secretion during stress status in man. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1: 391-414.
- Deseva J, 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 Mol Biol* 40: 165-173.
- Deslauriers N, Gaudreau P, Aribat T, Renier G, Petitclerc D, Brazeau P** (1991) Dynamics of growth hormone responsiveness to growth hormone releasing factor in aging rats: peripheral and central influences. *Neuroendocrinology* 53 : 439-446.
- Devesa J, Lima L, Tresguerres JAF** (1992) Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends Endocrinol Metab* 3: 175-183.
- Dieguez C, Page MD, Scanlon MF** (1988) Growth hormone neuroregulation and its alterations in disease states. *Clin Endocrinol* 28: 109-43.
- Dude R, Ensick J** (1977) Insulin and glucagon relationships during aging in man. *Metabolism* 26: 33-41.
- Ernst M, Froesch ER** (1988) Growth hormone dependent stimulation of osteoblast-like cells in serum-free cultures via local synthesis of insulin-like growth factor I. *Biochem Biophys Res Commun* 151: 142-147.
- Evans RM, Birnberg NC, Rosenfled MG** (1992) Glucocorticoid and thyroid hormones transcriptionally regulate growth hormone gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 79: 7659-7663.

- Fernandez-Vazquez G, Cacicedo L, Lorenzo MJ, Tolon R, Lopez J, Sanchez-Franco F** (1995) Corticosterone modulates growth hormone-releasing factor and somatostatin in fetal rat hypothalamic cultures. *Neuroendocrinology* 61 : 31-35.
- Ferrara C, Cerosoli G, Marcozzi C, Cocchi D** (1991) Hypothalamic pituitary somatostatinergetic system in middle aged female rats. *Horm Metab Res* 23: 243-244.
- Finkelstein JN, Roffwarg HP, Boyar RM** (1972) Age-related change in twenty-four-hour spontaneous secretion of growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 35: 665-670.
- Fiorini J, Roberts S** (1980) Effects of rat age on blood levels of somatomedin-like growth factors. *J Gerontol* 35: 23-30.
- Forbes GB, Reina JC** (1970) Adult lean body mass declines with age: some longitudinal observations. *Metabolism* 19: 653-663.
- Fraser RA, Harvey S** (1992) Ubiquitous distribution of growth hormone receptors and/or binding proteins in adenohypophyseal tissue. *Endocrinology* 130: 3593-3600. .
- Fraser RA, Siminoski K, Harvey S** (1991) Growth hormone receptor gene: novel expression in pituitary tissues. *J Endocrinol* 128: R9-R11.
- Freeman LA** (1996) Cellular physiology of growth hormone releasing hormone. In *Growth hormone secretagogues*, BB Bercu et RF Walkers Eds. Springer-Verlag, New York, pp 137-144.
- Frohman LA, Downs TR, Chomczynski P** (1992) Regulation of growth hormone secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology* 13: 344-405.
- Frohman LA, Jansson JO** (1986) Growth hormone-releasing hormone. *Endocr Rev* 7: 223-253.
- Fujunaka Y, Yokogoshi Y, Zhang C-Y, Okura T, Kitagawa K, Saito S** (1996) Tissue-specific molecular heterogeneity of human growth hormone-releasing hormone receptor protein. *Febs Letters* 394: 1-4.
- Gabius HJ, Gaupner G, Cramer F** (1983) Activity patterns of aminoacyl-tRNA synthetases, tRNA methylases, arginyltransferase and tubulin: tyrosine ligase during development and ageing of *Caenorhabditis elegans* . *Eur J Biochem* 131: 231-234.

- Gaylinn BD, Harrison JK, Zysk JR, Lyons CE, Lynch KR, Thorner MO** (1993) Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 7: 77-84.
- Gaylinn BD, Lyons CE, Zysk JR, Clarke IJ, Thorner MO** (1994) Photoaffinity cross-linking to the pituitary receptor for growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* 135: 950-955.
- Gaylinn BD, von Kap-Herr C, Golden WL, Thorner MO** (1994) Assignment of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene (GHRHR) to 7p14 in situ hybridization. *Genomics* 19: 193-195.
- 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.
- Gil Ad I, Weizman A, Silbergeld A, Dickerman Z, Kaplan B, Laron Z, Koch Y** (1996) Differential effect of insulin-like growth factor-1 and growth hormone on hypothalamic regulation of growth hormone secretion in the rat. *J Endocrinol Invest* 19: 542-547.
- Girard N, Boulanger L, Ferland G, Gaudreau P** (1998) Long term calorie restriction protects rat pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites from age-related alterations. *Neuroendocrinology* 68: 21-29.
- Giustina A, Wehrenberg WB** (1995) Influence of thyroid hormone on the regulation of growth hormone secretion. *European J Endocrinol* 133: 646-653.
- Glass CK, Franco R, Weinberger 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.
- Godfrey PA, Mayo K** (1995) Structure of the rat GHRH receptor gene and characterization of two receptor isoforms. Abstract program of the 77th Annual Meeting of the Endocrine Society, Washington DC, No P3-129.

- Gomez-Pan A, Rodriguez-Arno MD** (1983) Somatostatin and growth hormone releasing factor: synthesis, location, metabolism and function. *Clin Endocrinol Metab* 12: 469-507.
- Goodyear CG, DeStephano L, Lai WH, Guyda HJ** (1984) Characterization of insulin-like growth factor receptors in rat anterior pituitary, hypothalamus and brain. *Endocrinology* 114: 1187-1195.
- Gregerman RI** (1986) Mechanism of age-related alterations of hormone secretion and action. An overview of 30 years of progress. *Exp Gerontol* 21: 345-365.
- Hagberg JM, Seals DR, Yerg JE, Gavin J, Gingerich R, Bhartur P, Holloszy J** (1988) Metabolic responses to exercise in young and old athletes and sedentary men. *J Appl Physiol* 65: 900-908.
- Harel Z, Tannenbaum GS** (1992) Synergistic interaction between insulin-like growth factor II and I in central regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 131: 758-764
- Hartman ML, Farello G, Pezzoli SS, Thorner MO** (1992) Oral administration of growth hormone (GH)-releasing peptide stimulates GH secretion in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 1378-1384.
- Hartman ML, Veldhuis JD, Thorner MO** (1993) Normal control of growth hormone secretion. *Horm Res* 40: 37-47.
- Harwood JP, Crew C, Aiguilera G** (1984) Actions of growth hormone-releasing factor and somatostatin on adenylate cyclase and growth hormone release in the rat anterior pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 37: 277-284.
- 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 concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 51-58.
- Hoffman AR, Pyka G, Lieberman SA, Ceda GP, Marcus R** (1993) The somatopause. In: *Growth hormone and somatomedins during lifespan*. Muller EE, Cocchi D, Locatelli V (éds). Heidelberg, Springer pp.265-274.

- 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.
- Horikawa R, Hellmann P, Cella SG, Torsello A, Day RN, Muller EE, Thorner MO** (1996) Growth hormone-releasing factor (GRF) regulates the expression of its own receptor. *Endocrinology* 137: 2642-2645.
- Hsuing 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. *Neuropeptides* 25: 1-10.
- Hu Z, Friberg RD, Barkan AL** (1993) Ontogeny of GH mRNA and secretion in male and female rats: regulation by GH-releasing hormone. *Am J Physiol* 265: E236-242.
- Ibata Y, Okamura H, Makino S, Kawakami F, Morimoto N, Chihara K** (1986) Light and electron microscopic immunohistochemistry of GRF-like immunoreactive neurons and terminals in the rat hypothalamic arcuate nucleus and median eminence. *Brain Res* 370: 136-143.
- Ikuyama S, Natori S, Nawata H, Kato K, Ibayashi H, Kariya T, Sakai T, Rivier J, Vale W** (1988) Characterization of growth hormone-releasing hormone receptors in pituitary adenomas from patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 1265-1271.
- Illig R, Prader A** (1970) Effect of testosterone on growth hormone secretion in patients with anorchia and delayed puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 30: 615-622.
- Iovino M, Monteleone, Steardo L** (1989) Repetitive growth hormone-releasing hormone administration restores the attenuated growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone testing in normal aging. *J. Clin Endocrinol Metab* 69: 910-913.
- Iranmanesh A, Lizarralde G, Veldhuis JD** (1991) Age and relative adiposity are specific negative determinants of the frequency and amplitude of growth hormone (GH) secretory bursts and half-life of endogenous GH in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 1081-1088.



- Isaksson OG, Eden S, Jansson JO** (1985) Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. *Annu Rev Physiol* 47: 483-499.
- Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA** (1982) Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 216: 1237-1239.
- Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J** (1988) Action of growth hormone: current views. *Acta Paediatr Scand* 343: 12-18.
- Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J** (1987) Mechanism of stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone. *Endocr Rev* 8: 426-438.
- Iwasaki K, Gleiser CA, Masoro EJ, McMahan CA, Seo EJ, Yu BP** (1988) The influence of dietary protein source on longevity and age-related disease processes of Fischer rats. *J Gerontol* 43: B5-12.
- Jansson JO, Carlsson L, Isaksson OGP** (1985) Growth hormone (GH)-releasing factor (GRF) pretreatment enhances the GRF-induced GH secretion in rats with the pituitary autotransplanted to the kidney capsule. *Endocrinology* 116: 95-98.
- Jorgensen JOL, Müller J, Moller J, Wolthers T, Vahl N, Juul A, Skakkebaek NE, Christiansen JS** (1994) Adult growth-hormone deficiency. *Horm Res* 42: 235-241.
- Kabayama Y, Kato Y, Murakami Y, Tanaka H, Imura H** (1986) Stimulation by alpha-adrenergic mechanisms of the secretion of growth hormone-releasing factor (GRF) from perfused rat hypothalamus. *Endocrinology* 119: 432-434.
- Kalu D, Masoro EJ, Yu BP, Hardin RR, Hollis BW** (1988) Modulation of age-related hyperparathyroid and senile bone loss in Fischer rats by soy protein and food restriction. *Endocrinology* 122: 1847-1853.
- Katakami H, Dows TR, Frohman LA** (1986) Decreased hypothalamic growth hormone-releasing hormone content and pituitary responsiveness in hypothyroidism. *J Clin Invest* 77: 1704-1711.
- Kato M** (1996) Growth hormone-releasing hormone augments voltage-gated Na<sup>+</sup> current in cultured rat pituitary cells. *Am J Physiol* 270: C128-130.
- 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.

- Kato M, Suzuki M** (1989) Growth hormone releasing factor depolarizes rat pituitary cells in Na<sup>+</sup>-dependent mechanism. *Brain Res* 476: 145-148.
- Kaufman S, Jones KL, Wehrenberg EWB, Cuttler FL** (1988) Inhibition by prednisone of growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone in normal. *J Clin Endocrinol Metab* 67 : 1258-1261.
- Kelly PA, Ali S, Rozakis M, Goujon L, Nagano M, Pellerini I, Gould D, Djiane J, Edery M, Finidori J et al** (1993) The growth hormone/prolactin receptor family. *Recent Prog Horm Res* 48: 123-164.
- Kemnitz JW, Roecker EB, Weindruch R, Elson DF, Baum ST, Bergman RN** (1994) Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys. *Am J Physiol* 266: E540-547.
- Kjelsberg MA, Cotecchia S, Ostrowski J, Caron MG, Lefkowitz RJ** (1992) Constitutive activation of the  $\alpha 1\beta$ -adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. *J Biol Chem* 267: 1430-1433.
- Koenig RJ, Brent GA, Warne RL, Larsen PR, Moore DM** (1987) Thyroid hormone receptor binds to a site in the rat growth hormone promoter required for induction by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci* 84: 5670-5674.
- Koizumi A, Weindruch R, Walford RL** (1987) Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. *J Nutr* 117 :361-367.
- Korytko A, Zeitler P, Cuttler L** (1996) Developmental regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression in the rat. *Endocrinology* 137: 1326-1331.
- Korytko AI, Cuttler L** (1997) Thyroid hormone and glucocorticoid regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression. *J Endocrinol* 152: R13-17.
- Kovacs M, Fancsik A, Hrabovsky E, Mezo I, Teplan I, Flerko B** (1995) Effects of continuous and repetitive administration of a potent analogue of GH-RH (1-30)NH<sub>2</sub> on the GH release in rats tested with monosodium glutamate. *J Neuroendocrinology* 7 : 703-712.
- Labrie F, Gagné B, Lefèbvre G** (1983) Growth hormone-releasing factor stimulates adenylate cyclase activity in the anterior pituitary gland. *Life Sci* 33: 2229-2233.

- Laganiere S, Yu BP** (1989) Effect of chronic food restriction in aging rats. I. Liver subcellular membranes. *Mech Ageing Dev* 48 : 207-219.
- Laganiere S, Yu BP** (1989) Effect of chronic food restriction in aging rats. II. Liver cytosolic antioxidants and related enzymes. *Mech Ageing Dev* 48 : 221-230.
- Laganiere S, Yu BP** (1993) Modulation of membrane phospholipid fatty acid composition by age and food restriction. *Gerontology* 39 :7-18.
- Lai Z, Roos P, Zhai O, Nyberg F** (1992) Age-related alterations in human growth hormone binding sites in the human brain. *J Endocrinol Invest* 15 (suppl 4): 100 (abstract).
- 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.
- Lane MA, Ball SS, Ingram DK, Cutler RG, Engel J, Read V, Roth GS** (1995) Diet restriction in rhesus monkeys lowers fasting and glucose-stimulated glucoregulatory end points. *Am J Physiol* 268: E941-948.
- Lanzi R, Tannenbaum GS** (1992) Time course mechanism of growth hormone's negative feedback effect on its own spontaneous release. *Endocrinology* 130: 780-788.
- Le Cam A, Legraverend C** (1993) Mode d'action de l'hormone de croissance. *Med Sci* 9 : 1352-1361.
- Lee C, Gardella TJ, Abou-Samra AB, Nussbaum SR, Segre GV, Potts JT Jr, Kronenberg HM, Juppner H** (1994) Role of the extracellular regions of the parathyroid hormone (PTH)/ PTH-related peptide receptor in hormone binding. *Endocrinology* 135: 1488-1495.
- Lee DW, Yu BP** (1990) Modulation of free radicals and superoxidase dismutase by age and dietary restriction. *Age* 2 : 357-362.
- Lefrançois L, Boulanger L, Gaudreau P** (1995) Effects of aging on pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites: in vitro mimicry by guanyl nucleotides and reducing agents. *Brain Res* 673: 39-46.

- Lewin MJ, Reyl-Desmars F, Ling N** (1983) Somatocrinin receptor coupled with cAMP-dependent protein kinase on anterior pituitary granules. Proc Natl Acad Sci USA 80: 6538-6542.
- Li CH, Evans HM, Simpson ME** (1945) Isolation and properties of the anterior hypophysial growth hormone. J Biol Chem 159 : 353-356.
- Liggett SB, Caron MG, Lefkowitz RJ, Hnatowich M** (1991) Coupling of a mutated form of the human  $\beta$ 2-adrenergic receptor to Gi and Gs. J Biol Chem 266: 4816-4821.
- 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.
- Lin SC, Lin CR, Gukowsky I, Lusk AJ, Sawchenko PE, Rosenfeld MG** (1993) Molecular basis of the *little* mouse phenotype and implications for cell-type specific growth. Nature 364: 208-213.
- Liu L, Merriam GR, Sherins RJ** (1987) Chronic sex steroid exposure increases mean plasma growth hormone concentration and pulse amplitude in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab 64: 651-656.
- Lobie PE, Lincoln DT, Breipohl W, Waters MJ** (1989) Growth hormone receptor localization in the central nervous system. 71st Ann Meeting Endocrinol Soc (abstract).
- Locatelli V, Torsello A, Redaelli M, Ghigo E, Massare F, Muller EE** (1986) Cholinergic agonist and antagonist drugs modulate the growth hormone response to growth hormone-releasing hormone in the rat: evidence for mediation by somatostatin. J Endocrinol 111: 271-278.
- Lussier BT, French MB, Moor BC, Kraicer J** (1991) Free intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $(Ca^{2+})_i$ ) and growth hormone release from purified rat somatotrophs. I. GH-releasing factor-induced  $Ca^{2+}$  influx raises  $(Ca^{2+})_i$ . Endocrinology 128: 570-582.
- Lussier BT, French MB, Moor BC, Kraicer J** (1991) Free intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and growth hormone (GH) release from purified rat somatotrophs. III. Mechanism of action of GH-releasing factor and somatostatin. Endocrinology 128: 592-603.

- Lumpkin MD, McDonald JK** (1989) Blockade of growth hormone-releasing factor (GRF) activity in the pituitary and hypothalamus of the conscious rat with a peptidic GRF antagonist. *Endocrinology* 124 (3) 1522-1531.
- Lye M** (1985) The milieu interieur and ageing. In: *Textbook of Geriatric Medicine and Gerontology*. Brocklehurst JC (éd). Churchill Livingstone, London, pp.201-229.
- McCarthy GF, Beaudet A, Tannenbaum GS** (1992) Colocalization of somatostatin receptors and growth hormone-releasing factor immunoreactivity in neurons of the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 56: 18-24.
- McCay C, Crowell M, Maynard L** (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutr* 10: 63-79.
- Maheshwari HG, Baumann G** (1997) Genomic organization and structure of the human growth hormone-releasing hormone-receptor gene. Program of the 79th Annual Meeting of the Endocrine Society, Minneapolis, Mn pP1-86 (abstract).
- Martin D, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT, Prelot M, Kordon C, Durand D**(1985) Thyroidectomy abolishes pulsatile growth hormone secretion without affecting hypothalamic somatostatin. *Neuroendocrinology* 41: 476-481.
- Martin JB, Reichlin S** (1987) Regulation of growth hormone secretion and its disorders. In: *Clinical neuroendocrinol*, 2e ed. Martin JB, Reichlin S (éd). Philadelphie: FA Davis. pp. 233-294.
- Martin LG, Clark JW, Conner TB** (1968) Growth hormone secretion enhanced by androgens. *J Clin Endocrinol Metab* 28: 425-431.
- Martinoli MG, Ouellet J, Rhéaume J, Pelletier G** (1991) Growth-hormone and somatostatin gene expression in adult and aging rats as measured by quantitative in situ hybridization. *Neuroendocrinology* 54: 607-615.
- Masoro EJ** (1992) A dietary key to uncovering aging processes. *News in physiol Sci* 7:157-160.

- Masoro EJ, Iwasaki K, Gleiser CA, McMahan CA, Seo EJ, Yu BP** (1989) Dietary modulation of the progression of nephropathy in aging rats. *A, J Clin Nutr* 49: 1217-1227.
- Masoro EJ** (1988) Biology of aging: facts, thoughts, and experimental approaches. *Lab Invest* 65: 500-510.
- Masuda A, Shibasaki T, Nakahara M, Imaki T, Kiyosawa Y, Jibiki K, Demura H, Shizume K, Ling N** (1985) The effect of glucose on growth hormone (GH) releasing hormone-mediated GH secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab* 60: 523-526.
- Matsubara S, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Takahara J** (1995) Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology* 136: 4147-4150.
- Mayo KE** (1992) Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 6: 1734-1744.
- Mayo KE, Godfrey PA, De Almeida V, Millert** (1996) Structure, function and regulation of the pituitary receptor for the growth hormone-releasing hormone. In: *Growth hormone secretagogues*. BB Bercu and RF Walkers Eds. Springer-Verlag, New York, pp. 53-71.
- Mehls O, Tonshoff B, Kovács G, Mayer C, Schurek J, Oh J** (1993) Interaction between glucocorticoids and growth hormone. *Acta Paediatr Suppl* 388: 76-82.
- Mendlewicz J, Linkowski P, Kerkhofs M, Desmedt D, Glodstein J, Copinschi G, Cauter EV** (1985) Diurnal hypersecretion of growth hormone in depression. *J Clin Endocrinol Metab* 60: 505-512.
- 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.
- Miki N, Ono M, Hizuka N, Aoki T, Demura H** (1992) Thyroid hormone modulation of the hypothalamic growth hormone (GH)-releasing factor-pituitary GH axis in the rat. *J Clin Invest* 90: 113-120.

- Miki N, Ono M, Murata Y, Ohsaki E, Tamitsu K, Ri T, Denmura H, Yamada M** (1995) Thyroid hormone regulation of gene expression of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 217: 1087-1093.
- Miki N, Ono M, Murata Y, Ohsaki E, Tamitsu K, Yamada M, Denmura H** (1996) Regulation of pituitary growth hormone-releasing factor (GRF) receptor gene expression by GRF. *Biochem Biophys Res Comm* 224: 586-590.
- Miller TL, Mayo KE** (1997) Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 138: 2458-2465.
- Minami S, Kamegai J, Hasegawa O, Sugihara H, Okada K, Wakabayashi I** (1993) Expression of growth hormone receptor gene in rat hypothalamus. *J Neuroendocrinology* 5: 691-696.
- Moore DD, Marks AR, Buckley DI, Kapler G, Payvar F, Goodman HM** (1985) The first intron of the human growth hormone gene contains a binding site for glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 699-702.
- Morel G** (1991) Uptake and ultrastructural localization of a (<sup>125</sup>I) growth hormone releasing-factor agonist in male rat pituitary gland: evidence for internalization. *Endocrinology* 129: 1497-1504.
- Morimoto N, Kawakami F, Makino S, Chibara K, Hasegawa M, Iyata Y** (1988) Age-related changes in growth hormone-releasing factor and somatostatin in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 47: 459-464.
- Morita S, Yamashita S, Melmed S** (1987) Insulin-like growth factor action on rat anterior pituitary cell: effects of intracellular messengers on growth hormone secretion and messenger ribonucleic acids levels. *Endocrinology* 122: 2204-2210.
- Muller EE, Cella SG, De Gennaro Colonna V, Parenti M, Cocchi D, Locatelli V** (1993) Aspects of the neuroendocrine control of growth hormone secretion in ageing mammals. *J Reprod Fert Suppl* 46: 99-114.
- Nakagawa J, Mori H, Maeda T, Matsuo T, Okada Y** (1995) Dynamics of secretory granules in somatotrophs of rats after stimulation with growth hormone-releasing factor: a stereological analysis. *Cell Tissue Res* 282: 493-501.

- Nastainczyk W, Röhrkasten A, Sieber M, Rudolph C, Schächtele C, Marmè D, Hofmann F** (1987) Phosphorylation of the purified receptor for calcium channel blockers by cAMP kinase and protein kinase C. *Eur J Biochem* 169: 137-142.
- Naumov AP, 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.
- Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson OG, Lindahl A, Isgaard J** (1994) Hormonal regulation of the longitudinal bone growth. *Eur J Clin Nutr* 48: S150-S160.
- Nilsson A, Isgaard J, Lindahl A, Dahlstrom A, Skottner A, Isaksson PPG** (1986) Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF in rat growth plate. *Science* 233: 571-574.
- Novack LP** (1972) Aging, total body, potassium, fat free mass, and all mass in males and females between ages 18 and 85 years. *J Gerontol* 27: 438-443.
- Ooesterum R, Verleun T, Lamberts SWJ** (1984) Human growth hormone-secreting pituitary adenoma cells in long-term culture: Effects of dexamethasone and growth hormone releasing factor. *J Endocrinol* 100 : 353-360.
- Orentreich N, Matias JR, De Felice A, Zimmerman JA** (1993) Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr* 123: 269-274.
- Pantelakis SN, Sinaniotis CA, Sbirakis S, Ikkos D, Doxiadis SA** (1972) Night and day growth hormone levels during treatment with corticosteroids and corticotropin. *Arch Dis Child* 47 : 605-608.
- Parenti M, Cocchi D, Ceresoli G, Marcozzi C, Muller EE** (1991) Age-related changes of growth hormone secretory mechanisms in the rat pituitary gland. *J Endocrinol* 131: 251-257.
- Parenti M, Dale'Ara A, Rusconi L, Cocchi D, Muller EE** (1987) Different regulation of the growth hormone-releasing factor-sensitive adenylate cyclase in the anterior pituitary of young and aged rats. *Endocrinology* 121: 1649-1653.



- Parller DC, Sassin JF, Mace JW, Gotlin RW, Rossman L** (1969) Human growth hormone release during sleep: electroencephalographic correlation. *J Clin Endocrinol Metab* 29: 871-874.
- Patel YC, Murthy KK, Escher EE, Banville D, Spiess J, Srikant C** (1990) Mechanism of action of somatostatin: an overview of receptor function and studies of the molecular characterization and purification of somatostatin receptor proteins. *Metabolism* 39: 63-69.
- Patel YC, Srikant CB** (1986) Somatostatin mediation of adenohipophysial secretion. *Annu Rev Physio* 48: 551-567.
- Pavlov EP, Harman SM, Merriam GR, Gelato MC, Blackman MR** (1986) Responses of growth hormone and somatomedin-C to GH-releasing hormone in healthy aging men. *J Clin Endocrinol Metab* 62: 595-600.
- Peake GT, Birge CA, Daughaday W** (1973) Alterations of radioimmunoassayable growth hormone and prolactin during hypothyroidism. *Endocrinology* 92: 487-493.
- Petersenn S, Resch AC, Heyens M, Schulte HM** (1998) Structure and regulation of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Molecular Endocrinol* 12: 233-247.
- Pieiri 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.
- Plotsky PM, Vale WW** (1986) Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophyseal-portal circulation of the rat. *Science* 230: 461-463.
- Poe B, Lynch C, Cooney P, Brunso-Bechtold JK, Sonntag WE, Hutchins PM** (1996) Caloric restriction increases cortical microvasculature in aged animals. Abstract program of the Society for Neuroscience, Washington DC, vol22, No 492.14.
- Pralong FP, Miell JP, Corder R, Gaillard RC** (1991) Dexamethasone treatment in man induces changes in 24-hour growth hormone (GH) secretion profile without altering total GH released. *J Clin Endocrinol Metab* 73 : 1191-1196.

- Press M** (1988) Growth hormone and metabolism. *Diabetes Metab Rev* 4: 391-414.
- Press M, Tamborlane WV, Thorner MO, Vale W, Rivier J, Gertner JM, Sherwin RS** (1984) Pituitary responses to growth hormone releasing factor in diabetes: failure of glucose-mediated suppression. *Diabetes* 33: 804-806.
- Quabbe HJ** (1985) Hypothalamic control of GH secretion: pathophysiology and clinical implications. *Acta Neurochir* 75: 60-71.
- Quigley K, Goya R, Nachreiner R, Meites J** (1990) Effects of underfeeding and refeeding on GH and thyroid secretion in young, middle-aged and old rats. *Exp Gerontology* 25: 447-457.
- Rao VR, Cohen GB, Oprian DD** (1994) Rhodopsin mutation G90D and a molecular mechanism for congenital night blindness. *Nature* 367: 639-642.
- Rattan SIS, Cavallius J, Hartvigsen GK, Clark BCF** (1986) Amounts of elongation factor 1 alpha and its activity in livers of mice during. *Colloque-Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* 147: 135-140.
- Rawlings SR, Hoyland J, Mason WT** (1991) Calcium homeostasis in bovine somatotrophs: calcium oscillations and calcium regulation by growth hormone-releasing hormone and somatostatin. *Cell Calcium* 12: 403-414.
- Reichlin S** (1983) Somatostatin. *N Engl J Med* 309: 1495-1501.
- Rénier G, Aribat A, Brazeau P, Deslauriers N, Gaudreau P** (1990) Cellular mechanism of caprilic acid-induced growth hormone suppression. *Metabolism* 39: 1108-1112.
- Rens-Domiano S, Reisine T** (1992) Biochemical and functional properties of somatostatin receptors. *J Neurochem* 58: 1987-1996.
- Reyl-Desmars F, Baird A, Zeytin FN** (1985) GRF is a highly potent activator of adenylate cyclase in the normal human bovine and rat pituitary interaction with somatostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 127: 977-985.

- Ricketts WG, Birchenall-Sparks MC, Hardwick JP, Richarson A** (1985) Effect of age and dietary restriction on protein synthesis by isolated kidney cells. *J Cell Physiol* 125: 492-498.
- 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: 429-432.
- Root AW, Shulman D, Root J, Diamond F** (1986) The interrelationships of thyroid and growth hormones: effects of growth hormone releasing hormone in hypo- and hyperthyroid male rats. *Acta Endocrinol Suppl* 279: 367-375.
- Rosèn T, Johannsson G, Johannsson J-O, Bengtsson B-A** (1995) Consequences of growth hormone deficiency in adults and the benefits and risks of recombinant human growth hormone treatment. *Horm Res* 43: 93-99.
- Rosenfield RL, Furlanetto RW** (1985) Physiologic testosterone or estradiol induction of puberty increases plasma somatomedin C. *J Pediatr* 107:415-417.
- Rossi GL, Bestetti GE, Galbiati E, Muller EE, Cocchi D** (1991) Sexually dimorphic effects of aging on rat somatotropes and lactotropes. *J Gerontol: Biol Sci* 46: B152-158.
- Roth GS, Ingram DK, Joseph JA** (1984) Delayed loss of striatal dopamine receptors during aging of dietary restricted rats. *Brain Res* 300: 27-32.
- Rousseau GG, Eliard PH, Barlow, JW, Lemaigre FP, Lafontaine DA, De Nayer P, Economidis IV, Formstecher P, Idziorek T, Mathy-Hartert M et al** (1987) Approach to the molecular mechanism of the modulation of growth hormone gene expression by glucocorticoid and thyroid hormone. *J Steroid Biochem* 27: 149-158.
- Rubin CD** (1993) Southwestern Internal Medicine Conference: Growth hormone-aging and osteoporosis. *Am J Med Sci* 305: 120-129.
- Rudman D** (1985) Growth hormone, body composition and aging. *J Amer Geriatrics Soc* 33: 800-807.
- Rudman D** (1985) Occasional hypothesis. *J Am Geriatr Soc* 33: 800-807.

- Rudman D, Feller AG, Nagrej HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, Schlenker RA, Cohn L, Rudman IW, Mattson DE** (1990) Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med* 323: 1-6.
- Rudman D, Nagraj HS, Mattson D, Evve RR, Rudman IW** (1986) Hyposomatomedinemia in the nursing home patient. *J Am Geriatr Soc* 34: 427-430.
- Rudman D, Vintner MH, Rogers CM, Lubin MF, Fleming GH, Raymond PB** (1981) Impaired growth hormone secretion in the adult population. Relation to age and adiposity. *J Clin Invest* 67: 1361-1369.
- Sabatino F, Masoro EJ, McMahan A, Kuhn RW** (1991) Assessment of the role of the glucocorticoid system in aging processes and in the action of food restriction. *J Gerontol* 46: 1326-1331.
- 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.
- Sato M, Muraio K, Niimi M, Tamaki M, Takahara J** (1993) Effects of long-term infusion of growth hormone (GH)-releasing factor on pulsatile GH secretion in the male rat. *Life Sci* 54: 79-86.
- Scarpace PJ, Yu BP** (1987) Diet restriction retards the age-related loss of beta-adrenergic receptors and adenylate cyclase activity in rat lung. *J Gerontol* 42:442-446.
- Schaufele F, West BL, Baxter JD** (1992) Synergistic activation of the rat growth hormone promoter by Pit-1 and the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 6: 656-665.
- Schlienger JL, Pradignac A, Grunenberger F** (1995) Nutrition of the elderly: a challenge between facts and needs. *Hormone Res* 43: 46-51.
- Schwander JC, Hauri C, Zapf J, Froesch EF** (1983) Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding proteins by perfused rat liver: dependency on growth hormone status. *Endocrinology* 113: 297-305.
- Seinfert H, Perrin M, Rivier J, Vale W** (1985) Binding sites for growth hormone-releasing factor on rat anterior pituitary cells. *Nature* 313: 487-489.

- Seifert H, Perrin M, Vale W** (1985) Growth hormone-releasing factor binding sites in rat anterior pituitary membrane homogenates: modulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 117 (1): 424-426.
- Shakutsui S, Abe H, Chihara K** (1989) GHRH treatment: studies in an animal model. *Acta Paediatrica Scandinavica Suppl* 349: 101-107.
- Sohal RS, Weindruch R** (1996) Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* 273: 59-63.
- Sönksen PH, Cuneo RC, Salomon F, McGauley G, Wiles CM, Wilmshurst P, Byrne C, Hesp R, Lowy C, Weissberger A** (1991) Growth hormone therapy in adults with growth hormone deficiency. *Acta Paediatr Scand* 379 (Suppl): 139-146.
- Sonntag WE, Boyd RL, Booze RM** (1990) Somatostatin gene expression in hypothalamus and cortex of aging male rats. *Neurobiol Aging* 11: 409-416.
- Sonntag WE, Gottschall PE, Meites J** (1990) Somatostatin gene expression in hypothalamus and cortex of aging male rats. *Neurobiol Aging* 11: 409-416.
- Sonntag WE, Gough MA** (1988) Growth hormone-releasing hormone induced release of growth hormone in aging male rats: dependence on pharmacological manipulation and endogenous somatostatin release. *Neuroendocrinology* 47:482-488.
- Sonntag WE, Meites** (1988) Decline in growth hormone secretion in aging animals and man. In: *Regulation of neuroendocrine aging*. Everitt AV walton JR (éd). Basel: Karger pp.111-124.
- Sonntag WE, Gotschall PE, Meites J** (1986) Increased secretion of somatostatin 28 from hypothalamic neurons of aged rats in vitro. *Brain Res* 380: 229-234.
- 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* 113: 2305-2307.
- Sonntag WE, Steger RN, Forman LJ, Meites J** (1980) Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology* 107: 1875-1879.

- Soto JL, Castrillo JL, Domiguez F, Dieguez C** (1995) Regulation of the pituitary-specific transcription factor GHF-1/Pit-1 messenger ribonucleic acid levels by growth hormone-secretagogues in rat anterior pituitary cells in monolayer culture. *Endocrinology* 136: 3863-3870.
- Spencer GSG** (1985) Hormonal systems regulating growth. *Livestock Production Science* 12: 31-46.
- Spiegel AM, Shenker A, Weinstein LS** (1992) Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocrine Reviews* 13: 536-565.
- Spik K, Sonntag WE** (1989) Increased pituitary response to somatomedin in aging male rats: relationship to somatostatin receptor number and affinity. *Neuroendocrinology* 50: 489-494.
- Stader C, Sigal I, Dixon R** (1989) Structural basis of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *FASEB J* 3: 1825-1832.
- Stein SA, Oates EL, Hall CR, Grumbles RM, Fernandez LM, Taylor NA, Puett D, Jin S** (1994) Identification of a point mutation in the thyrotropin receptor of the hyt/hyt hypothyroid mouse. *Mol Endocrinol* 8: 129-138.
- 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.
- Stracke H, Schultz A, Moeller D, Rossol S, Schaltz H** (1984) Effect of GH on osteoblasts and demonstration of somatomedin C/IGF-1 in bone organ culture. *Acta Endocrinol (Copenh)* 107: 16-24.
- Strobl JS, Thomas MJ** (1994) Human growth hormone. *Pharmacol Rev* 46: 1-34.
- Takahashi S, Gottschall P, Quigley K, Goya R, Meites J** (1987) Growth hormone secretory patterns in young, middle-aged and old female rats. *Neuroendocrinology* 46: 137-142.
- Takahashi S, Meites J** (1987) GH binding to the liver in young and old female rats: Relation to somatomedin-C secretion. *Proc Soc Exp Biol Med* 186: 229-233.

- Takahashi T, Okimura Y, Yoshimura K, Shigeyoshi Y, Kaji H, Abe H, Chihara K** (1995) Regional distribution of growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor mRNA in the rat brain. *Endocrinology* 136: 4721-4724.
- Takukara K, Yamada H, Hollander UP** (1967) The effect of growth hormone on development of plasma cell tumour lymphosarcoma. *Cancer Res* 27: 2034-2038.
- Tam S-P, Lam KSL, Srivastava G** (1996) Gene expression of hypothalamic somatostatin, growth hormone-releasing factor, and their pituitary receptors in hypothyroidism. *Endocrinology* 137: 418-424.
- Tamaki M, Sata M, Matsubara S, Wada, Takahara J** (1996) Dexamethasone increases growth-hormone (GH)-releasing hormone (GRH) receptor mRNA levels in cultured rat anterior pituitary cells. *J Neuroendocrinol* 8: 475-480.
- Tang JO, Lagacé G, Castagné J, Collu R.** Abstract 220.3, 24th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November 1994.
- Tannenbaum GS, Zhang WH, Lapointe M, Zeitler P, Beaudet A** (1998) Growth hormone-releasing hormone neurons in the arcuate nucleus express both Sst1 and Sst2 somatostatin receptor genes. *Endocrinology* 139 : 1450-1453.
- Tannenbaum GS, Ling N** (1984) The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 115: 1952-1957.
- Tannenbaum GS, Rorstad O, Brazeau P** (1979) Effects of prolonged food deprivation on the ultradian growth hormone rhythm and immunoreactive somatostatin tissue levels in the rat. *Endocrinology* 104: 1733-1738.
- Thissen JP, Ketelslegers J-M, Underwood LE** (1994) Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 15: 80-101.
- Thorner MO, Holl RW, Leong DA** (1988) The somatotrope: an endocrine cell with functional calcium transients. *J Exp Biol* 139: 169-179.
- Thorner MO, Vance ML, Horvath E, Kovak K** (1992) The anterior pituitary gland. In: *Textbook of Endocrinology*, 8e éd. Wilson JD, Foster DW (éds). WB Saunders Company, Philadelphie, pp 221-310.

- Tuggle CK, Trenkle A** (1996) Control of growth hormone synthesis. *Domestic Animal Endocrinol* 13: 1-33.
- Tushinski RJ, Sussman PM, Yu L-Y, Bancroft FC** (1977) Pre-growth hormone messenger RNA : Glucorticoid induction and identification in rat pituitary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 : 2357-2361.
- Ulloa-Aguirre A, Blizzard RM, Garcia-Rubi E, Rogol AD, Link K, Christie CM, Johnson ML, Veldhuis JD** (1990) Testosterone and oxandrolone, a non-aromatizable androgen, specifically amplify the mass and rate of growth hormone (GH) secreted per burst without altering GH secretory burst duration or frequency or the GH half-life. *J Clin Endocrinol Metab* 71:846-854.
- Underwood LE, Van Wyk JJ** (1992) Normal and aberrant growth. In: *Textbook of Endocrinology*, 8e éd. Wilson JD, Foster DW (éds). WB Saunders Company, Philadelphie, pp.1079-1138.
- Vale W, Vaughan J, Yamamoto G, Spiess J, Rivier J** (1983) Effects of synthetic human pancreatic (tumor) GH releasing factor and somatostatin, triiodothyronine and dexamethasone on GH secretion in vitro. *Endocrinology* 112: 1553-1555.
- Van der Veen E, Netelenbos JC** (1990) Growth hormone (replacement) therapy in adults: bone and calcium metabolism. *Horm Res* 33 (suppl 4): 65-68.
- Veldhuis JD, Lizarralde G, Iranmanesh A** (1992) Divergent effects of short term glucocorticoid excess on the gonadotropic and somatotropic axes in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 74 : 96-102.
- Veliçelebi G, Santocroce TM, Harpold MK** (1985) Specific binding of synthetic human pancreatic growth hormone releasing factor (1-40-OH) to bovine anterior pituitaries. *Biochem Biophys Res Commun* 126: 33-39.
- Vermeulen A** (1987) Nyctohemoral growth hormone profiles in young and aged men: correlations with somatomedin-C levels. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 884-888.
- Viollet C, Prevost G, Maubert E, Faivre-Bauman A, Gardette A, Kordon C, Loudes C, Sama A, Epelbaum J** (1995) Molecular pharmacology of somatostatin receptors. *Fundamental & Clin Pharm* 9:107-113.



- Vittone J, Blackman MR, Busby-Whitehead J, Tsiao C, Stewart KJ, Tobin J, Stevens T, Bellantoni MF, Rogers MA, Bauman G, Roth J, Harman SM, Spencer GR** (1997) Effects of a single nightly injections of growth hormone-releasing hormone (GHRH 1-29) in healthy elderly men. *Metabolism: Clin Exp* 46: 89-96.
- Waraachakul N, Strong, Wood WG, Richardson A** (1989) The effect of aging and dietary restriction on DNA repair. *Exp Cell Res* 181 : 197-204.
- Wajnrajch MP, Chua SC, Green ED, Leibel RL** (1994) Human growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) maps to a YAC at chromosome 7p15. *Mamm Genome* 5: 595.
- Walker RF, Ness GC, Zhao Z, Bercu BB** (1994) Effects of stimulated growth hormone secretion on age-related changes in plasma cholesterol and hepatic low density lipoprotein messenger RNA concentrations. *Mechanisms Ageing Development* 75: 215-226.
- Walker RF, Yang SW, Bercu BB** (1991) Robust growth hormone secretion in aged female rats co-administered GH-releasing hexapeptide (GHRP-6) and growth hormone-releasing peptide. *Life Sci* 49: 1499-1504.
- Ward WF** (1988) Enhancement by food restriction of liver protein synthesis in the aging Fisher 344 rat. *J Gerontol Biol Sci* 43: B50-53.
- Webb CB, Vance ML, Thornes MO, Perisutti G, Thomine J, Rivier J, Vale N, Frohman LA** (1984) Plasma growth hormone responses to constant infusions of human pancreatic growth hormone releasing factor. Intermittent secretion or response attenuation. *J Clin Invest* 74: 96-103.
- Wehrenberg WB, Brazeau P, Luben R, Bohlen P, Guillemin R** (1982) Inhibition of the pulsatile secretion of GH by monoclonal antibodies to the hypothalamic growth hormone releasing factor (GRF). *Endocrinology* 111: 2147-2148.
- Weindruch R, Walford RL** (1988) The retardation of aging and disease by dietary restriction. Springfield IL, Charles Thomas, pp. 7-215.
- Weissberger AJ, Ho KY, Lazarus L** (1991) Contrasting effects of oral and transdermal routes of estrogen replacement therapy on 24-hour growth hormone (GH) secretion, insulin-like growth factor I, and GH-binding protein in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 374-381.

- Weraarchakul N, Richardson A** (1988) Effect of age and dietary restriction on DNA repair. *FASEB J* 2: A1209.
- Williams T, Berelowitz M, Joffe SN, Thorner MO, Rivier J, Vale W, Frohman LH** (1984) Impaired growth hormone response to growth hormone-releasing factor in obesity. *N Engl J Med* 211: 1403-1407.
- Winer LM, Shaw MA, Bauman G** (1990) Basal plasma growth hormone levels in man: new evidence for rhythmicity of growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 1678-1686.
- 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.
- 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.
- Yamashita S, Melmed S** (1986) Insulin-like growth factor I action on rat anterior pituitary cells: suppression of growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 118: 176-182.
- Yamashita S, Melmed S** (1986) Insulin regulation of rat growth hormone gene transcription. *J Clin Invest* 78: 1008-1041.
- Young VR, Steffee WP, Pencharz PB** (1975) Total human body protein synthesis in relation to protein requirements at various ages. *Nature* 253: 192-194.
- Youngman L, Park JW, Kim JY, Ames BN** (1992) Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calorie. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 9112-9116.
- Yu BP** (1994) How diet influences the aging process of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 205: 97-105.

## Remerciements

Je tiens à remercier Dr Pierrette Gaudreau qui, tout au long de mes études dans son laboratoire, m'a fourni un milieu d'apprentissage stimulant. Son soutien constant et ses commentaires ont été indispensables à mon cheminement. Je suis également reconnaissante envers Luce Boulanger qui était toujours disponible pour discuter et m'offrir une aide indispensable. Mon travail a également été grandement facilité par Serge Boucher et François Boisvert qui m'ont toujours offert une grande collaboration et une disponibilité grandement appréciée. Stéphane Denis et Isabelle Dion ont également contribué à mes travaux grâce à un soutien technique précieux. Finalement, je veux remercier tout particulièrement François Gravel pour son appui inconditionnel, son aide et sa patience tout au long de ce travail et sans qui je n'aurais pu le compléter.

**Annexe 1:** Apport de chaque auteur aux travaux et à la rédaction des articles.

Les travaux rapportés dans ce mémoire ont été effectués dans leur quasi-totalité par Nathalie Girard. Les autres auteurs des articles faisant partie du corps de ce mémoire ont contribué à l'avancement de mon projet par un soutien à la planification des protocoles et une discussion des résultats (P. Gaudreau, superviseure, chercheure agrégée, département de médecine, Université de Montréal), un accès à une colonie de rats en restriction calorique (G. Ferland, professeur adjoint, département de nutrition, Université de Montréal) et un support technique complémentaire (L. Boulanger et S. Denis). Je suis également l'auteur principal des articles sous la supervision de Dr P. Gaudreau.