

Université de Montréal

**Étude des mécanismes associés aux effets bénéfiques de la restriction calorique sur la fonction somatotrope du rat vieillissant**

Par  
Karine Bédard

Département de Biochimie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophia doctor* (Ph.D.)  
en Biochimie

Juillet 2011

© Karine Bédard, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Étude des mécanismes associés aux effets bénéfiques de la restriction calorique sur la fonction somatotrope du rat vieillissant**

présentée par  
Karine Bédard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

D<sup>r</sup> Gerardo Ferbeyre  
*Président-rapporteur*

D<sup>re</sup> Pierrette Gaudreau  
*Directrice de recherche*

D<sup>r</sup> Huy Ong  
*Membre du jury*

D<sup>r</sup> Michel Lebel  
*Examineur externe*

D<sup>r</sup> François Larivière  
*Représentant du Doyen*

## I. RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS FRANÇAIS

Dans les cellules somatotropes, la liaison du facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH) à son récepteur (GHRH-R) stimule la synthèse et la sécrétion de l'hormone de croissance (GH) ainsi que la prolifération cellulaire. Chez les mammifères, le vieillissement est caractérisé par une diminution de la sécrétion de GH, liée à une perte de sensibilité des somatotropes au GHRH. Chez le rat âgé, des modifications de niveaux d'ARNm du GHRH-R et une diminution d'affinité et de capacité de liaison du GHRH sont rapportés. Au cours du vieillissement, une augmentation des niveaux de glucose et d'acides gras libres sérique suggère qu'une gluco- ou lipotoxicité puisse contribuer au dysfonctionnement de la fonction somatotrope.

À ce jour, la restriction calorique modérée de longue durée (RCMLD) constitue l'intervention la plus efficace pour prévenir ou retarder les détériorations liées à l'âge. Des études ont montré des effets bénéfiques de la RCMLD sur l'axe somatotrope au cours du vieillissement via un maintien des paramètres de liaison du GHRH-R. Compte tenu de l'importance de cet axe, la compréhension des mécanismes menant à la somatopause ainsi que ceux associés aux effets bénéfiques de la RCMLD s'avère importante.

Les objectifs principaux de la présente thèse étaient : 1) de déterminer les effets de la RCMLD chez le rat, sur le GHRH-R hypophysaire et la sensibilité des somatotropes au GHRH, 2) d'identifier les mécanismes associés à la somatopause et aux effets bénéfiques de la RCMLD, et 3) de préciser les effets d'une gluco-ou lipotoxicité sur l'axe somatotrope de rats et leur implication dans la somatopause.

Des rats de 8 mois ont été soumis à une restriction calorique de 40% jusqu'à l'âge de 18-20 mois et ont été comparés à des rats jeunes et âgés nourris *ad libitum*. Cette étude a permis de mettre en évidence des effets bénéfiques de la RCMLD sur la régulation et la fonctionnalité du GHRH-R et de proposer que le glucose et les acides gras libres (AGL) circulants soient impliqués dans le vieillissement de la somatotrope. Une étude de micro-puce à ADN a permis d'identifier des gènes associés à des mécanismes de protection et de

réparation des dommages cellulaires mis en place dans l'hypophyse antérieure au cours du vieillissement et par la RCMLD. Finalement, les effets d'un stress gluco- ou lipotoxique sur la fonction somatotrope ont été étudiés chez des rats de 2 et 6 mois, infusés 72 h avec une solution de glucose ou d'Intralipides, mimant les niveaux circulants de glucose et d'AGL retrouvés chez le rat âgé. Les résultats obtenus montrent que la glucotoxicité affecte la régulation de certains gènes de la somatotrope, dont le GHRH-R, et suggèrent que la capacité de réponse à ce type de stress est altérée. Les mécanismes par lesquels la glucotoxicité exerce ces effets pourraient inclure la génération de stress oxydant.

L'ensemble de ces résultats proposent de nouvelles pistes mécanistiques qui pourraient contribuer au retardement de la somatopause et, ultimement, à l'élaboration de nouvelles stratégies d'intervention nutritionnelles ou pharmacologiques ciblant les mêmes voies que la RCMLD, avec une efficacité similaire ou supérieure.

**Mots clés** : GHRH-R, Somatotrope, Vieillesse, Restriction calorique modérée de longue durée, Glucotoxicité, Lipotoxicité, Stress oxydant.

## II. RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS ANGLAIS

In somatotroph cells, growth hormone-releasing hormone (GHRH) binding to its receptor (GHRH-R) stimulates growth hormone (GH) secretion and cell proliferation. In mammals, aging is characterized by a decrease of GH, associated with a decline of GHRH somatotroph sensitivity. In the aged rat, changes in GHRH-R mRNA levels and decrease of GHRH affinity and capacity were reported. In the course of aging, significant increase of glucose and free fatty acid (FFA) serum levels are observed, suggesting that gluco- or lipotoxicity could contribute to somatotroph dysfunction.

Up to now, long-term moderate caloric restriction (LTMCR) has been the most efficient intervention to prevent or delay age-related deteriorations. Studies have shown beneficial effects of LTMCR on somatotroph axis during aging, through the maintenance of GHRH-R binding parameters. Knowing the importance of this axis, an understanding of the mechanisms associated with the effects of somatopause and benefits of LTMCR is important.

Therefore, the main objectives of this thesis were: 1) to determine the effects of LTMCR on rat pituitary GHRH-R and somatotroph sensitivity to GHRH, 2) to identify the mechanisms associated to somatopause and the beneficial effects of LTMCR and 3) to specify the effect of gluco- or lipotoxicity on the rat somatotroph axis and their implications in somatopause.

Eight-month-old rats were submitted to a 40% LTMCR until the age of 18 to 20-months and were compared to young and old rats fed ad libitum (AL). This study highlighted beneficial effects of LTMCR on GHRH-R regulation and functionality and suggested that high circulating levels of glucose and FFA could be involved in somatotroph aging. A microarray study was also performed, allowing the identification of genes associated to cellular protection and damage repair mechanisms regulated by aging and LTMCR in the anterior pituitary. Finally, effects of a gluco- or lipotoxic stress on the somatotroph function was assessed in 2- and 6-month-old rats submitted to a 72-h glucose

and/or Intralipid infusion, to mimic the levels of glucose and FFA found in aged rats. The results showed that glucotoxicity affects the regulation of specific genes in the somatotroph, such as the GHRH-R gene, and suggest that the response capacity against this type of stress is altered with age very early on. Mechanisms by which glucotoxicity exerts these effects might include oxidative stress production.

Altogether, these results proposed novel mechanisms that could contribute to delay somatopause and, ultimately, to the development of new nutritional or pharmacologic interventions targeting the same pathways as LTMCR, with a similar or greater efficiency.

**Key words:** GHRH-R, Somatotroph, Aging, Long-term moderate caloric restriction, Glucotoxicity, Lipotoxicity, Oxidative stress.

### III. TABLE DES MATIÈRES

I. RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS FRANÇAIS .....	I
II. RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS ANGLAIS.....	III
III. TABLE DES MATIÈRES .....	V
IV. LISTE DES FIGURES .....	IX
V. LISTE DES TABLEAUX .....	XI
VI. LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIII
VII. REMERCIEMENTS.....	XVIII
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. L'AXE SOMATOTROPE .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. LE FACTEUR DE LIBÉRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE.....</b>	<b>5</b>
1.2.1. Structure du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	5
1.2.2. Structure du gène du facteur de libération de l'hormone de croissance .....	6
1.2.3. Localisation du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	7
1.2.4. Rôles du facteur de libération de l'hormone de croissance .....	7
1.2.4.1. Stimulation de la synthèse de l'hormone de croissance .....	7
1.2.4.2. Prolifération et différenciation cellulaire .....	8
1.2.4.3. Contrôle de l'appétit.....	9
1.2.4.4. Contrôle du sommeil .....	10
1.2.5. Régulation de l'expression du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	11
<b>1.3. RÉCEPTEUR DU FACTEUR DE LIBÉRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE.....</b>	<b>12</b>
1.3.1. Structure du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance .	12

1.3.2. Structure du gène du GHRH-R .....	15
1.3.3. Localisation du GHRH-R.....	15
1.3.4. Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du GHRH-R.....	17
1.3.5. Voies de signalisation impliquées dans la fonctionnalité du GHRH-R .....	17
1.3.5.1. La voie adénylate cyclase-AMPc-protéine kinase A.....	18
1.3.5.2. La voie des phosphatidylinositols/ diacylglycérol/ protéine kinase C .....	20
1.3.5.3. La voie des MAPK .....	20
1.3.5.4. Autres voies de signalisation .....	21
1.3.6. Régulation de l'expression du récepteur du GHRH.....	21
1.3.6.1. GHRH et IGF-1 .....	22
1.3.6.2. Les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes.....	23
1.3.6.3. Le diabète et l'insuline .....	24
1.3.6.4. La glucolipotoxicité.....	25
<b>1.4. LA SOMATOSTATINE ET SES RÉCEPTEURS .....</b>	<b>27</b>
1.4.1. Structure, localisation et rôles de la somatostatine .....	27
1.4.2. Régulation de l'expression de la somatostatine .....	28
1.4.3. Les récepteurs de la somatostatine.....	28
1.4.4. Les voies de signalisations activées par la somatostatine .....	30
<b>1.5. LA GHRÉLINE ET SON RÉCEPTEUR .....</b>	<b>31</b>
1.5.1. Structure, localisation et rôles de la ghréline .....	31
1.5.2. Régulation de l'expression de la ghréline .....	32
1.5.3. Le récepteur de la ghréline.....	32
1.5.4. Les voies de signalisations activées par la ghréline .....	33
<b>1.6. LE FACTEUR DE CROISSANCE INSULINIQUE DE TYPE 1, SON RÉCEPTEUR ET SES PROTÉINES DE LIAISON .....</b>	<b>34</b>
1.6.1. Structure, localisation et rôles de l'IGF-1 .....	34



1.6.2. Régulation de l'expression de l'IGF-1 .....	35
1.6.3. Le récepteur de l'IGF-1.....	36
1.6.4. Les voies de signalisations activées par l'IGF-1 .....	36
1.6.5. Les protéines de liaison de l'IGF-1 .....	37
<b>1.7 RÔLE DES CYTOKINES INFLAMMATOIRES DANS LA RÉGULATION DES COMPOSANTES DE L'AXE SOMATOTROPE.....</b>	<b>38</b>
<b>1.8. LE VIEILLISSEMENT.....</b>	<b>41</b>
1.8.1. Les théories biologiques du vieillissement .....	41
1.8.1.1. La théorie des radicaux libres.....	41
1.8.1.2. La glycation non-enzymatique .....	46
1.8.1.3. La théorie neuroendocrinienne .....	47
1.8.2. Vieillessement de l'axe somatotrope.....	48
<b>1.9. LA RESTRICTION CALORIQUE .....</b>	<b>50</b>
1.9.1. Effets de la restriction calorique de longue durée chez les mammifères .....	50
1.9.2. Effets de la restriction calorique sur l'axe somatotrope.....	52
<b>1.10. AUTRES INTERVENTIONS NUTRITIONNELLES.....</b>	<b>53</b>
1.10.1. Les vitamines .....	53
1.10.2. La S-adénosyl-méthionine .....	54
1.10.3. Le soya et les isoflavones.....	55
<b>2. JUSTIFICATION DE L'ÉTUDE .....</b>	<b>56</b>
<b>3. MANUSCRITS.....</b>	<b>60</b>
<b>3.1. Effects of long-term dietary interventions on pituitary growth hormone-releasing hormone receptor in aging rats and potential mechanisms of action.....</b>	<b>61</b>
<b>3.2. Aging and diets regulate the rat anterior pituitary and hypothalamic transcriptome .....</b>	<b>105</b>
<b>3.3. Age-related effects of <i>in vivo</i> gluco- and lipotoxicity on the rat somatotroph axis.....</b>	<b>206</b>

<b>3.4 RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES NON-PUBLIÉS .....</b>	<b>235</b>
Effets à long terme d'une diète enrichie en antioxydants sur l'axe somatotrope chez le rat vieillissant .....	235
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>253</b>
<b>4.1. Effets de la RCMLD sur le GHRH-R hypophysaire et la fonction somatotrope de rat au cours du vieillissement .....</b>	<b>255</b>
<b>4.2. Contribution de la gluco- et lipotoxicité aux processus du vieillissement de l'axe somatotrope et prévention par la RCMLD.....</b>	<b>258</b>
<b>4.3. Rôle du stress oxydant dans les effets du vieillissement sur la cellule somatotrope et protection par la RCMLD.....</b>	<b>263</b>
<b>4.4. Effets du vieillissement et de la RCMLD sur la régulation des gènes de l'hypophyse antérieure et de l'hypothalamus.....</b>	<b>266</b>
4.4.1. Reg3b, un nouveau gène impliqué dans le vieillissement de la somatotrope .....	271
4.4.2. IGFBP3, un gène d'intérêt dans les effets bénéfiques de la RCMLD. ....	275
<b>5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>278</b>
<b>6. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>284</b>

## IV. LISTE DES FIGURES

### 1. INTRODUCTION

<b>Figure 1</b>	Contrôle de la sécrétion d'hormone de croissance dans la cellule somatotrope.....	4
<b>Figure 2</b>	Représentation schématique du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat.....	14
<b>Figure 3</b>	Voies de signalisation impliquées dans la réponse au GHRH dans l'hypophyse antérieure .....	19
<b>Figure 4</b>	Principales théories biologiques du vieillissement .....	43
<b>Figure 5</b>	La réponse cellulaire au stress oxydant.....	45

### 3. MANUSCRITS

#### 3.1 Effects of long-term dietary interventions on pituitary growth hormone-releasing hormone receptor in aging rats and potential mechanisms of action

<b>Figure 1</b>	Experimental design of dietary interventions.....	95
<b>Figure 2</b>	Effects of age, LTMCR and dietary protein intake on anterior pituitary GHRH-R mRNA transcript levels in 12- and 18-month-old rats.....	96
<b>Figure 3</b>	Effects of age and LTMCR on anterior pituitary [ <sup>125</sup> I-Tyr <sup>10</sup> ] hGHRH (1-44)NH <sub>2</sub> binding profiles in 18-month-old rats.....	98
<b>Figure 4</b>	Effects of age and LTMCR on GHRH-induced cAMP production in the anterior pituitary of 19-month-old rats.....	99
<b>Figure 5</b>	Effects of age, LTMCR and dietary protein intake on hypothalamic GHRH mRNA levels in 18-month-old rats.....	100
<b>Figure 6</b>	Effects of age and LTMCR on GHRH-induced BrdU incorporation in anterior pituitary cells from 20-month-old rats.....	101
<b>Supplementary figure 1:</b>	Direct effect of insulin on GHRH-R and GH mRNA levels in anterior pituitary cultured cells from 2-month-old rats.....	104

### 3.2 Aging and diets regulate the rat anterior pituitary and hypothalamic transcriptome

<b>Figure 1</b>	Schematic experimental design and analysis of microarray data.....	138
<b>Figure 2</b>	Number of differentially expressed genes in the anterior pituitary and hypothalamus .....	139
<b>Figure 3</b>	Real-time RT-PCR validation of selected genes in the anterior pituitary .....	140
<b>Figure 4</b>	Schematic proposed mechanisms of cell response to aging (A) and LTMCR (B) in the anterior pituitary.....	142

### 3.3 Age-related effects of in vivo gluco- and lipotoxicity on the rat somatotroph axis

<b>Figure 1</b>	Anterior pituitary mRNA levels of genes related to the somatotroph function in 2-month-old infused rats .....	231
<b>Figure 2</b>	Anterior pituitary mRNA levels of genes expression related to the somatotroph function in 6-month-old infused rats.....	232
<b>Figure 3</b>	Plasma IGF-1 and IGFBP 3 levels of 2- and 6-month-old infused rats.....	233
<b>Supplementary figure 1:</b>	Hypothalamic mRNA levels of GHRH and SRIF genes in 2-month-old infused rats.....	234

### 3.4 RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES NON-PUBLIÉS :

#### Effets à long-terme d'une diète enrichie en antioxydants sur l'axe somatotrope chez le rat vieillissant

<b>Figure 1</b>	Effets du vieillissement et d'une diète enrichie en antioxydant sur les niveaux d'ARN de GH, GHRH-R et REG3B hypophysaire.....	251
-----------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

## 4. DISCUSSION

<b>Figure 6</b>	Résumé des mécanismes potentiels de régulation du gène Reg3b et des rôles possibles du Peptide 23 dans la somatotrope de rat.....	274
<b>Figure 7</b>	Mécanismes potentiellement impliqués dans les effets bénéfiques de la RCMLD sur la fonction somatotrope du rat vieillissant.....	280

## V. LISTE DES TABLEAUX

### 1. INTRODUCTION

<b>Tableau 1</b>	Synthèse des principaux facteurs hormonaux et métaboliques régulant les composantes de l'axe somatotrope chez le rat.....	40
------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### 3. MANUSCRITS

#### 3.1. Effects of long-term dietary interventions on pituitary growth hormone-releasing hormone receptor in aging rats and potential mechanisms of action

<b>Table 1</b>	Body weight and organ wet weight: effect of age, long-term caloric restriction and protein intake level.....	92
<b>Table 2</b>	Serum hormones, FFA and glucose concentrations: effect of age, long-term caloric restriction and dietary protein intake .....	93
<b>Table 3</b>	Estimates of [127I-Tyr10]hGHRH(1-44)NH <sub>2</sub> binding parameters in anterior pituitary homogenates: effect of age, long-term caloric restriction and dietary protein intake .....	94

#### 3.2. Aging and diets regulate the rat anterior pituitary and hypothalamic transcriptome

<b>Table 1</b>	Effect of age and diet on BW, BMI and serum hormone concentrations.....	135
<b>Table 2</b>	Most significant biological functions represented among regulated genes.....	136
<b>Table 3</b>	List of genes regulated by aging and LTMCR in the anterior pituitary .....	137

**Supplementary tables**

<b>Supplemental Table 1</b>	Primers used for real-time RT-PCR validation.....	144
<b>Supplemental Table 2*</b>	List of genes regulated by aging in the anterior pituitary.....	145
<b>Supplemental Table 3</b>	List of genes regulated by aging, classified by biological functions.....	178
<b>Supplemental Table 4*</b>	List of genes regulated by aging in the hypothalamus....	182
<b>Supplemental Table 5*</b>	List of genes regulated by LTMCR in the anterior pituitary.....	191
<b>Supplemental Table 6</b>	List of genes regulated by LTMCR, classified by biological functions.....	196
<b>Supplemental Table 7</b>	List of genes regulated by LTMCR in the hypothalamus .....	198
<b>Supplemental Table 8*</b>	List of genes regulated by dietary soy .....	200
<b>Supplemental Table 9</b>	List of genes regulated by dietary soy, classified by biological functions in the rat anterior pituitary.....	205

**3.3. Age-related effects of in vivo gluco- and lipotoxicity on the rat somatotroph axis**

<b>Table 1</b>	Primers used for real-time PCR.....	229
<b>Table 2</b>	Body weight, metabolic and hormonal parameters at endpoint (72 h).....	230

**3.4. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES NON-PUBLIÉS :****Effets à long-terme d'une diète enrichie en antioxydants sur l'axe somatotrope chez le rat vieillissant**

<b>Tableau 1</b>	Poids corporel et glycémie des rats : effet de l'âge et d'une diète enrichie en sucrose et/ou en antioxydants.....	250
------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

## VI. LISTE DES ABRÉVIATIONS

8-oxodG	8-oxo-désoxyguanine
aa	Acide aminé
AC	Adénylate cyclase
ACTH	Adrénocorticotrophine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	Produits avancés de glycation non-enzymatique
AGL	Acides gras libres
AKT	Protéine kinase B
AL	<i>Ad libitum</i>
ALS	<i>Acid labile subunit</i>
AMPC	Adénosine 3'-5'-cyclique monophosphate
AP-1	Protéine activatrice-1
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATL	Anse de Henlé ascendante mince
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BrdU	5-bromo-2'-déoxyuridine
Brn-2	Facteur de transcription brain-2
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CALERIE	<i>Comprehensive Assessment of the Long-term Effects of Reducing Intake Energy</i>
CAT	Catalase
C/EBP $\alpha$	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CRB	Protéine nucléaire de liaison au facteur CREB
CREB	Facteur de transcription se liant à l'élément de réponse à l'adénosine 3'-5' monophosphate
Cu	Cuivre
Cys	Cystéine
DAG	Diacylglycérol
ER	Récepteur à l'œstrogène
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>

Ets-1	<i>E26 transformation-specific-1 factor</i>
FSH	Folliculostimuline
g	Gramme
GH	Hormone de croissance
GH-R	Récepteur de l'hormone de croissance
GHRH	Facteur de libération de l'hormone de croissance
GHRH-R	Récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance
GHRP-6	<i>Growth-hormone related peptide 6</i>
GHS-R	Récepteur de la ghréline
GIP	Peptide gastro-inhibiteur
GLP	<i>Glucagon-like peptide</i>
Glrx	Glutaredoxin
GLU	Glucose
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
Gpx	Glutathion peroxydase
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
GRK2	Kinase 2 des GPCR
Gs	Protéine G de type stimulatrice
Gsta3	Glutathion s-transférase 3
h	Heure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HSP	<i>Heat-shock protein</i>
icv	Intracérébroventriculaire
IGF-I	Facteur insulinique de croissance de type I
IGF-1R	Récepteur de l'IGF-1
IGF-2	Facteur insulinique de type 2
IGFBP	Protéine de liaison de l'IGF
IL	Intralipides
ip	Intra-péritonéal
IP3	1,4,5-inositol-phosphate



IP3K	Kinase de l'inositol triphosphate
IRS-1	Substrat du récepteur de l'insuline 1
JAK	<i>Janus kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K <sup>+</sup>	Potassium
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramme
LH	Lactotropine
LPO	Lipoperoxydation
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	Kinase des MAPK
mg	Milligramme
min	Minute
mM	Millimolaire
MtT/S	Lignée cellulaire tumorale de somatotropes de rat
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
Nf-1	Facteur nucléaire 1
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
nM	Nanomolaire
NO	Oxyde nitrique
NREMS	<i>Non-rapid-eye-movement sleep</i>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoxyde
OH <sup>-</sup>	Radicaux hydroxyles
P21 <sup>ras</sup>	Protéine P21 du sarcome de rat
PACAP	Peptide activateur de l'adénylate cyclase hypophysaire
pb	Paire de bases
PC	Poids corporel
PDB	Phorbol 12,13-dibutyrate
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
Pit-1	Facteur de transcription spécifique à l'hypophyse
PKA	Protéine kinase A

PKB	Protéine kinase B (AKT)
PKC	Protéine kinase C
pM	Picomolaire
PMA	4 $\beta$ -phorbol 12-myristate 13-acétate
PRL	Prolactine
RAGE	Récepteur des produits avancés de glycation
RC	Restriction calorique
REMS	<i>Rapid-eye-movement sleep</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RT-PCR	Amplification en chaîne par une polymérase précédée d'une étape de transcription inverse
SAL	Salin
SAMe	S-adénosyl-méthionine
Sc	Sous-cutané
SD	Sprague Dawley
SHC	Domaines homologues à Src
SOD	Superoxyde dismutase
SP-1	Protéine spécifique-1
Src	Protéine de sarcome de rat
SRIF	Somatostatine
SSTR	Récepteur de la somatostatine
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
STZ	Streptozotocine
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TBARS	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TGF- $\beta$	Facteur de croissance transformant bêta
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale alpha
TPA	Acétate de tétradécanoylphorbol
TSH	Thyrotropine
ug	Microgramme
USF	<i>Upstream regulatory factor</i>

UV	Ultraviolet
VIP	Peptide intestinal vasoactif
Zn	Zinc

## VII. REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à ma directrice de recherche, Dre Pierrette Gaudreau, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir guidée tout au long de ce parcours. Merci Pierrette d'avoir été aussi disponible et de m'avoir toujours encouragée.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, les Drs Gerardo Ferbeyre, Huy Ong, Michel Lebel et François Larivière d'avoir accepté de corriger ma thèse de doctorat. C'est un grand honneur pour moi de bénéficier de vos commentaires et suggestions qui en rehausseront la qualité. J'aimerais également remercier les Drs Philippe Crine, Vincent Poitout et Réjean Couture, d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et d'examen prédoctoral. Vous avez suivi mon évolution au cours de ces dernières années et j'ai beaucoup apprécié vos suggestions et discussions qui ont contribué à ma formation.

J'aimerais également remercier les chercheurs qui ont collaboré avec notre laboratoire et m'ont permis de faire avancer mon projet de doctorat, le D<sup>r</sup> Vincent Poitout du CRCHUM, et son équipe, ainsi que le Dr W. Wayne Lutt de l'université du Manitoba.

Je voudrais remercier le Fonds de la recherche en santé du Québec, le département de Biochimie de l'Université de Montréal ainsi que le Réseau Québécois de la recherche sur le vieillissement (RQRV) pour m'avoir accordé des bourses tout au long de ma formation.

Merci à tous les membres du laboratoire NEV présents ou passés, particulièrement Julie Bédard, Patricia L'Archer, Karyne Thériault et Daniel Langlois pour leur aide précieuse et leurs prodigieux conseils. Merci aux étudiantes stagiaires pour leur aide, Catherine Lagacé, Julia Efharisto, Stéphanie Meunier et Padma Madiraju avec lesquelles j'ai eu grand plaisir à travailler. À Dr Emmanuel Moyse, qui m'a permis de faire un stage dans son laboratoire à Marseille et avec qui j'ai collaboré pendant son passage parmi nous au Québec, merci pour les discussions enrichissantes. Je veux remercier aussi mes collègues à Angus, en particulier Julie Amyot, Émilie Pépin, Julien Lamontagne et Mélanie Borie que j'ai eue grand plaisir à connaître et à côtoyer tout au long de mon doctorat. Un remerciement particulier à mon amie Marie-Andrée qui m'a accompagné dans ce cheminement depuis le

baccalauréat et qui m'a soutenue durant ces cinq dernières années, un gros merci! Merci aussi à mes amies Nathalie, Jessica et Sophie pour être toujours aussi présentes.

Finalement, je voudrais remercier mon conjoint Philippe, pour son amour, sa patience, son soutien et sa présence dans tous les moments de cette expérience. J'ai vraiment beaucoup de chance de t'avoir à mes côtés. Un gros merci à ma famille, pour leurs encouragements constants et l'amour qu'ils me donnent. La confiance et la fierté que vous avez placé en moi me stimulent à avancer toujours plus loin.

Merci à tous !

# **1. INTRODUCTION**

## 1.1. L'AXE SOMATOTROPE

Chez les mammifères, l'axe hypothalamo-hypophysaire est essentiel dans le contrôle d'hormones impliqués dans plusieurs réponses physiologiques dont la croissance, la réponse au stress et le métabolisme hydrique. L'hypophyse est composée d'un lobe postérieur, essentiellement neuronal, d'un lobe intermédiaire et d'un lobe antérieur. L'hypophyse antérieure est constituée de cinq types de cellules endocriniennes. Les cellules somatotropes, responsables de la synthèse et sécrétion d'hormone de croissance (GH), représentent environ 40-60 % de la population cellulaire alors que les cellules lactotropes, sécrétant la prolactine (PRL) constituent 10-25 % des cellules adénohypophysaires. Un peu moins nombreuses, les cellules corticotropes (15-20 %) et les gonadotropes (10-15 %) sont responsables de la synthèse et sécrétion d'hormone adrénocorticotropique (ACTH) et d'hormone folliculo-stimulante (FSH) et lutéinisante (LH), respectivement. Finalement les cellules thyrotropes, sécrétrices de l'hormone thyroïdienne (TSH), représentent environ 10% des cellules d'hypophyse antérieure (Tyrell et al., 1994). Dans le cadre de ce projet de doctorat, nous nous sommes précisément intéressés à la régulation de la fonction somatotrope.

La GH est une hormone peptidique de 191 acides aminés (aa) qui exerce un rôle central dans la croissance longitudinale de la naissance et de la puberté (Giustina et al., 2008). Chez l'adulte, elle agit dans le maintien des fonctions métaboliques et de l'intégrité tissulaire et cellulaire (Moller et Jorgensen, 2009; Woodhouse et al., 2006). Ainsi, elle active la prolifération et la différenciation cellulaire de plusieurs tissus et organes incluant l'os, le cartilage et le muscle (Giustina et al., 2008; Velloso, 2008). Elle est également l'une des hormones anaboliques les plus importantes de l'organisme. La GH augmente la synthèse protéique et diminue la dégradation des acides aminés (Moller et Jorgensen, 2009). La GH stimule l'utilisation des réserves adipeuses comme source d'énergie en augmentant la lipolyse et les niveaux d'acides gras libres (AGL) (Moller et Jorgensen, 2009). Elle exerce également un effet hyperglycémiant à court terme, en augmentant la production de glucose endogène et en diminuant l'utilisation du glucose par le muscle (Moller et Jorgensen, 2009).

Chez les mammifères, la sécrétion de GH est pulsatile (Tannebaum et Martin, 1976 ; Veldhuis et Bowers, 2003) et suit un rythme circadien qui se caractérise par une amplitude

accrue des pics de sécrétion durant la phase de sommeil (Takahashi et al., 1968). Cette sécrétion épisodique est principalement contrôlée par deux hormones hypothalamiques, le facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH) synthétisé principalement dans le noyau arqué (Barinaga et al., 1983) et la somatostatine (SRIF) produite majoritairement dans le noyau périventriculaire (Tannenbaum et Ling, 1984) (Figure 1). Le GHRH stimule la synthèse et la sécrétion de GH (Tannenbaum et Ling, 1984; Barinaga et al., 1983) alors que la SRIF les inhibe (Tannenbaum et Ling, 1984; Sarret et al., 1999). La GH sécrétée stimule la production du facteur insulinique de type 1 (IGF-1), principalement au niveau du foie, qui agit sur les tissus cibles pour stimuler la prolifération et différenciation cellulaire (Buttler et Roith, 2001). Dans la circulation, l'IGF-1 se retrouve majoritairement sous forme liée à des protéines de transport (IGFBP) qui influencent sa biodisponibilité et sa demi-vie en le protégeant de la protéolyse (Butler et Le Roith, 2001).

Des boucles de rétrocontrôle positives et négatives, ont été décrites où le GHRH, la SRIF, la GH et l'IGF-1 contribuent à activer ou inhiber la sécrétion de GH (Figure 1). La présence du récepteur de la GH (GH-R) et de son ARNm a été identifiée au niveau hypophysaire ce qui suggère un rétrocontrôle négatif direct de la GH sur sa propre sécrétion (Frohman et al., 1992). La GH exerce également un rétrocontrôle négatif en inhibant la sécrétion de GHRH et en stimulant celle de la SRIF (Tannenbaum, 1980; Sato et Frohman, 1993). Dans l'hypophyse antérieure, l'IGF-1 inhibe la sécrétion de GH et l'expression de son gène (Yamashita et Melmed, 1986). Dans l'hypothalamus, l'IGF-I stimule directement la libération de la SRIF et inhibe la libération de GHRH (Berelowitz et al., 1981). La ghréline contribue également au contrôle de la sécrétion de GH (Kamegai et al., 2004). Produite principalement dans l'estomac, elle est un ligand naturel du récepteur des sécrétagogues de la GH (GHS-R). Elle stimule directement la sécrétion de la GH dans l'hypophyse antérieure et pourrait agir aussi au niveau hypothalamique, en augmentant la sécrétion de GHRH (Kojima et al., 1999; Osterstock et al., 2010).



**FIGURE 1 : Contrôle de la sécrétion d'hormone de croissance dans la cellule somatotrope.**

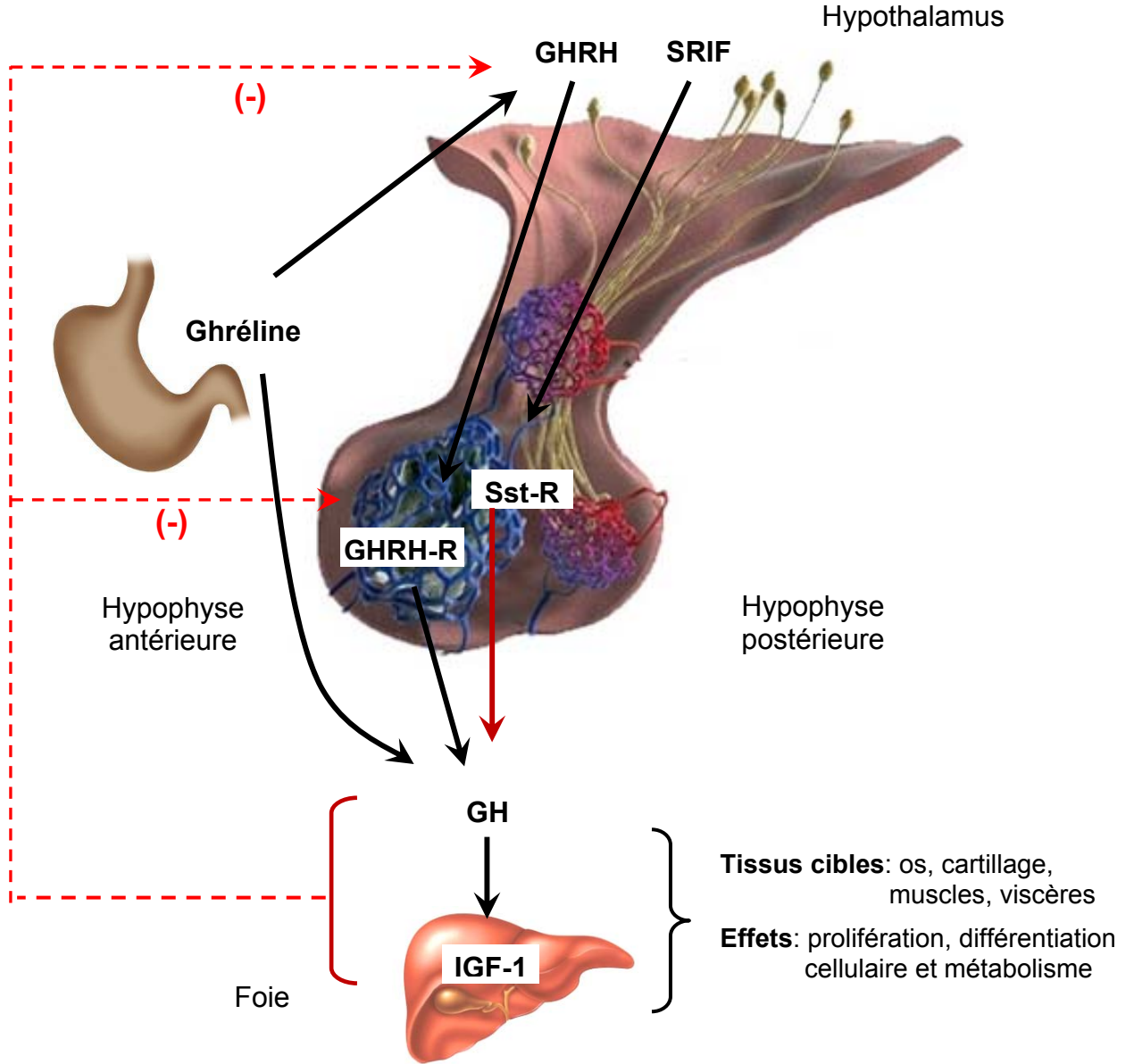


Image adaptée à partir de : [www.sciencephoto.com](http://www.sciencephoto.com)

Une description plus détaillée des principales hormones régulatrices de l'axe somatotrope, ainsi que leurs récepteurs, sera présentée dans les chapitres suivants. Une attention particulière sera portée au GHRH et son récepteur hypophysaire (GHRH-R), sujet central de la présente thèse.

## **1.2. LE FACTEUR DE LIBÉRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE**

### **1.2.1. Structure du facteur de libération de l'hormone de croissance**

Le facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH) a été isolé en 1982, à partir de tumeurs pancréatiques provenant de deux patients atteints d'acromégalie (Guillemin et al., 1982; Rivier et al., 1982). Ces travaux ont mis en évidence trois formes de GHRH humain: le GHRH(1-44)NH<sub>2</sub> (fonction carboxamide en C-terminal) (Guillemin et al., 1982), le GHRH(1-40)OH (fonction carboxylique libre en C-terminal) (Rivier et al., 1982) et le GHRH(1-37)NH<sub>2</sub>. Les deux premières formes, soit le (1-40)OH et le (1-44)NH<sub>2</sub>, ont été identifiées par la suite dans l'hypothalamus humain (Böhlen et al., 1983). Chez le rat, le GHRH est composé de 43 aa et possède une fonction carboxylique libre en C-terminal (Spiess et al., 1983). Des études *in vivo* ont démontré que la portion 1-29 aa était suffisante et nécessaire à l'activité biologique maximale du peptide (Guillemin et al., 1982). Des homologies de séquence avec le GHRH humain sont retrouvées chez le rat (62%) et la souris (67%) (Suhr et al., 1989; Frohman et al., 1989; Mayo et al., 1985b). La structure primaire du GHRH a également été identifiée chez le bœuf (Esch et al., 1983), le porc (Bohlen et al., 1983), la chèvre et le mouton (Brazeau et al., 1984).

Le GHRH est un membre de la superfamille des sécrétines qui comprend le peptide intestinal vasoactif (VIP), le peptide activateur de l'adénylate cyclase hypophysaire (PACAP), la sécrétine, le glucagon, le glucagon-like peptide (GLP) et le peptide gastro-inhibiteur (GIP) (Campbell et Scanes, 1992). Ces peptides possèdent la plus forte homologie de séquence dans leur partie N-terminale (Campbell et Scanes, 1992). Le GHRH agit principalement en stimulant l'adénylate cyclase (AC), menant à l'activation de la protéine kinase A (PKA). Il peut également activer la production d'inositol 3-phosphate (IP<sub>3</sub>),

menant à la stimulation de la protéine kinase C (PKC) et à l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants (Anderson et al., 2004).

### **1.2.2. Structure du gène du facteur de libération de l'hormone de croissance**

Le gène du GHRH a été cloné quelques années après l'isolation du peptide, à partir du génome humain (Mayo et al., 1985a), de rat (Mayo et al., 1985b) et de souris (Suhr et al., 1989). Il a été localisé chez l'humain sur le chromosome 20q11.2 (Mayo et al., 1985a), sur le chromosome 2H1 chez la souris (Godfrey et al., 1993) et sur le chromosome 3q42 chez le rat (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Le gène du GHRH est réparti sur cinq exons, totalisant une longueur de 18 kb. Les exons 2-5 sont communs au GHRH placentaire et hypothalamique, le troisième exon code pour le GHRH(1-37) et le quatrième pour la portion c-terminus (38-44) (Mayo et al., 1985a). Deux régions promotrices différentes dans le premier exon ont été identifiées, l'une pour le peptide hypothalamique et l'autre pour le peptide placentaire (Gonzalez-Crespo et Boronat, 1991). Ainsi, l'utilisation de l'un ou l'autre des promoteurs permet la transcription de deux ARN messagers (ARNm) distincts dans l'hypothalamus et le placenta qui codent pour une protéine précurseur et un GHRH identique dans les deux tissus. Le préproGHRH est codé par quatre exons. Le cinquième exon de l'ARNm du préproGHRH hypothalamique comprend une portion non-traduite qui contient des éléments TATA et de type CCAAT impliqués dans l'initiation de la transcription. Cette région est hautement conservée chez l'humain, le rat et la souris (Suhr et al., 1989). Composé de 108 acides aminés, le préproGHRH comprend un peptide signal, le GHRH(1-44), un peptide carboxy-terminal et un signal d'amidation. Le clivage du peptide signal entraîne la formation du proGHRH. Celui-ci est à son tour clivé par les endopeptidases en GHRH(1-45), puis transformé en GHRH(1-44)NH<sub>2</sub> par la peptidylglycine monooxygénase  $\alpha$ -amidante (Frohman et al., 1992). Le GHRH(1-40)OH est obtenu à partir du GHRH(1-45) clivé par les endopeptidases présentes entre autres dans l'hypophyse et l'hypothalamus. Ces résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle les formes plus courtes du GHRH seraient des produits de protéolyse du GHRH(1-44)NH<sub>2</sub> (Guillemin et al., 1982).

### **1.2.3. Localisation du facteur de libération de l'hormone de croissance**

Le noyau arqué de l'hypothalamus est la source majeure de neurones GHRHergiques tant chez les primates que chez les rongeurs (Frohman et al., 1989). Ces cellules expriment l'ARNm du préproGHRH, ce qui montre leur capacité à synthétiser le GHRH. Un réseau d'axones des neurones à GHRH a été localisé par immunocytochimie dans l'éminence médiane jusqu'au système vasculaire porte où le GHRH est libéré vers l'hypophyse antérieure. Cette sécrétion dans le système portal est épisodique ce qui contribue à la pulsativité de la sécrétion de la GH (Petersenn et Schulte, 2000). En plus de l'hypothalamus, l'ARNm du GHRH a été retrouvé dans le cortex frontal chez le rat (Tsagarakis et al., 1991).

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

### **1.2.4. Rôles du facteur de libération de l'hormone de croissance**

#### **1.2.4.1. Stimulation de la synthèse de l'hormone de croissance**

En plus de stimuler la sécrétion de GH, tel que mentionné plus haut, le GHRH en contrôle également la synthèse. Il a été démontré dans des cultures primaires de cellules hypophysaires de rats qu'il stimule la production d'ARNm de la GH en augmentant rapidement la transcription de son gène (Barinaga et al., 1985). Une augmentation des

niveaux d'ARNm de la GH a également été observée dans des cellules hypophysaires exposées durant 72 h au GHRH humain, indiquant que l'effet du GHRH n'est pas transitoire (Gick et al., 1984). De plus, dans les cellules hypophysaires de rats, une stimulation de 24 h par le GHRH résulte en une augmentation significative du contenu en GH (Fukata et al., 1985). Dans les cellules adéno-hypophysaires bovines, une augmentation des niveaux d'ARNm de la GH est également observée suite à une stimulation avec le GHRH bovin et impliquerait l'activation des voies AC et PKC (Tanner et al., 1990).

#### **1.2.4.2.Prolifération et différenciation cellulaire**

Le rôle du GHRH dans la prolifération cellulaire a été proposé suite à des observations chez des patients atteints de tumeurs sécrétant le GHRH, où l'hyperplasie hypophysaire, l'acromégalie et une augmentation de la croissance somatique concordait avec une élévation des taux plasmatiques de GH (Thorner et al., 1982; Frohman et Szabo, 1981). Le même type de résultats a été démontré chez des souris transgéniques surexprimant le GHRH (Hammer et al., 1985). Des études d'incorporation de thymidine radiomarquée ont permis de démontrer qu'une stimulation au GHRH active la prolifération des cellules somatotropes (Billestrup et al., 1986). Dans des cellules hypophysaires de rat stimulées avec de la forskoline (un activateur de l'adénylate cyclase) une augmentation de la production d'AMPC est observée, associée à une augmentation de la sécrétion et du contenu cellulaire en GH ainsi que de la prolifération des somatotropes (Billestrup et al., 1986).

Le rôle du GHRH dans la prolifération cellulaire a également été rapporté dans des tissus extra-hypophysaires. Dans le placenta de souris et de rate, les niveaux d'ARNm du préproGHRH varient durant la grossesse, suggérant une participation du GHRH à la sécrétion fœtale de la GH au cours du développement prénatal (Spatola et al., 1991). Le GHRH placentaire pourrait aussi stimuler la production de d'autres hormones placentaires et contribuer à la croissance et à la différenciation cellulaire du fœtus (Mayo et al., 1996). Dans les cellules de la granulosa de l'ovaire de rate et humaine, le GHRH stimule la FSH, augmentant ainsi la maturation folliculaire (Bagnato et al., 1992; Moretti et al., 1990). Dans les testicules de rat, le GHRH agit sur les cellules de Leydig pour stimuler la stéroïdogénèse. Il provoque également la prolifération des cellules de Sertoli par une voie AMPC-

dépendante, impliquant une augmentation d'expression du gène *c-fos* (Srivastava et al., 1993). L'action proliférative du GHRH a aussi été rapportée dans les cellules épithéliales de l'intestin (Lehy et al., 1986) et dans les lymphocytes de la rate et du thymus chez le rat (Guarcello et al., 1991). Une prévention de la mort cellulaire et de l'activation de la caspase 3 par le GHRH a été mise en évidence dans des myocytes cardiaques de rat, suggérant un effet cardioprotecteur du GHRH (Granata et al., 2009). Dans la lignée INS-1 de cellules  $\beta$ -pancréatiques de rat, l'agoniste du GHRH (JI-36) stimule la prolifération cellulaire et réduit l'apoptose (Ludwig et al., 2010).

L'action proliférative du GHRH a également été étudiée dans le contexte du cancer. L'expression du GHRH (protéine et ARNm) a été détectée dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses ou de tumeurs humaines (Barabutis et Schally, 2008b). Dans des lignées cellulaires humaines de cancer du sein, de la prostate et du poumon, les taux de prolifération sont significativement augmentés en présence de GHRH(1-29)NH<sub>2</sub> et inhibés par des antagonistes du GHRH. De plus, l'inhibition du gène du GHRH par une stratégie de siRNA dans ces mêmes lignées supprime la prolifération (Barabutis et Schally, 2008b). L'action mitogénique du GHRH serait principalement médiée par un variant d'épissage du GHRH-R (SV1), qui est exprimé dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses et tumeurs humaines ainsi que dans les tissus humains normaux tels que l'hypophyse, le rein, le foie, le poumon et la prostate (Havt et al., 2005). Des études récentes ont suggéré que ces effets prolifératifs pourraient être exercés par l'activation des voies *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (Barabutis et al., 2010) ou Janus kinase 2/ *signal transducers and activators of transcription* 3 (STAT-3) (Siejka et al., 2010). Ces résultats suggèrent que le GHRH pourrait jouer un rôle dans la tumorigénèse. L'utilisation d'antagonistes du GHRH comme stratégie antitumorale est présentement en voie d'investigation.

#### **1.2.4.3. Contrôle de l'appétit**

Le GHRH exerce un effet positif sur la régulation circadienne de l'appétit. En effet, l'injection intra-cérébroventriculaire (icv) de GHRH chez le rat augmente la prise alimentaire durant le jour et n'a aucun effet ou diminue la prise alimentaire durant la nuit (Feifel et Vaccarino, 1989). De plus, l'injection d'antisérum anti-GHRH dans le noyau suprachiasmique et la région préoptique médiane supprime la prise alimentaire durant le

cycle nocturne, période où les rats effectuent 80% de leur consommation quotidienne (Vaccarino et al., 1991). Le GHRH agit de façon dose-dépendante, puisqu'une augmentation de la prise alimentaire est remarquée à faibles doses (0.4 - 4 pmole/ rat) alors qu'à des doses supérieures à 4 pmoles, une inhibition est observée (Tanaka et al., 1991). Finalement, une étude effectuée chez des rats LOU/C/Jall âgés, a montré que l'administration sous-cutanée (sc) de GHRH diminue la prise alimentaire et lipidique, mais augmente la prise protéique chez les rats qui ingéraient peu de protéines au départ, alors que l'injection icv de GHRH diminue la prise alimentaire et en particulier la prise lipidique (Veyrat-Durebex et al., 2001). Ces résultats montrent que le GHRH exerce un contrôle complexe dans la gestion de la prise alimentaire.

#### **1.2.4.4. Contrôle du sommeil**

Le GHRH est un important inducteur de sommeil. En effet, l'injection icv de GHRH déclenche la phase du sommeil profond chez le rat (Ehlers et al., 1986). Une micro-injection de GHRH au niveau de la région préoptique de l'hypothalamus augmente la durée et l'intensité du NREMS (*non-rapid-eye-movement-sleep*), une des phases cycliques du sommeil, de manière dose-dépendante (Zhang et al., 1999). De plus, l'utilisation d'antagonistes du GHRH ou d'anticorps anti-GHRH réduit le sommeil NREMS (Obal et al., 1992). Une étude récente a suggéré que l'induction du NREMS par une injection icv de GHRH serait médiée par les neurones GABAergiques des noyaux pré-optique médian et ventro-latéral (Peterfi et al., 2010). Chez le rat, l'injection icv de GHRH stimule faiblement le REMS (*rapid-eye-movement-sleep*) (Obal et al., 1988). De plus, l'inhibition de la phase REMS requiert une plus forte dose d'antagoniste compétitif du GHRH que celle de la phase NREMS (Zhang et al., 1999). L'utilisation d'anticorps anti-GHRH diminue parallèlement le REMS et la sécrétion de GH (Obal et al., 1992). De plus, l'effet du GHRH sur ce cycle du sommeil serait indirect, possiblement *via* l'action de la GH, puisqu'il est absent chez des rats hypophysectomisés (Obal et al., 1996). Dans les modèles de rats ou souris déficientes pour le GHRH-R (rats dw/dw ou souris lit/lit) une diminution significative du REMS est observée (Obal et al., 2001; Obal et al., 2003).

### **1.2.5. Régulation de l'expression du facteur de libération de l'hormone de croissance**

La régulation majeure de l'ARNm du GHRH est liée à l'augmentation des taux circulants de GH (Table 1). Chez les rats hypophysectomisés, les niveaux d'ARNm du GHRH augmentent et cet effet est renversé par une administration de GH (Chomczynski et al., 1988). Le même effet a été démontré chez des rats nains déficients en GH et traités de façon systémique à la GH, mettant ainsi en évidence le rôle de la GH dans la régulation du GHRH (Sato et Frohman, 1993). Une boucle ultracourte de rétrocontrôle négatif existe également au niveau hypothalamique où le GHRH agit sur sa propre sécrétion (Lumpkin et McDonald, 1989).

Les concentrations de préproGHRH et de GHRH hypothalamique sont plus élevées chez le rat mâle que chez la femelle, suggérant un effet des stéroïdes sexuels (Argente et al., 1991) (Table 1). La testostérone stimule l'expression de l'ARNm du préproGHRH chez le rat tandis que l'estrogène la diminue (Senaris et al., 1992). Chez le rat mâle, l'ablation des gonades provoque une diminution des niveaux d'ARNm du GHRH (Fodor et al., 2001). Il a été démontré que la testostérone en période néonatale peut exercer un rôle sur le nombre de neurones à GHRH et leur capacité à répondre aux androgènes et aux œstrogènes produits en période post-natale (Chowen et al., 2004).

Les hormones thyroïdiennes exercent un effet inhibiteur sur la synthèse et la sécrétion de GHRH. En effet, chez le rat, une thyroïdectomie entraîne une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH et de sa protéine, alors que l'hyperthyroïdie les diminue (Jones et al., 1990). Finalement, les glucocorticoïdes exercent un contrôle négatif sur les niveaux d'ARNm du GHRH dans le noyau arqué (Senaris et al., 1996) (Table 1).

En résumé, le GHRH est une hormone hypothalamique importante qui est impliquée dans de multiples fonctions cellulaires et physiologiques. Son rôle de régulateur de la synthèse et de la sécrétion de GH est primordial pour la fonction somatotrope et ne pourrait s'effectuer sans la présence de son récepteur fonctionnel, le GHRH-R.



### **1.3. RÉCEPTEUR DU FACTEUR DE LIBÉRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE**

#### **1.3.1. Structure du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance**

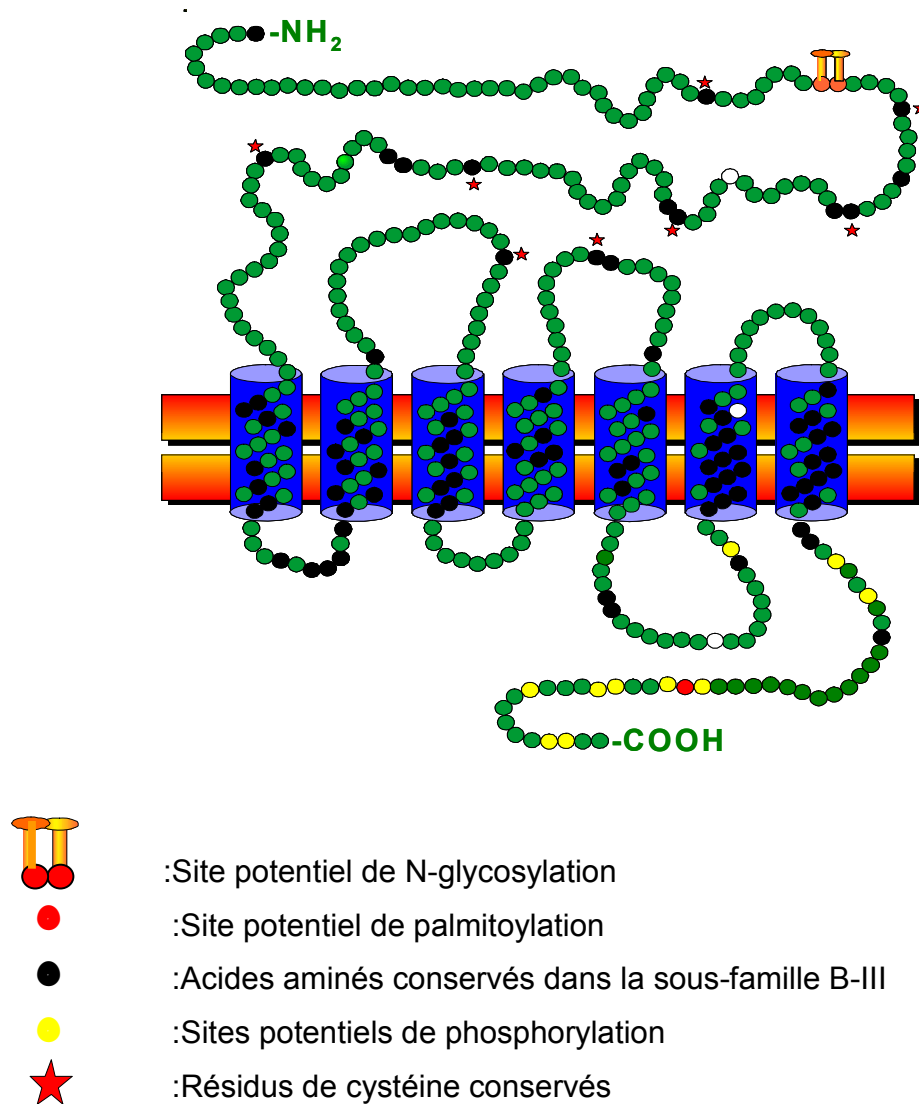
Le GHRH-R a été cloné pour la première fois en 1992 dans l'hypophyse humaine (Mayo, 1992; Lin et al., 1992), de rat (Mayo, 1992) et de souris (Lin et al., 1992). Par la suite, il a été cloné dans l'hypophyse antérieure de plusieurs autres mammifères tels que le porc (Hassan, 2001; Hsiung et al., 1993), le bœuf et le mouton (Horikawa et al., 2001) et à partir d'adénomes d'hypophysaires humains (Tang et al., 1995; Hashimoto et al., 1995 ; Gaylinn et al., 1993). La taille de la protéine traduite est de 423 acides aminés chez l'homme, le rat, la souris, le porc et le bœuf alors qu'elle est de 407 aa chez le mouton. Les récepteurs de rat et de souris sont homologues à 94% entre eux et à 82% avec la séquence du récepteur humain (Mayo, 1992). Le GHRH-R est un membre de la sous-famille B-I des GPCR, qui comprend également les récepteurs du VIP, de la sécrétine, du PACAP et du glucagon (Harmar, 2001). Le GHRH-R est constitué de sept domaines transmembranaires, trois boucles intra-cytoplasmiques et trois boucles extracellulaires. Les deuxièmes et troisièmes boucles extracellulaires possèdent des résidus Cys, qui pourraient être impliqués dans la formation de ponts disulfures (Mayo, 1992). La partie C-terminale intra-cytoplasmique renferme une Cys pouvant être palmitoylée (Veyrat-Durebex et al., 2005) ainsi que des sites potentiels de phosphorylation (Mayo, 1992). Ces sites sont aussi retrouvés dans la troisième boucle cytoplasmique de la protéine. La partie N-terminale possède au moins un site de N-glycosylation et comporte six Cys conservées (Mayo, 1992; Mayo et al., 1996). La présence de Cys et de ponts disulfures est particulièrement importante au maintien de la structure et de la fonction de la sous-famille B-I des GPCR (Laburthe et al., 1996). Les premiers travaux d'analyse de l'ARNm du GHRH-R dans l'hypophyse antérieure de rat ont mis en évidence la présence de deux transcrits d'environ 2.5 et 4 kb (Mayo, 1992; Lin et al., 1992). Le transcrit de 2.5 kb constitue la forme prédominante dans l'hypophyse antérieure, qui est traduite en la forme fonctionnelle du GHRH-R de 423 aa (Mayo, 1992; Miller et al., 1999), alors que la structure et le rôle du transcrit de 4 kb demeurent à élucider.

Dans les hypophysés et adénomes humains, la présence de transcrits d'ARNm de 2.0,

2.8 et 4.5 kb a été rapportée (Hashimoto et al., 1995). Le transcrit de 2.0 kb correspondant à la protéine de 423 aa est retrouvé en abondance dans l'hypophyse et permet la transmission intracellulaire de signaux via l'AMPC. Les transcrits de 2.8 et 4.5 kb renferment un codon stop imbriqué dans leur séquence, générant des récepteurs tronqués au niveau de la troisième boucle intracytoplasmique. La transfection de ces transcrits isolés dans des cellules rénales Cos-7 ne provoque aucune réponse cellulaire, suite à une stimulation au GHRH. Toutefois, la co-expression du transcrit de 4,5 kb avec le GHRH-R entraîne une diminution de la production d'AMPC stimulée par GHRH, suggérant un rôle dominant négatif (Motomura et al., 1998).

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

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



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

### 1.3.2. Structure du gène du GHRH-R

Le gène encodant le GHRH-R humain a été localisé sur le bras court du chromosome 7 [7p14 (Gaylinn et al., 1994) ou 7p15 (Wajnrajch et al., 1994)]. Il s'étend sur 15 kb et renferme 13 exons (Petersenn et al., 1998). Un seul site d'initiation de la transcription a été identifié à 40 pb en amont du site d'initiation de la traduction (Petersenn et al., 1998). L'étude de la séquence du promoteur du gène du GHRH-R humain a permis d'identifier des sites de liaison de facteurs généraux de transcription, tel que le facteur nucléaire 1(Nf-1), *l'upstream regulatory factor* (Usf) et la protéine spécifique-1 (Sp-1) (Petersenn et al., 1998). Des sites de liaison de facteurs de transcription tissu-spécifiques, tel que le facteur Pit-1 et le facteur de transcription *brain-2* (Brn-2) (Petersenn et al., 1998) ont également été observés. Finalement, des sites de liaison pour la protéine activatrice-1 (AP-1), la protéine de liaison à l'élément de réponse de l'AMPc (CREB), les récepteurs aux œstrogènes (ER) et aux glucocorticoïdes (GR), ainsi qu'au facteur nucléaire Kappa B (NF- $\kappa$ B) sont présents dans la région promotrice du gène du GHRH-R humain (Petersenn et al., 1998). Des éléments de réponse pour les glucocorticoïdes et pour les œstrogènes ont été identifiés sur le promoteur du gène du GHRH-R et pourraient expliquer leur action stimulatrice et inhibitrice respective (Petersenn et al., 1998).

Chez le rat, le gène du GHRH-R est composé de 14 exons, s'étendant sur 15 kb (Miller et al., 1999). Trois sites majeurs d'initiation de la transcription ont été localisés aux positions 286, 93 et 84 pb en amont du site d'initiation de la traduction (Miller et al., 1999). La région promotrice de 1.9 kb renferme plusieurs sites de liaison pour les facteurs de transcription Pit-1, CREB, Ets-1 (*E26 transformation-specific-1*), GATA et C/EBP  $\alpha$  (*CCAAT/enhancer binding protein*) (Miller et al., 1999) ainsi que les récepteurs nucléaires des œstrogènes et des glucocorticoïdes. Un élément de réponse fonctionnel aux hormones thyroïdiennes et à l'acide rétinoïque ont également été mis en évidence (Nogami et al., 2002; Miller et Mayo, 1997).

### 1.3.3. Localisation du GHRH-R

Dans l'hypophyse antérieure, l'expression du GHRH-R est caractéristique des cellules somatotropes. Tant chez le rat que chez l'humain, sa localisation

immunocytochimique principale est la membrane cytoplasmique ainsi que les granules de sécrétion de la GH et plus faiblement dans le noyau et la matrice cytoplasmique (Morel et al., 1999). L'ARNm du GHRH-R est présent dans plusieurs autres tissus. Dans l'hypothalamus, il est retrouvé dans le noyau arqué, ventromédial ainsi que les noyaux périventriculaires (Takahashi et al., 1995). La présence du GHRH-R dans le noyau arqué renforce l'hypothèse d'une boucle de rétrocontrôle ultra-courte du GHRH sur sa propre sécrétion. Dans les noyaux périventriculaires, le GHRH stimule la sécrétion de SRIF (Aguila et al., 1994). Le GHRH-R est également présent en faible concentration dans le cervelet, le cortex et le tronc cérébral, suggérant un rôle dans certaines fonctions du système nerveux central, entre autres dans le contrôle du sommeil et de l'appétit (Matsubara et al., 1995). L'ARNm du GHRH-R a été mis en évidence par RT-PCR dans le muscle squelettique, la glande thyroïde, le duodénum, l'intestin grêle, le colon, la rate, l'épididyme, l'urètre, le cœur, le poumon, le cerveau et la glande surrénale et le rein (Matsubara et al., 1995, Boisvert et al., 2002). Au niveau du tractus gastro-intestinal, la liaison du GHRH à son récepteur stimule la prolifération des cellules de la muqueuse gastroduodénale (Konturek et al., 1988). Le GHRH-R pourrait aussi être impliqué dans les fonctions immunitaires particulièrement en activant la prolifération leucocytaire dans la rate et le thymus (Guarcello et al., 1991). Le GHRH-R a également été localisé dans le placenta de rat (Takahashi et al., 1995) et humain (Mayo et al., 1996). Finalement, des études récentes ont mis en évidence la présence de l'ARNm du GHRH-R dans le cœur, particulièrement les myocytes ventriculaires de rat (Granata et al., 2009).

Parmi ces tissus extrahypophysaires, la médulla rénale, plus spécifiquement l'anse de Henlé ascendante mince (ATL), est enrichie en ARNm du GHRH-R (Matsubara et al., 1995; Boisvert et al., 2002). Il a été proposé que le GHRH-R rénal puisse jouer un rôle dans le contrôle de l'oxygénation, le transport d'électrolytes et dans l'expression ou la régulation de protéines impliquées dans le mécanisme de concentration de l'urine (Matsubara et al., 1995; Boisvert et al., 2002). Un rôle dans la stimulation de la prolifération des cellules de l'ATL a également été suggéré (Boisvert et al., 2002).

### 1.3.4. Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du GHRH-R

Des études de saturation avec le radioligand [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>10</sup>]hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub> (<sup>125</sup>I-GHRH), menées dans des homogénats d'hypophyses antérieures de rats de 2 mois ont mis en évidence la présence de deux types de sites de liaison: un premier site à haute affinité et basse capacité, et un deuxième site à basse affinité et haute capacité (Aribat et al., 1990). L'analyse des complexes covalents ligand-récepteur, suite à une réticulation chimique, a révélé la présence d'entités de 27 et 42 kDa (Guarcello et al., 1991) ou de 28, 47 et 65 kDa (Boulanger et al., 1999). De plus, l'immunobuvardage Western, avec un anticorps polyclonal anti-GHRH-R (392-404) a révélé la présence de trois protéines immunoréactives de 44, 47 et 65 kDa (Boulanger et al., 1999). L'entité de 47 kDa correspondrait au GHRH-R de 423 aa décrit par Mayo (1992), alors que les entités de 28 et 44 kDa pourraient être des formes tronquées de la protéine de 47 kDa. L'entité de 65 kDa pourrait être une forme dimérique ou glycosylée du GHRH-R, étant donné la présence de sites potentiels de N-glycosylation (Mayo, 1992 ; Lin et al., 1992).

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

### 1.3.5. Voies de signalisation impliquées dans la fonctionnalité du GHRH-R

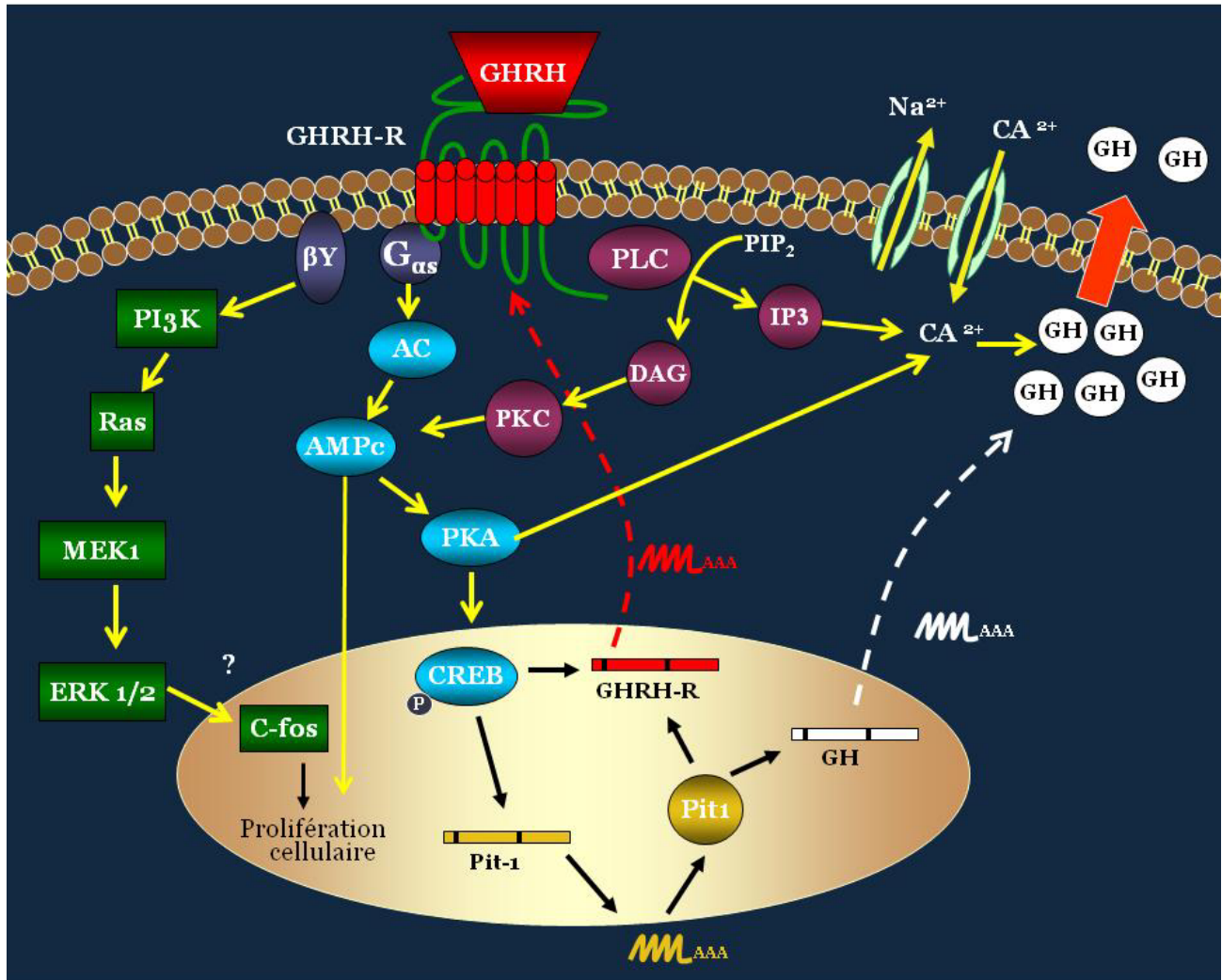
La liaison du GHRH à son récepteur déclenche une cascade de signalisation intracellulaire menant à la synthèse, à la sécrétion de GH ainsi qu'à la prolifération cellulaire. Ce processus implique plusieurs voies, soit les voies de l'adénylate cyclase-AMPC-PKA, des phosphatidylinositols-PKC et des MAPK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

### 1.3.5.1. La voie adénylate cyclase-AMPC-protéine kinase A

Le GHRH-R étant un récepteur couplé aux protéines G, la liaison du GHRH active la sous unité  $\alpha$  de la protéine  $G_s$  qui permet l'activation de l'AC. Suivant cette activation, les taux intracellulaires d'AMPC augmentent, ce qui conduit à la phosphorylation de la PKA. Les deux sous-unités régulatrices de la PKA, subissent un changement conformationnel suite à la liaison de l'AMPC, provoquant la dissociation des deux sous-unités catalytiques. La PKA activée phosphoryle les canaux calciques voltage-dépendants de types T et L, menant à la dépolarisation de la membrane cytoplasmique et à l'entrée de calcium (Anderson et al., 2004; Cuttler et al., 1992; Lussier et al., 1991). Des canaux sodiques insensibles à la tétradotoxine et des canaux cationiques non-sélectifs sont également activés, entraînant une plus grande entrée de calcium (Kato et al., 1992; Frohman, 1996). L'entrée de calcium extracellulaire permet la margination et l'exocytose des granules de sécrétion de la GH. La PKA phosphoryle également le facteur de transcription CREB (Brindle et Motminy, 1992), qui agit sur le facteur de transcription Pit-1, lequel stimule la transcription du gène de la GH et du GHRH-R (Mayo et al., 1996). En effet, deux motifs spécifiques à l'élément de réponse à l'AMPC sont retrouvés sur le promoteur du gène de la GH et un seul sur celui du GHRH-R (Petersenn et al., 1998).

De plus, l'augmentation d'AMPC induite *in vitro* par la forskoline, un activateur de l'AC, stimule la prolifération des somatotropes de rat, de façon analogue au GHRH, (Billestrup et al., 1986). Une contribution du proto-oncogène c-fos à ce mécanisme a également été proposée, puisqu'une stimulation au GHRH provoque l'augmentation de l'ARNm et de la protéine c-fos dans les somatotropes en culture (Billestrup et al., 1987).

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



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



### **1.3.5.2. La voie des phosphatidylinositols/ diacylglycérol/ protéine kinase C**

Une mobilisation intracellulaire de calcium est observée suite à une stimulation du GHRH-R par le GHRH, suggérant l'implication de la voie des phosphatidylinositols/diacylglycérol (DAG)/PKC. La liaison du GHRH à son récepteur déclenche l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate (PIP<sub>2</sub>), via la phospholipase C en inositol 2, 4, 5 triphosphate (IP<sub>3</sub>) et diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> contrôle la libération de calcium emmagasiné dans le réticulum endoplasmique alors que le DAG stimule la PKC. Cette dernière joue un rôle similaire à l'AC quant à l'élévation d'AMPc et à la stimulation de l'entrée de calcium extracellulaire (Frohman, 1996). Certaines études ont montré que la voie PKC n'est pas essentielle à la sécrétion de GH, contrairement à la voie de l'AC (French et al., 1989; Lussier et al., 1991).

Plusieurs stratégies ont été élaborées afin de comprendre la dynamique de cette voie de signalisation en lien avec la sécrétion de GH. Dans des cellules hypophysaires de rat, l'utilisation de molécules activatrices de la PKC, tel que 4 $\beta$ -phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) et l'acétate de tétradécanoylphorbol (TPA) montrent un effet additif au GHRH, sur la sécrétion de GH, (Ohmura et Friesen, 1985; Judd et al., 1986). De plus, le PMA augmente la quantité d'AMPc produite dans les cellules de l'hypophyse antérieure de rat, suite à une stimulation au GHRH (Cronin et al., 1986). Le phorbol 12,13-dibutyrate (PDB) un autre activateur de la PKC, augmente les concentrations de calcium intracellulaire dans les somatotropes isolées de rats (Holl et al., 1989). Finalement, l'augmentation des niveaux Ca<sup>2+</sup> intracellulaire par le composé ionophore A23187 ou l'activation des canaux calciques par la maitotoxine potentialise l'action du DAG ou de la PLC en augmentant la sécrétion de GH (Judd et al., 1986).

### **1.3.5.3. La voie des MAPK**

Les MAPK sont des protéines de la famille des sérine-thréonines kinase dont la principale fonction consiste en la phosphorylation et l'activation de facteurs nucléaires, sollicités dans la synthèse d'ADN et la division cellulaire. Leur implication a été proposée dans la prolifération des cellules somatotropes stimulées par le GHRH (Pombo et al., 2000 ;

Zeitler et Siriwardana, 2000). L'activation de la voie MAPK aurait lieu *via* les sous-unités  $\beta\gamma$  de la protéine  $G_s$  couplée au GHRH-R. Celle-ci serait indirecte et nécessiterait la présence de la protéine oncogénique  $p21^{ras}$  ainsi que d'une kinase de l' $IP_3$  ( $IP_3K$ ) (Pombo et al., 2000). La stimulation de  $p21^{ras}$  conduirait à l'activation du proto-oncogène Raf-1, une sérine-thréonine kinase qui phosphoryle les kinases de la famille MAPK/ERK (MEK) (Pombo et al., 2000). Ces dernières ont le pouvoir de phosphoryler directement les MAPKs. Le rôle de l' $IP_3K$  n'a pas encore été élucidé mais serait possiblement activé directement par les sous-unités  $\beta\gamma$  de la protéine  $G_s$  du GHRH-R (Pombo et al., 2000). L'implication de la voie des MAPKs dans la prolifération stimulée par le GHRH a été confirmée dans une étude sur des lignées de cellules somatotropes (GH4), où la prolifération a été inhibée par le PD98095, un inhibiteur des MEKs (Zeitler et Siriwardana, 2000).

#### **1.3.5.4. Autres voies de signalisation**

Une étude dans les myocytes ventriculaires de rat a mis en évidence une activation des voies  $PI_3K/AKT$  par le GHRH. Cette voie de signalisation, en conjonction avec l'activation d'ERK1/2, jouerait un rôle important dans la survie des myocytes ainsi que dans l'action anti-apoptotique du GHRH (Granata et al., 2009). Une activation de l'enzyme oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS), responsable de la formation d'oxyde nitrique, a été observée dans des cellules d'une lignée humaine de cancer du poumon traitées au GHRH (Barabutis et al., 2011). Finalement, une augmentation de l'oxydation des lipides et des protéines ainsi que de l'expression d'enzymes antioxydants tels que SOD1 et Gpx1 est observée en présence de GHRH dans une lignée cellulaire humaine de cancer de la prostate, suggérant un rôle du GHRH dans le contrôle du stress oxydant (Barabutis et Schally, 2008a).

#### **1.3.6. Régulation de l'expression du récepteur du GHRH.**

Plusieurs hormones sont impliquées dans le contrôle de l'expression du GHRH-R telles que le GHRH, l'IGF-1, les hormones stéroïdiennes et les hormones thyroïdiennes. Certains facteurs métaboliques tels que le glucose et les acides gras, lorsqu'ils sont en concentration supraphysiologiques, peuvent également affecter cette régulation. Certaines maladies chroniques, dont le diabète, ont été proposées comme responsables d'une

dérégulation de l'axe somatotrope. D'importantes modifications du GHRH-R sont également observées au cours du vieillissement et seront abordées en section 1.7.2. Ces principales régulations seront détaillées dans les pages suivantes et vous trouverez à la fin de cette section un tableau synthèse (Table 1).

#### **1.3.6.1. GHRH et IGF-1**

Le GHRH représente l'un des plus importants régulateurs du GHRH-R. Des études effectuées dans des cellules hypophysaires de rats nouveau-nés et adultes, traitées au GHRH, montrent des changements des niveaux d'ARNm du récepteur (Lasko et al., 2001), suggérant une régulation du GHRH-R par son ligand endogène. La désensibilisation des somatotropes, résultant d'une exposition prolongée au GHRH, contrôle à la baisse le nombre de sites de liaison du GHRH (Bilezikjian et al., 1986). Une diminution significative des niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire a également été mise en évidence dans l'hypophyse de rat nouveau-né, traité au GHRH durant une période de 10 jours (Horikawa et al., 1996). Des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules hypophysaires de rat en culture, suite à un traitement de 4 h avec 0.1 ou 1 nM de GHRH, provoquant une diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R de manière concentration-dépendante (Aleppo et al., 1997). Cet effet est spécifique au GHRH puisque qu'un pré-traitement à la GH n'affecte pas la production d'AMPC induite par le GHRH (Aleppo et al., 1997). L'administration sc de 0,5 mg/kg de poids corporel (PC) de GHRH durant 14 jours chez les rat de 2 mois permet d'augmenter le nombre de sites de liaison tandis qu'une injection de 1 mg/kg PC les diminuent. Il a été suggéré qu'une stimulation avec des concentrations élevées de GHRH puisse provoquer une internalisation accrue du GHRH-R, diminuant ainsi les niveaux de seconds messagers produits et d'expression du GHRH-R, alors que des concentrations plus faibles favoriseraient un contrôle optimal de l'internalisation (Girard et al., 1999).

Par ailleurs, dans des cellules primaires d'hypophyse antérieure de rat, un traitement de 24 h avec de l'IGF-1 supprime l'expression du GHRH-R *via* une inhibition de l'expression de Pit-1 (Sugihara et al., 1999). Une diminution des niveaux d'ARNm du

facteur Pit-1 suite à une stimulation avec l'IGF-1 a également été observée dans la lignée de cellules GH3 (Castillo et Aranda, 1997).

### **1.3.6.2. Les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes**

Les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes sont également des modulateurs de l'expression du GHRH-R. Les niveaux d'ARNm du GHRH-R chez la femelle jeune représentent 15% de ceux retrouvés chez le mâle, traduisant ainsi un dimorphisme sexuel de la régulation du GHRH-R. Ce niveau d'expression du GHRH-R pourrait expliquer la plus faible amplitude de sécrétion de GH chez la femelle (Ono et al., 1995). Chez le rat LOU, un modèle de vieillissement en santé, les niveaux du transcrit d'ARNm de 2.5 kb du GHRH-R est également plus fortement exprimé chez le mâle que la femelle (Veyrat-Durebex et al., 2005). La castration chez le rat diminue les niveaux de GHRH-R suggérant que la testostérone joue un rôle dans la régulation de l'expression du récepteur (Ono et al., 1995). Une stimulation aux œstrogènes diminue également des niveaux d'ARNm du GHRH-R dans l'hypophyse du rat mâle, démontrant que les œstrogènes régulent négativement l'expression du GHRH-R hypophysaire (Lam et al., 1996).

Les hormones thyroïdiennes T<sub>3</sub> (Korytko et Cuttler, 1997) et T<sub>4</sub> (Miki et al., 1995) augmentent les niveaux d'expression du gène du GHRH-R dans les cellules hypophysaires de rat. En effet, l'hypothyroïdie chez le rat diminue les niveaux d'ARNm du GHRH-R et de sa protéine (Miki et al., 1995). Une administration de T<sub>3</sub> (Korytko et Cuttler., 1997) et T<sub>4</sub> (Miki et al., 1995) palie à ce problème en agissant directement sur le gène du GHRH-R dans les cellules hypophysaires de rat. Une hypothyroïdie de trois semaines, reconnue pour diminuer les transcrits de 2.5 et 4 kb d'ARNm du GHRH-R, affecte la concentration des complexes immunoréactifs de 65- et 47-kDa, en les diminuant de 1.3 et 3.5 fois, respectivement. Des diminutions importantes de la capacité maximale des sites de liaison à haute et basse affinité sont également observées de 4.6 et 15.2 fois, respectivement (Boulanger et al., 1999).

Un traitement à la dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, augmente l'ARNm du GHRH-R hypophysaire chez le rat, suggérant une régulation de l'expression du gène du GHRH-R par les glucocorticoïdes (Lam et al., 1996; Miller et Mayo, 1997).

L'inhibition de la transcription par l'actinomycine D bloque cet effet, indiquant que les modifications sont de nature transcriptionnelles (Miller et Mayo, 1997). Il a aussi été rapporté, dans la lignée cellulaire MtT/S ainsi que sur des hypophyses fœtales de rat mises en culture, que l'administration d'acide rétinoïque ou de  $T_3$  avec la dexaméthasone produit un effet synergique qui augmente l'expression de l'ARNm du GHRH-R (Nogami et al., 2000).

### 1.3.6.3. Le diabète et l'insuline

L'impact du diabète sur la fonction somatotrope a été étudié au cours des dernières décennies. Chez les rats diabétiques traités à la streptozotocine (STZ), un agent alkylant de la famille des nitroso-urées qui détruit les cellules  $\beta$ -pancréatiques, une diminution de la sécrétion de GH et une perte des pics de sécrétion de haute amplitude ont été mises en évidence (Tannenbaum, 1981). Elles impliqueraient au niveau hypophysaire, une diminution du nombre de somatotropes (Boujon et al., 1995), des niveaux d'ARNm de la GH et du contenu immunoréactif en GH (Bedo et al., 1991), ainsi qu'une diminution des niveaux d'ARNm du récepteur de la GH (GH-R) (Busiguina et al., 2000). Les niveaux hypothalamiques d'ARNm de GHRH et la sécrétion de GHRH sont également réduits au cours du diabète (Olchosvsky et al., 1990). Une étude chez des rats traités à la STZ a montré que le contenu hypothalamique en GHRH augmente de 2 à 4 jours après l'induction du diabète, retourne à des niveaux normaux après 7 jours et diminue par la suite (Leidy et al., 1995). Une étude récente, chez des rats traités à la STZ (dose unique intra-péritonéale (ip) de 80 mg/kg PC) a montré une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH-R (Kim et al., 2006).

Une étude menée dans notre laboratoire, en utilisant des rats traités à la STZ avec une dose unique ip de 100 mg/kg PC (évaluation 2 et 21 jours post-injection) ou de 65 mg/kg PC (évaluation 60 jours post-STZ) a mis en évidence des changements des niveaux d'ARNm du GHRH-R et des complexes  $^{125}\text{I}$ -GHRH-GHRH-R en fonction de la durée et de la sévérité du diabète (Bédard et al., 2008). Ainsi, à 2 et 21 jours post-STZ, une augmentation du transcrit de 2.5 kb a été observée, tandis qu'à 60 jours il est normalisé aux niveaux des rats témoins. De plus, à 60 jours post-STZ, une diminution du complexe  $^{125}\text{I}$ -GHRH-GHRH-R de 45 kDa, correspondant au GHRH-R fonctionnel, est rapportée. Une

diminution des niveaux d'ARNm du GHRH hypothalamique est également observée à 2, 21 et 60 jours suivant l'administration de STZ (Bédard et al., 2008).

Un effet inhibiteur de l'insuline sur l'expression du GHRH-R a été observé dans des cellules primaires d'hypophyse antérieures de souris exposées 24 h à des concentrations croissantes d'insuline (0,5-50 nM) (Luque et Kineman, 2006). Des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules primaires de primates où une exposition 24 h aux mêmes concentrations d'insuline diminuait les niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire (Luque et al., 2006).

#### **1.3.6.4. La glucolipototoxicité**

La glucolipototoxicité cellulaire est définie comme étant l'ensemble des effets délétères d'une hyperglycémie et d'une hyperlipidémie sur la structure et la fonction des cellules de différents tissus de l'organisme (Roberston et Harmon, 2006). Ses effets sur la cellule apparaissent de manière lente et progressive, suite à une exposition prolongée à des concentrations élevées de glucose et d'acides gras (Poitout et Roberston, 2002). Il est important de préciser que le terme « toxicité » est utilisé seulement pour décrire la présence d'effets délétères au niveau du GHRH-R ou de la fonction somatotrope suite à l'exposition à des concentrations élevées de glucose ou d'AGL et non pour indiquer la présence de mort cellulaire. Une étude précédente sur des cellules d'hypophyse antérieures de rats exposées à des concentrations élevées de glucose n'a révélé aucun changement de la viabilité cellulaire (Bédard et al., 2008). Le concept de « glucolipototoxicité » a largement été utilisé pour décrire les effets du diabète de type 2 sur la cellule  $\beta$ -pancréatique (Poitout et al., 2010).

La glucotoxicité pourrait être, en partie, responsable des effets délétères observés sur l'axe somatotrope chez le rat STZ. Chez l'homme, une ingestion de glucose abaisse les concentrations sériques de GH de façon significative, 45 à 60 min après l'ingestion (Shibasaki et al., 1989). Dans des cultures primaires de cellules d'hypophyse antérieure de rat exposées 72 h à des concentrations élevées de glucose (22 mM), une diminution de la sécrétion de GH en réponse au GHRH a été observée (Renier et Serri, 1991). L'exposition de ces cellules à une concentration normale de glucose (6 mM) rétablit complètement la sécrétion de GH stimulée par le GHRH, suggérant que les effets d'une hyperglycémie à

court terme soient réversibles. De plus, des injections intraveineuses de glucose (50%), répétées aux 5 h chez des rats Wistar, ont démontré une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH hypothalamique, suggérant un mécanisme compensatoire à la diminution de sécrétion de GH (Murao et al., 1994).

Nous nous sommes intéressées aux effets d'une glucotoxicité *in vitro* sur le GHRH-R en utilisant des cellules hypophysaires primaires de rats jeunes exposées à 6, 12 ou 33 mM de D-glucose durant des périodes allant de 4-72 h. Une diminution significative des niveaux d'ARNm du GHRH-R a été observée, suite à une incubation de 24 et 48h en présence de 33 mM de D-glucose, comparativement à 6 mM de D-glucose (Bédard et al., 2008) En présence d'une glucotoxicité modérée (12 mM), une diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R n'est observée qu'à partir de 48 h d'exposition (résultats non-publié). De plus, une diminution significative des niveaux de fluo-GHRH internalisés ont été observée après 24 et 48 h d'incubation dans les cellules exposées à 12 ou 33 mM de D-glucose (Bédard et al., 2008 et résultats non-publiés). La production d'AMPC en réponse au GHRH est également diminuée lors d'une exposition de 24 et 48 h à 33 mM de D-glucose (Bédard et al., 2008). Ces résultats suggèrent que la glucotoxicité affecte de façon différentielle l'expression ainsi que la fonctionnalité du GHRH-R en fonction de l'intensité et de la durée du stimulus.

Des effets négatifs des acides gras sur la fonction somatotrope ont également été rapportés. Chez l'homme, une infusion de lipides et d'héparine administrée sur 150 min a provoqué une diminution ou une inhibition complète de la sécrétion de GH stimulée par le GHRH (Imaki et al., 1986; Casanueva et al., 1987). Des résultats similaires ont été retrouvés chez le rat infusé avec une solution de lipide-héparine où la sécrétion de GH en réponse au GHRH était supprimée (Imaki et al., 1986; Alvarez et al., 1991). Des études *in vitro* utilisant des cultures primaires de cellules hypophysaires de rat, exposées à des concentrations physiologiques ou supra-physiologiques d'acide caprylique ou oléique, ont montré une inhibition de la sécrétion de GH stimulée par le GHRH ou la forskoline (Casanueva et al., 1987). De plus, il a été mis en évidence que des concentrations de 3 mM d'acide caprylique diminuaient la sécrétion de GH, la production d'AMPC basale ou stimulée par le GHRH

ainsi que l'affinité de liaison du GHRH à son récepteur dans des cellules hypophysaires de rat (Renier et al., 1990).

En résumé, la liaison du GHRH à son récepteur est nécessaire à la régulation de la synthèse et sécrétion de GH. Le maintien de la fonctionnalité du GHRH-R est donc essentiel pour la fonction somatotrope. En situation physiologique ou patho-physiologique, la régulation du GHRH-R est affectée par plusieurs facteurs hormonaux et métaboliques mettant en jeu des mécanismes complexes.

## **1.4. LA SOMATOSTATINE ET SES RÉCEPTEURS**

### **1.4.1. Structure, localisation et rôles de la somatostatine**

La SRIF, principale hormone hypothalamique inhibitrice de la sécrétion de GH, a été découverte chez l'humain en 1972 (Brazeau et al., 1973). Le gène encodant le précurseur de la somatostatine comprend deux exons et est situé sur le chromosome 3 chez l'humain et 11 chez le rat. Chez les mammifères, le clivage de la pré-pro-somatostatine de 116 aa résulte en la formation de deux entités bioactives de 14 et 28 aa (SRIF<sub>14</sub> ou SRIF<sub>28</sub>), la première étant la plus exprimée dans l'hypothalamus (Patel, 1999). Au niveau hypothalamique, elle est produite principalement dans le noyau périventriculaire mais on la retrouve également, en plus faible densité, dans les noyaux paraventriculaire, arqué et ventromédian (Patel, 1999). Son rôle majeur dans ce tissu consiste à l'inhibition de la sécrétion de GH basale et stimulée par le GHRH dans les cellules somatotropes (Barinaga et al., 1985). Des études ont révélé une implication importante de la SRIF dans la régulation de la pulsativité de la sécrétion de GH, déterminant le moment et la durée des pics de sécrétion (Tannenbaum et al., 1984; Barnett, 2003). Dans les cellules hypophysaires de souris ATt-20, une exposition d'une heure à la SRIF provoque une diminution des niveaux d'ARNm de la GH qui serait dépendante de l'internalisation des récepteurs à la SRIF (SSTR) (Sarret et al., 1999). En plus de l'hypothalamus, la SRIF a été localisée également dans le système nerveux central où elle exercerait des effets sur les fonctions cognitives, locomotrices, sensitives et autonomes (Viollet et al., 2008). En périphérie, elle est également retrouvée dans plusieurs organes importants tels que le pancréas, le tractus gastro-intestinal, le rein ainsi que dans les cellules



du système immunitaire, telles que les lymphocytes T et les macrophages, sur lesquelles elle exerce une action inhibitrice (Barnett, 2003; Ferone et al., 2006).

#### **1.4.2. Régulation de l'expression de la somatostatine**

Plusieurs hormones ont été identifiées comme des régulateurs de synthèse ou sécrétion de la SRIF (Table 1). Parmi celles-ci, le GHRH, l'insuline et les hormones thyroïdiennes stimulent la sécrétion hypothalamique de SRIF, tandis que la GH et l'IGF-1 activent sa synthèse (Patel, 1999). À l'opposé, des effets inhibiteurs sur la sécrétion hypothalamique de SRIF ont été rapportés pour le glucose ainsi que pour la leptine et le *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) qui bloquent également sa synthèse (Patel, 1999). Les glucocorticoïdes ont montré des effets opposés sur la sécrétion et l'ARNm en fonction de la dose; stimulatrices à faibles taux et inhibitrices à fortes concentrations. Finalement, certains seconds messagers tels que l'AMPc, guanosine monophosphate (GMPc), le calcium ( $Ca^{2+}$ ) et l'oxyde nitrique (NO) ont des effets positifs sur l'ARNm de la SRIF (Patel, 1999).

#### **1.4.3. Les récepteurs de la somatostatine**

Six sous-types de récepteurs à la SRIF (SSTR1, SSTR2A, SSTR2B, SSTR3, SSTR4 et SSTR5) ont été mis en évidence et appartiennent à la sous-famille A4 des GPCR (Barnett, 2003). Ces récepteurs sont exprimés abondamment dans l'hypophyse antérieure mais aussi dans plusieurs autres tissus où ils sont différenciellement localisés selon leur sous-type. Ils sont tous encodés par des gènes différents, composés d'un seul exon, à des localisations chromosomiques distinctes, à l'exception des SSTR2A et B, qui sont générés par épissage alternatif à un site cryptique (Baumeister et Meyerhof, 2000). Ces deux isoformes diffèrent par la longueur de leur extrémité cytoplasmique, la forme 2B étant la plus longue. L'étude des promoteurs des gènes des SSTRs ont révélé la présence de plusieurs sites de liaison pour des facteurs de transcription tels que Pit-1, AP-1, AP-2, SP-1 et CRE (Olias et al., 2004).

Ces gènes codent pour des récepteurs de taille variant de 362 à 428 aa. La structure de ces récepteurs est bien conservée à travers les espèces avec des homologies de séquences de 94-99% pour le SSTR1 entre l'humain, la souris et le rat; 93-96% pour le SSTR2 entre l'humain le rat, la souris, le porc et le bovin; 88% pour le SSTR4 entre l'humain et le rat; et

finalement 82-83% pour les SSTR3 et SSTR5 entre l'humain et les rongeurs (Patel, 1999). Tous les sous-types de récepteurs lient la SRIF<sub>14</sub> et SRIF<sub>28</sub>, néanmoins, les SSTR1-4 présentent une affinité de liaison supérieure pour la première forme de SRIF alors que c'est l'inverse pour le SSTR5 (Barnett, 2003). Une étude utilisant une lignée de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO-K1) transfectées a révélé que les récepteurs de la SRIF ont la capacité de former des homo- ou hétérodimères, ce qui pourrait influencer leurs propriétés pharmacologiques, les voies de signalisations induites ainsi que le processus d'internalisation (Rocheville et al., 2000). Ces phénomènes d'oligomérisation ont également un impact sur l'action physiologique découlant de l'interaction de ces deux récepteurs. Il a également été proposé que les SSTR puisse dimériser avec d'autres GPCRs tel qu'observé avec le récepteur 2 humain de la dopamine exprimé dans les cellules CHO-K1 (Rocheville et al., 2000).

Ces récepteurs sont exprimés dans plusieurs tissus ce qui explique la multitude de rôles physiologiques que la SRIF exerce. Dans l'hypophyse antérieure, les SSTR2 et -5 sont les formes prédominantes et sont exprimées dans presque tous les types cellulaires (Ben-Shlomo et Melmed, 2010). En plus de son rôle majeur dans la régulation de la sécrétion de GH, la SRIF agirait également sur la sécrétion basale ou stimulée de la thyrotropine en l'inhibant. Dans le cas de ces deux hormones, des études réalisées sur des cellules hypophysaires humaines utilisant des agonistes bi-sélectifs ont montré l'implication des sous-types SSTR2 et SSTR5 dans cette action inhibitrice de la SRIF (Shimon et al., 1997). De plus, une stimulation de 72 h avec de la SRIF<sub>14</sub> ou un analogue (SOM 230) sur une lignée de cellules tumorales murines corticotropes (AtT20) provoque une diminution de la sécrétion d'ACTH, suggérant une action négative de la SRIF, dépendante des SSTR5 (Strowski et al., 2003). Une action similaire mais plus modeste a été observée sur la prolactine et semblerait dépendante des estrogènes (Lee et Shin, 1996).

L'expression des récepteurs à la SRIF est régulée à la hausse par l'augmentation de l'AMPC mais aussi par la SRIF. Cette régulation est également affectée par différents facteurs hormonaux. Les estrogènes stimulent la formation des ARNm des SSTR2 et SSTR3 et inhibent celle de la SSTR1 dans les cellules hypophysaires de rat (Visser-Wisselaar et al., 1997). Les glucocorticoïdes régulent positivement la transcription des SSTR1 et 2 lors d'une

courte exposition dans les cellules hypophysaires de la lignée GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> alors qu'ils l'inhibent suite à une exposition prolongée (Xu et al., 1995). De plus, une étude effectuée avec une lignée de thyrotropes de souris a montré une augmentation des ARNm des SSTR1 et SSTR5 en présence d'hormones thyroïdiennes (James et al., 1997). Finalement, chez le rat soumis à un jeûne prolongé ou chez le rat diabétique suite à l'administration de STZ, l'expression des SSTR1 et -3 hypophysaires est diminuée alors que celle du SSTR5 hypothalamique est augmentée (Bruno et al., 1994).

#### **1.4.4. Les voies de signalisations activées par la somatostatine**

La liaison de la SRIF à l'un de ses récepteurs peut activer plusieurs de voies de signalisation en fonction de la localisation et du sous-type de récepteur. La voie la plus commune est l'inhibition de l'adénylate cyclase, via l'action de la sous-unité  $\alpha$  inhibitrice de la protéine G, bloquant de ce fait l'accumulation d'AMPc (Patel et al., 1994). Une autre voie importante est la réduction du calcium intracellulaire déclenchée par l'ouverture des canaux potassiques ( $K^+$ ) membranaires causant l'hyperpolarisation de la membrane et la fermeture des canaux  $Ca^{2+}$  voltage dépendants de type L. Des interactions entre les SSTR et les sérine/thréonine phosphatases, entre autres impliquant la protéine phosphatase 2A et la calcineurine, ont été décrites et affecteraient la modulation des canaux  $Ca^{2+}$  et  $K^+$  par la SRIF (Ben-Shlomo et Melmed, 2010; Olias et al., 2004). Les voies de signalisation précédentes sont impliquées dans l'inhibition de la sécrétion de la GH par la SRIF tandis que l'inhibition de la prolifération cellulaire et l'apoptose serait principalement médiée par l'activation des MAPK et des protéines tyrosine phosphatase (Patel, 1999).

En résumé, la somatostatine est la principale hormone inhibitrice de la synthèse et sécrétion de GH et son action est essentielle à la pulsativité de sécrétion de la GH. Son expression extra-hypophysaire, ainsi que celle de ses différents récepteurs, lui permet d'exercer une grande diversité d'action, toutefois celle au niveau de l'axe somatotrope demeure essentielle.

## **1.5. LA GHRÉLINE ET SON RÉCEPTEUR**

### **1.5.1. Structure, localisation et rôles de la ghréline**

En 1996, des études utilisant des sécrétagogues synthétiques de la GH ont identifié un récepteur lié à ces effets, le récepteur des sécrétagogues de la GH (GHS-R), situé sur les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure. Ce récepteur a été considéré comme un récepteur orphelin jusqu'en 1999, où son ligand endogène, la ghréline, fut isolé à partir de l'estomac de rat (Kojima et al., 1999). Le gène codant pour ce peptide est situé sur le chromosome 3 chez l'homme, 6 chez la souris et le 4 chez le rat. La ghréline est une hormone de 28 aa qui provient de son précurseur de 117 aa, la prépro-ghréline. Le peptide mature de la ghréline est très similaire chez l'homme et le rat puisqu'il diffère seulement par 2 aa. La ghréline doit subir une modification post-traductionnelle afin d'être active, soit l'octanoylation de la Ser 3 par la ghréline O-acétyltransférase avant d'être clivée par les pro-hormones convertases (Kojima et Kangawa, 2010). La ghréline est principalement produite par les cellules X/A-analogues de la muqueuse stomacale mais on la retrouve également en plus faible concentration dans plusieurs tissus tels que l'intestin, le pancréas et dans certaines parties du cerveau (hypothalamus, cortex et hippocampe), où elle exerce des fonctions multiples (Date et al., 2000; Hou et al., 2006; Higgins et al., 2007). Dans l'hypophyse antérieure de rat, la ghréline est exprimée dans les cellules somatotropes, lactotropes et corticotropes (Caminos et al., 2003).

La ghréline est une hormone multifonctionnelle qui agit tant au niveau métabolique, en stimulant l'appétit et la prise alimentaire, qu'au niveau gastrique et cardiovasculaire (Higgins et al., 2007). Elle participerait aussi à la régulation de l'état sommeil/éveil. L'administration iv de ghréline augmente la phase du sommeil NREMS et diminue la REMS chez la souris et chez l'humain (Steiger et al., 2011). Elle régule la prolifération cellulaire et induit l'apoptose et l'inflammation via ses actions autocrines et paracrines (Higgins et al., 2007). La ghréline est également un régulateur important de la sécrétion de GH. Une administration intraveineuse de ghréline chez le rat provoque une augmentation de la concentration de GH circulante 5-10 min suivant l'injection (Kojima et al., 1999; Tannenbaum et al., 2003). Il a été suggéré que cette stimulation de la sécrétion de GH pourrait être bloquée par l'action de la somatostatine (Tannenbaum et al., 2003). De plus,

des études dans les cellules hypophysaires de rat mises en culture ont montré une stimulation de la sécrétion de GH concentration-dépendante de la ghréline (Kojima et al., 1999). Une étude récente a également suggéré que la ghréline pourrait stimuler directement les neurones GHRHergiques du noyau arqué de l'hypothalamus (Osterstock et al., 2010).

### **1.5.2. Régulation de l'expression de la ghréline**

Les niveaux de ghréline circulants sont très sensibles à la prise alimentaire, étant augmentés avant un repas et diminués par la suite (Cummings et al., 2001). Il existe également une corrélation négative entre les niveaux de ghréline circulants et l'indice de masse corporel. Chez les rats soumis à un jeûne de 72 h, les niveaux d'ARNm et le contenu hypophysaire en ghréline sont diminués en comparaison à des rats nourris AL (Kamegai et al., 2004). Plusieurs autres facteurs affectent la régulation de la ghréline (Table 1). Une augmentation des niveaux d'ARNm et du contenu hypophysaire de ghréline a été observée chez des rats infusés iv durant 4 h avec du GHRH humain (10 µg/h) (Kamegai et al., 2001; Kamegai et al., 2004). Les hormones thyroïdiennes, en particulier la T3, ainsi que les glucocorticoïdes ont un effet négatif sur les niveaux d'ARNm et contenu peptidique de ghréline hypophysaire chez le rat (Kamegai et al., 2004). Plusieurs études chez l'homme ont également montré que la somatostatine, l'hyperinsulinémie, l'obésité, l'hyperthyroïdie, l'infusion iv d'acides gras ou encore l'injection de leptine étaient associés à une diminution de la concentration de ghréline circulante (Velduis et Bowers, 2010).

### **1.5.3. Le récepteur de la ghréline**

Le récepteur de la ghréline (GHS-R) fait partie de la grande famille des GPCR et est constitué de 364 aa (Mckee et al., 1997). Il présente une grande homologie de séquence inter-espèce (93-99 %, humain, porc, chien, rat, souris) (Anderson et al., 2005). Chez l'homme, le rat et le porc, deux isoformes sont identifiées (Howard et al., 1996; Mckee et al., 1999; Yokote et al., 1998). La première GHS-R 1a, correspond au récepteur natif de la ghréline, tandis que la forme GHS-R 1b résulte d'un épissage alternatif qui conserve un intron supplémentaire et se traduit en un récepteur à 5 régions transmembranaires incapable de lier le GHS (Howard et al., 1996). La forme GHS-R 1a est exprimée dans l'hypothalamus, l'estomac, l'intestin, les reins, le pancréas, le tissu adipeux, le cœur et les

poumons (Higgins et al., 2007). Chez le rat, l'ARNm du GHS-R 1a a été retrouvé dans l'hypothalamus, l'hypophyse antérieure, le cortex cérébral, le tronc cérébral et dans les reins (Yokote et al., 1998). En plus de lier la ghréline, le récepteur est également activé par les peptides synthétiques sécrétagogues de la GH. Parmi les plus connus; le GHRP-6 et l'hexareline (Ghigo et al., 1997).

Une régulation négative de l'ARNm du GHS-R hypophysaire par son propre ligand a été observée chez les rats infusés iv 4 h avec un sécrétagogue de la GH (Kineman et al., 1999). Néanmoins, une augmentation de 2 fois des niveaux d'ARNm hypophysaire du GHS-R a été rapportée chez les rats infusés iv 4 h avec un analogue du GHRH ([des-NH<sub>2</sub>Tyr<sup>1</sup>, D-Ala<sup>15</sup>]hGRF-(1-29)-NH<sub>2</sub>) (Kineman et al., 1999). Les niveaux d'ARNm hypothalamiques de GHS-R, précisément dans le noyau arqué et ventromédial, sont diminués suite à une infusion iv de 6 jours avec de la GH (Bennett et al., 1997), suggérant un rétrocontrôle négatif de la GH sur l'expression du GHS-R. Un effet positif des hormones thyroïdiennes sur l'expression du GHS-R a été observé dans des cultures primaires de cellules hypophysaires de rat stimulées 4 et 8 h avec de la T3 (Kamegai et al., 2001). Plusieurs groupes ont étudiés les effets des glucocorticoïdes sur les niveaux d'ARNm du GHS-R, mais les résultats demeurent divergents. Tamura et collaborateurs (2000) ont rapporté une augmentation de l'expression du GHS-R dans des cellules hypophysaires de rat traitées 8 jours à la dexaméthasone. D'autres études n'ont pas montré d'effets suite à une administration de dexaméthasone durant 4 h sur des cellules primaires hypophysaires de porc ou d'un traitement à la corticostérone de 7 jours chez le rat (Luque et al., 2004; Kim et al., 2008). Des éléments de réponse positifs pour les hormones thyroïdiennes et négatifs pour les glucocorticoïdes ont été identifiés sur le promoteur du gène humain du GHS-R (Petersenn et al., 2001).

#### **1.5.4. Les voies de signalisations activées par la ghréline**

Les voies de signalisation activées par le GHS-R ont été caractérisées dans plusieurs types cellulaires. L'activation du GHS-R par la ghréline ou un autre agoniste stimule la protéine Gαq et déclenche la production d'inositol-3-phosphate (IP<sub>3</sub>) et de DAG par la protéine lipase C. La relâche de ces seconds messagers cause une augmentation de calcium intracellulaire ainsi que la stimulation de la PKC (Howard, 1996), menant à l'activation de

MAPK. Cette dernière voie a été suggérée comme étant responsable des effets mitogéniques de la ghréline (Nanzer et al., 2004). Une activation des canaux  $Ca^{2+}$  de type L a également été observée. Une réponse synergique de la production d'AMPc et de GH suite à une stimulation avec le GHRH et un sécrétagogue synthétique de la GH a été mis en évidence dans des cellules d'hypophyse antérieure primaires de rat (Cheng et al., 1989; Cheng et al., 1993). De plus, dans des cellules HeLa-T4 co-transfectées avec le GHRH-R et GHS-R de rat, une potentialisation de la production d'AMPc en présence de GHRH et ghréline a été observée (Cunha et Mayo, 2002).

En résumé, en plus de son rôle dans la régulation de la prise alimentaire, la ghréline exerce une action régulatrice importante de la sécrétion de la GH, via l'activation de son récepteur.

## **1.6. LE FACTEUR DE CROISSANCE INSULINIQUE DE TYPE 1, SON RÉCEPTEUR ET SES PROTÉINES DE LIAISON**

### **1.6.1. Structure, localisation et rôles de l'IGF-1**

Le facteur insulinique de type 1 (IGF-1) fait partie de la grande famille des facteurs de croissance insuliniques qui comprend le facteur insulinique de type 2 (IGF-2) et l'insuline. L'IGF-1 mature est une protéine de 70 aa qui comporte 4 domaines désignés B (1-29 aa), C (30-41 aa), A (42-62 aa) et D (63-70 aa). Les domaines B et A de l'IGF-1 sont homologues à ceux de l'insuline (Vardatsikos et al., 2009). L'IGF-1 provient du prépro-IGF-1 composé de 130 aa qui comporte un domaine E supplémentaire de 35 aa en c-terminal. Le gène de l'IGF-1 est situé sur le chromosome 12 chez l'humain, 7 chez le rat et 10 chez la souris.

La majorité de l'IGF-1 circulante est produite au niveau du foie principalement par l'action de la GH hypophysaire (Moller et al., 1991; Yakar et al., 1999). Elle est également retrouvée en quantité plus faible dans des tissus extra-hépatiques tels que le tissu adipeux et le muscle (Moller et al., 1991). Dans l'hypophyse de rat, la présence d'ARNm de l'IGF-1 a été identifiée dans la partie antérieure et postérieure (Bach et Bondy, 1992; Eppler et al.,

2007). Des études de double marquage immunocytochimique ont permis de déterminer une colocalisation de l'IGF-1 principalement avec la GH et l'ACTH (Eppler et al., 2007).

L'IGF-1 est présente dans la circulation principalement complexée à ses protéines de liaison alors que seulement 1% demeure libre, représentant la concentration bioactive de l'IGF-1 (Rajaram et al., 1997). Il joue un rôle majeur dans la croissance de plusieurs tissus, principalement sur le tissu osseux. Il a longtemps été suggéré que l'IGF-1 produite dans le foie était la seule responsable de la croissance longitudinale activée par la GH. Cette hypothèse a été révisée dans les années 1980 pour intégrer la contribution de l'IGF-1 extra-hépatique dans cet effet (Buttler et Le Roith, 2001). De plus, une étude utilisant une souris transgénique mutée pour le gène hépatique de l'IGF-1 a montré que l'IGF-1 hépatique n'était pas indispensable au développement et à la croissance normale de la souris (Yakar et al., 1999). L'IGF-1 possède des effets similaires à l'insuline en augmentant l'utilisation du glucose par les tissus périphériques chez le rat (Moxley et al., 1990). Elle exerce également des fonctions sur le métabolisme protéique au niveau du muscle en augmentant la synthèse protéique et en diminuant la protéolyse (Fryburg, 1994).

Dans des cellules d'hypophyse antérieure de rat, l'IGF-1 inhibe la synthèse et la sécrétion de GH stimulée par le GHRH (Sheppard et Bala, 1986; Yamashita et Melmed, 1986). Ce mécanisme de régulation négative de l'expression de la GH semble être directement au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse antérieure et induite par l'IGF-1 circulant (Melmed et al., 1996). Des cellules hypophysaires de rat exposées à l'IGF-1 ont également montré une augmentation de la sécrétion basale et stimulée de LH et de FSH (Pazos et al., 2004).

### **1.6.2. Régulation de l'expression de l'IGF-1**

Le principal régulateur de la synthèse et de la sécrétion d'IGF-1 par le foie est la GH hypophysaire (Table 1). Une stimulation avec de la GH exogène, chez des rats ayant subi une hypophysectomie, augmente les niveaux d'ARNm hépatiques de l'IGF-1 (Roberts et al., 1986). L'apport alimentaire est également considéré comme un important régulateur de l'expression de l'IGF-1. Chez l'homme, un jeûne prolongé de 10 jours diminue significativement les niveaux d'IGF-1 total sériques (Clemmons et al., 1981). Chez le rat,



une restriction protéique pour une période de 7 jours diminue les niveaux d'IGF-1 plasmatiques (Thissen et al., 1990). De plus, chez des rats soumis à un jeûne pour 24, 48 ou 72 h, une diminution des niveaux d'ARNm d'IGF-1 hépatique est observée en fonction de la durée de l'intervention (Straus et Takemoto, 1990). Dans les tissus extra-hépatiques, l'expression de l'IGF-1 est contrôlée par plusieurs facteurs en plus de la GH. Dans les ostéoblastes de rats mises en culture, les niveaux d'ARNm d'IGF-1 sont augmentés par la présence de prostaglandine E<sub>2</sub>, d'hormone parathyroïdienne et d'estrogènes (Bichell et al., 1993; Ernst et Rodan, 1991) (Table 1). Dans les études *ex vivo* de follicules thyroïdiens de porc, la TSH stimule l'expression du gène de l'IGF-1 (Hofbauer et al., 1995).

### **1.6.3. Le récepteur de l'IGF-1**

Le récepteur de l'IGF-1 (IGF-1R) est transmembranaire et appartient à la grande famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Le précurseur de l'IGF-1R renferme 1370 aa, dont une séquence signal de 30 aa qui est clivée pour donner naissance au peptide mature. Il est composé de 2 sous unités  $\alpha$  qui composent la portion extracellulaire du récepteur où sont situés les sites de liaison et 2 sous-unités  $\beta$ , qui représentent une courte région extracellulaire et une large région cytoplasmique où se trouve le domaine tyrosine kinase (Le Roith, 2003). L'IGF-1R est exprimé sous forme de dimères à la surface cellulaire et nécessite un changement conformationnel pour être activé (Ullrich et al., 1986). Chez le rat, l'IGF-1R est exprimé dans plusieurs tissus incluant le cerveau, l'hypothalamus et le rein (Bondy et al., 1992; Garcia-Segura 1997; Chin et al., 1992). Dans l'hypophyse antérieure de rat, l'IGF-1R est présent dans toutes les populations de cellules endocriniennes, particulièrement dans les somatotropes et corticotropes (Eppler et al., 2007).

### **1.6.4. Les voies de signalisation activées par l'IGF-1**

Au niveau du domaine tyrosine kinase se trouvent trois tyrosines importantes (Y1131, Y1135 et Y 1136) dont l'auto-phosphorylation enclenche l'activation de l'IGF-1R suite à la liaison de l'IGF-1 (Gronborg et al., 1993). La phosphorylation subséquente de différents substrats dont le substrat du récepteur de l'insuline 1 (IRS-1) ou des domaines homologues à Src (SHC), mène principalement à l'activation de ERK 1-2 ou de PKB/AKT. L'activation de ERK 1-2 est associée à la prolifération et à la différenciation cellulaire mais

pourrait également être impliquée dans l'apoptose (Vincent et Feldman, 2002). Pour sa part, la stimulation de PKB/AKT peut mener à l'activation de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme, la transcription, la synthèse protéique, le cycle cellulaire, la survie cellulaire et l'apoptose (Vardatsikos et al., 2009).

#### **1.6.5. Les protéines de liaison de l'IGF-1**

On dénombre à ce jour six protéines de liaison des IGFs (IGFBP-1 à -6). Elles proviennent toutes du même précurseur et forment des protéines matures de 218-289 aa. Elles sont constituées de 3 domaines; les domaines C-terminal et N-terminal qui sont responsables de la liaison à l'IGF-1 et un domaine central. Ce dernier participe à la liaison de la protéine ALS (*acid labile subunit*) et possède les sites de modifications post-transcriptionnelles et de protéolyse (Firth et Baxter, 2002).

Dans la circulation, la majorité de l'IGF-1 (75-80 %) est retrouvée sous forme liée à l'IGFBP-3 et à la protéine ALS formant un complexe de 150 kDa. Ce complexe protège l'IGF-1 de l'action des diverses protéases et elle en prolonge la demi-vie. L'ALS est une glycoprotéine de 85 kDa dont le rôle rapporté semble se limiter à l'augmentation de la taille du complexe IGFBP-3/IGF-1 (Rajaram et al., 1997). Une autre portion des IGFBPs (20-25 %) peuvent également agir en simples transporteur afin de faciliter le transfert des IGFs vers les tissus cibles (Rajaram et al., 1997). Étant la protéine de liaison des IGFs la plus abondante de la circulation, les différents rôles et régulations de l'IGFBP-3 ont été étudiés plus en détail. En plus de ses actions dépendantes de l'IGF-1, l'IGFBP-3 exerce également des rôles au niveau de l'inhibition de la prolifération cellulaire, indépendamment de l'IGF-1 (Yamada et Lee, 2009). Ainsi, la transfection du gène de l'IGFBP-3 humain dans des fibroblastes de souris a montré une diminution significative du taux de prolifération cellulaire (Cohen et al., 1993). De plus, des études dans plusieurs lignées de cellules de cancer du sein humaines ont observé une augmentation de l'expression d'IGFBP-3 en présence d'agents antiprolifératifs tels que le TGF- $\beta$ , le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ), l'acide rétinoïque et des analogues de la vitamine D (Firth et Baxter, 2002).

L'IGFBP-3 est régulé principalement par l'IGF-1 et la GH. Une infusion iv de GH ou d'IGF-1 recombinante chez des rats ayant subi une hypophysectomie augmente significativement les niveaux d'IGFBP-3 sériques (Clemmons et al., 1989). De plus, dans une lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain, une augmentation des niveaux d'ARNm de l'IGFBP-3 est observée 6 h post-stimulation avec de la GH et 12 h post-traitement à l'IGF-1 (Gucev et al., 1997). D'autres facteurs peuvent également affecter la régulation de l'expression de l'IGFBP-3. En effet, des études *in vitro* ont suggéré que la vitamine D, l'acide rétinoïque, le TGF- $\beta$  et certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 (IL-1) et -6 (IL-6) augmenterait l'ARNm de l'IGFBP-3 (Yamada et Lee, 2009). Finalement, la prise alimentaire affecte également les niveaux d'IGFBP-3. Chez des rats soumis à un jeûne d'une durée de 3 jours, les niveaux sériques d'IGFBP-3 sont significativement diminués (Frystyk et al., 1999). Finalement chez le rat, une restriction protéique de 75 % d'une durée de 3 semaines diminue significativement les niveaux d'ARNm hépatiques de l'IGFBP-3 (Higashi et al., 1998).

En résumé, l'IGF-1 est la principale hormone sécrétée sous l'action de la GH, qui exerce son action proliférative dans plusieurs tissus et organes. Ses protéines de liaison, en particulier l'IGFBP-3, assure sa biodisponibilité et exerce plusieurs actions cellulaires indépendantes de l'IGF-1.

### **1.7. RÔLE DES CYTOKINES INFLAMMATOIRES DANS LA RÉGULATION DES COMPOSANTES DE L'AXE SOMATOTROPE.**

Il est maintenant établi qu'il existe des interactions entre les systèmes immunitaire et neuroendocrinien. Des études ont proposé que certaines cytokines inflammatoires puissent moduler la sécrétion ou l'expression d'hormones ou de récepteurs associés à la fonction somatotrope. Une étude chez le rat a montré qu'une stimulation *in vitro* avec l'IL-1, stimulait la sécrétion de GHRH et de SRIF hypothalamique, alors que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  n'avaient pas d'effet (Honneger et al., 1991). Une injection intraventriculaire d'IL-2 stimulerait la sécrétion de SRIF et inhiberait la stimulation de sécrétion de GHRH par la dopamine ainsi que la sécrétion de GH hypophysaire (McCann et al. 2006). L'injection

intraventriculaire de TNF-  $\alpha$  chez le rat stimulerait la sécrétion de GH hypophysaire (Rettori et al., 1989). *In vitro*, la présence de TNF- $\alpha$  augmenterait la sécrétion de GH stimulée par le GHRH dans des cellules hypophysaires de brebis (Fry et al., 1998). Une augmentation de la sécrétion de GH a également été mise en évidence dans des cellules d'hypophyse antérieure de rats mises en présence d'IL-6 (Spangelo et al., 1989). Finalement, une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH-R en présence d'IL-1 $\beta$  a été observée dans des cellules hypothalamiques foetales (Taishi et al., 2004).

**TABLEAU 1 : Synthèse des principaux facteurs hormonaux et métaboliques régulant les composantes de l'axe somatotrope chez le rat.**

Facteurs régulateurs	GHRH	GHRH-R	SRIF	SST-R	Ghréline	GHS-R	IGF-1	IGFBP-3
<b>GH</b>	↓ (1)		↑ (14)			↑ (20)	↑ (24)	↑ (26, 27)
<b>IGF-1</b>	↓ (2)	↓ (7)	↑ (14)					↑ (27)
<b>GHRH</b>	↓ (3)	↑ (8)	↑ (14)		↑ (18)	↑ (21)		
<b>Glucocorticoïdes</b>	↓ (4)	↑ (9)	↑ ou ↓ (14)	↑ (15)	↓ (18)	↑ ou = (22)		
<b>Hormones thyroïdiennes</b>	↓ (5)	↑ (10)	↑ (14)	↓ (16)	↓ (18)	↑ (23)		
<b>Estrogènes</b>	↓ (6)	↓ (11)		↑ (17)			↑ (25)	
<b>Testostérone</b>	↑ (6)							
<b>Insuline</b>		↓ (12)	↑ (14)		↓ (19)			
<b>Glucose</b>		↓ (13)	↓ (14)		↓ (19)			

**Références bibliographiques:**

1. Sato et Frohman, 1993
2. Melmed et al., 1996
3. Lumpkin et McDonald, 1989
4. Senaris et al., 1996
5. Jones et al., 1990
6. Senaris et al., 1992
7. Sugihara et al., 1999
8. Aleppo et al., 1997
9. Miller et Mayo, 1997

10. Korytko et Cuttler, 1997
11. Lam et al., 1996
12. Luque and Kineman, 2006
13. Bédard et al., 2008
14. Patel, 1999
15. Xu et al., 1995
16. James et al., 1997
17. Visser-Wisselaar et al., 1997
18. Kamegai et al., 2004
19. Veldhuis et Bowers, 2010

20. Bennett et al., 1997
21. Kineman et al., 1999
22. Tamura et al., 2000; Kim et al., 2008
23. Kamegai et al., 2001
24. Roberts et al., 1986
25. Ernst et Rodan, 1991
26. Clemmons et al., 1989
27. Gucev et al., 1997

## **1.8. LE VIEILLISSEMENT**

### **1.8.1. Les théories biologiques du vieillissement**

Il existe plus de 300 théories proposées pour tenter d'expliquer les changements physiologiques qui surviennent au cours du vieillissement (Rattan, 2006). De façon générale, le vieillissement est considéré comme la somme des effets de facteurs intrinsèques (génétique, métabolisme) et externes (environnementaux) sur l'organisme. Deux pistes principales sont suggérées; le vieillissement est un processus programmé où l'accumulation des dommages et des erreurs mènent au vieillissement. Parmi les théories du vieillissement programmé, se retrouvent les théories évolutionnistes et systémiques (Figure 4). Les théories d'accumulation des dommages suggèrent que les effets délétères de l'environnement sur l'organisme contribuent au vieillissement et peuvent être divisées en deux classes; cellulaires ou moléculaires. De nos jours, ces différentes théories ne sont pas considérées comme mutuellement exclusives mais plutôt complémentaires les unes aux autres proposant une vision multifactorielle du vieillissement.

#### **1.8.1.1. La théorie des radicaux libres**

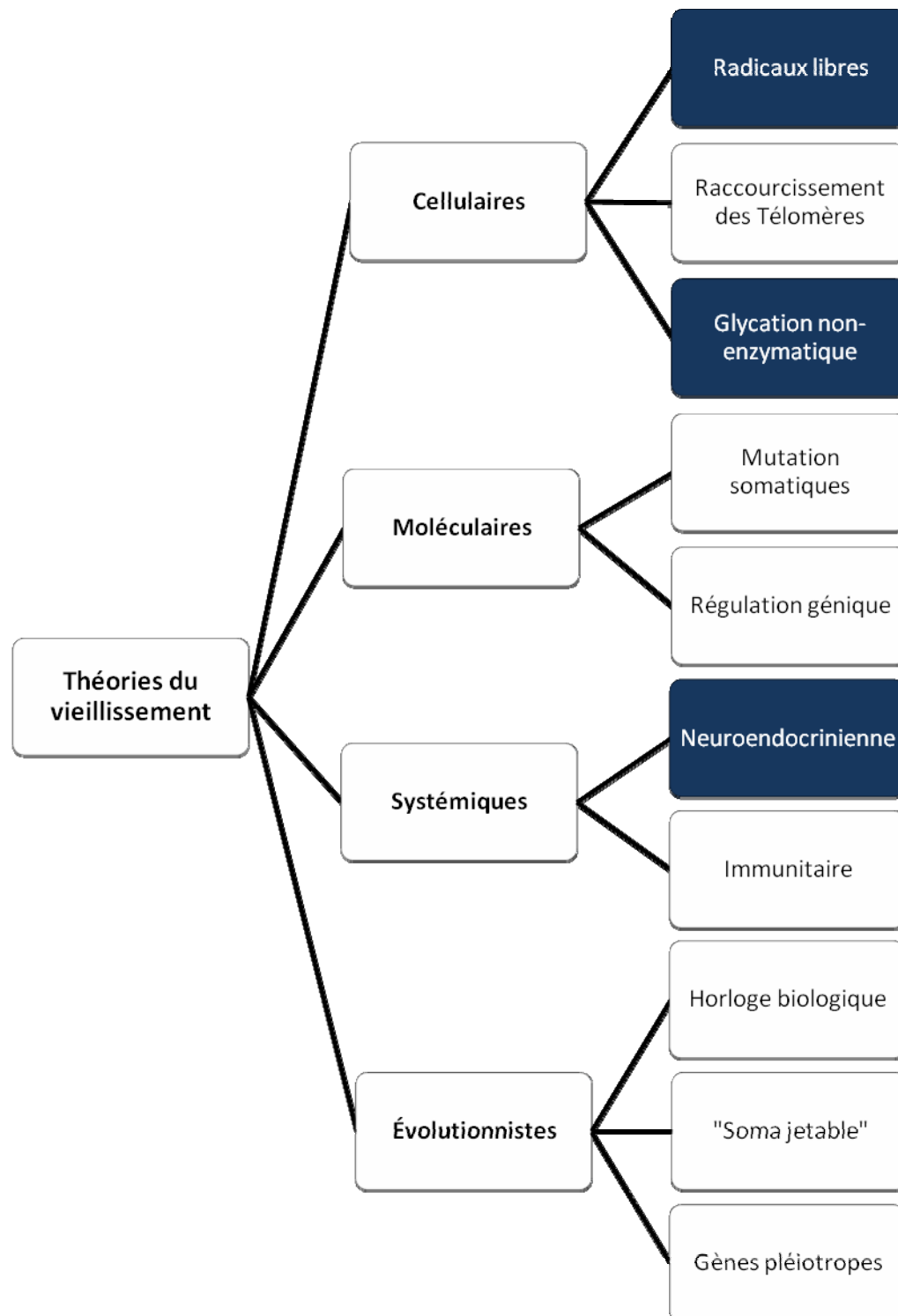
En 1956, le D<sup>r</sup> Harman émet l'hypothèse selon laquelle l'accumulation de radicaux libres menant à des dommages oxydatifs cellulaires serait un élément important dans le processus du vieillissement (Harman, 1956). Aujourd'hui, il s'agit de la théorie du vieillissement la plus connue et acceptée de la communauté scientifique. Le stress oxydant est défini comme le déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants, générateurs d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) et les systèmes antioxydants de la cellule (Figure 5) (Finkel et Holdbrook, 2000). Il peut être causé par une augmentation de la production des ROS mais aussi par une diminution d'efficacité des systèmes antioxydants (Sohal et Weindruch, 1996). Plusieurs types de ROS peuvent être formés tels que l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et les radicaux hydroxyles ( $OH^-$ ) (Fang et al., 2002). Afin de contrer les effets négatifs de la production de ROS, les cellules possèdent des systèmes de défense antioxydants. Les enzymes antioxydants les plus importants sont les superoxydes dismutases (SOD) à manganèse (Mn) et à cuivre (Cu)/zinc (Zn), qui se retrouvent dans la mitochondrie et le cytosol, respectivement, ainsi que la catalase (CAT) localisée dans les peroxysomes, et la glutathione peroxydase (GPX) qui peut être cytosolique, membranaire ou

mitochondriale (Barja, 2004). La SOD catalyse la réaction de formation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à partir du radical  $\text{O}_2^-$ , alors que la CAT réduit le  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$ , grâce à un transfert d'électrons entre deux molécules d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (McCord, 2000). Finalement, la GPX réduit le  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ , en oxydant le glutathion (GSH à GSSG), lequel est régénéré en GSH grâce à la glutathione réductase (Mari et al., 2009). De nombreuses études ont examiné les niveaux d'expression ainsi que l'activité des systèmes antioxydants dans plusieurs tissus au cours du vieillissement. Toutefois, les résultats obtenus sont souvent divergents (Barja, 2004). Chez les rats âgés de 28 mois, les niveaux d'ARNm ainsi que l'activité des enzymes CAT et SOD Cu/Zn sont diminués dans le foie (Rao et al., 1990). Dans le cerveau de rats âgés, des études ont rapporté des changements d'activité de la GPX, de la SOD et de la glutathione réductase selon l'âge et la région du cerveau étudiée (Benzi et Moretti, 1995).

La production abondante de radicaux libres mène entre autres à la peroxydation des lipides (LPO), réaction en plusieurs étapes, dont l'initiation débute par l'action d'un radical hydroxyle qui soustrait un atome d'hydrogène (H) d'une double liaison d'un acide gras polyinsaturé et se termine par la génération en chaîne de radicaux peroxydes qui se combinent à un  $\text{H}^+$  pour former des lipides hydroxyperoxydes (Dmitriev et Titiov, 2010). La LPO génère plusieurs sous-produits dont l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) ainsi que le 4-hydroxynonéal (4-HNE) qui sont très utilisés comme marqueurs biologiques de l'état de stress oxydant cellulaire (Marnett, 1999). Les attaques de la membrane lipidique cellulaire altèrent la fluidité membranaire (Hong et al., 2004) et modifient ainsi le fonctionnement de plusieurs récepteurs membranaires et voies de signalisation (Van der Vliet et Bast, 1992). Une étude récente chez des rats de 15 et 26 mois a rapporté une augmentation de la LPO, mesurée par les substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) dans des homogénats de cerveau (Babusikova et al., 2007).

L'agression des protéines par les ROS se traduit soit par l'oxydation et le clivage des liaisons protéiques ou encore des modifications des chaînes latérales (Levine et Stadtman, 2001). La modification la plus fréquente des protéines est la formation des groupes

**FIGURE 4 : Principales théories biologiques du vieillissement**



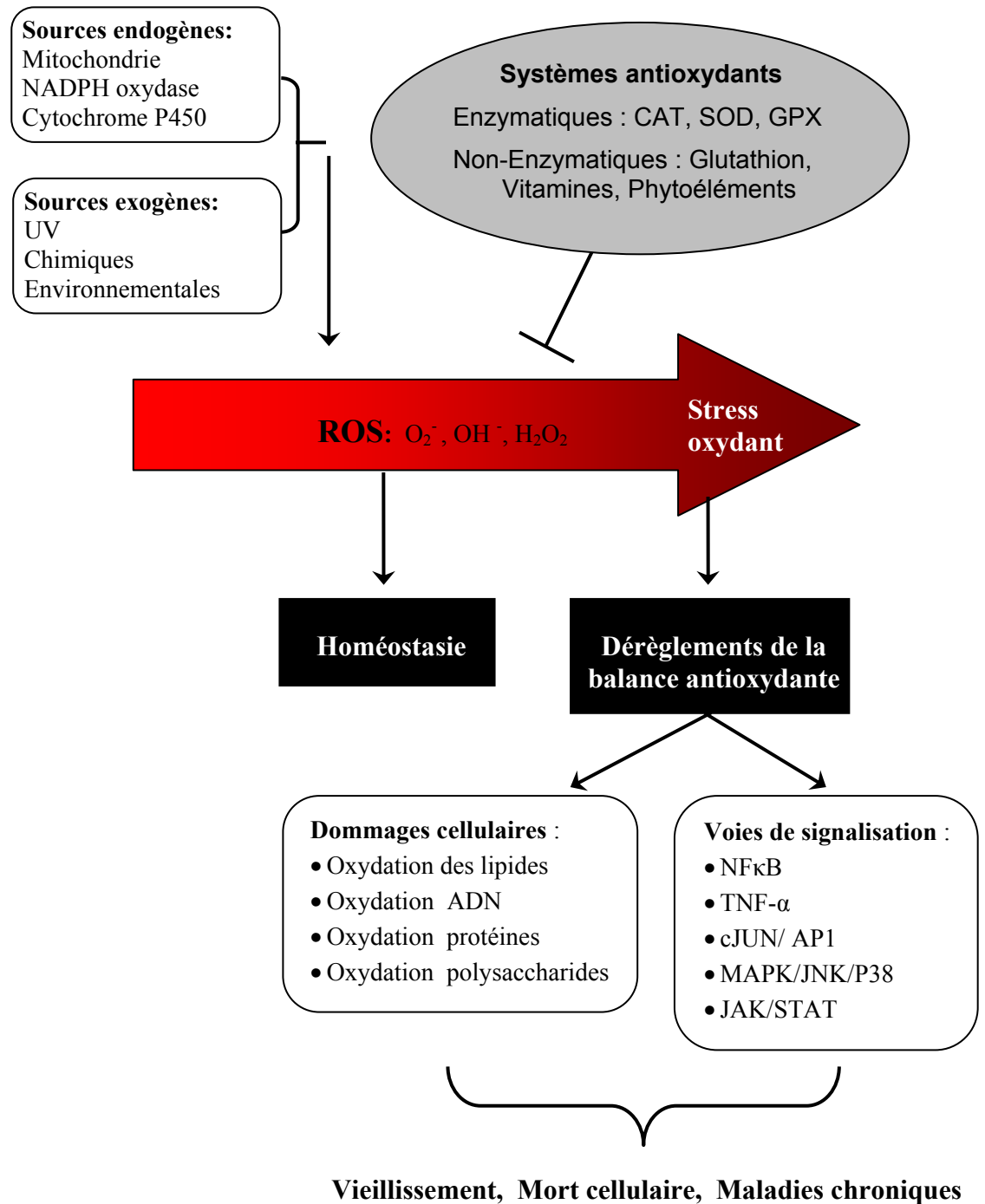
Inspiré de: Weinert et Timiras. Theories of aging. *J Appl Physiol* 2003, 95: 1706–1716.



carbonyls visant particulièrement les acides aminés arginine, lysine, thréonine et proline (Hipkiss, 2006). L'oxydation des protéines mène à la perte de leur fonctionnalité et pourrait même entraîner des interactions moléculaires intra- ou inter-protéines ayant des conséquences délétères (Hipkiss, 2006). Des systèmes de protection sont présents dans l'organisme pour contrer l'accumulation des protéines endommagées. En premier lieu, les protéines chaperonnes (HSP ou *heat-shock proteins*), responsables du repliement des protéines nouvellement formées, reconnaissent les protéines oxydées et tentent de les replier convenablement. Sinon, les systèmes de dégradation des protéines tels que le protéasome et les lysosomes prennent en charge les protéines oxydées (Hipkiss, 2006). Toutefois, des dysfonctions et un déclin de l'activité de ces systèmes de dégradation sont observés avec le vieillissement et pourraient contribuer à l'accumulation des protéines endommagées (Martinez-Vincente et al., 2005). Dans les mitochondries de cerveau et de foie de rats âgés de 15 et 23 mois, les niveaux de protéines carbonylées augmentent en fonction de l'âge (Navaro et Boveris, 2004).

L'ADN est également un type de molécule très vulnérable à l'action des ROS. Le stress oxydant peut endommager l'ADN de façon directe, par l'oxydation des acides nucléiques ou du désoxyribose, ou de façon indirecte, par l'addition de composés formés durant la LPO. Une des réactions les plus étudiées est l'addition d'un groupement OH au carbone 8 de la guanine pour former le 8-oxo-désoxyguanine (8-oxodG) (Stuart et Brown, 2006). Ces perturbations de l'ADN sont souvent prises en charge par les systèmes de réparation de l'ADN (Croteau et Bohr, 1997). Néanmoins, la surcharge ou encore des dérèglements de ces systèmes peuvent entraîner des erreurs de la réplication de l'ADN, dues aux mutations ponctuelles, menant à la synthèse de protéines non-fonctionnelles ou à l'apoptose. L'ADN mitochondrial est particulièrement vulnérable à l'oxydation par les ROS à cause de sa proximité avec les sites de production des superoxydes (Stuart et Brown, 2006).

**FIGURE 5 : La réponse cellulaire au stress oxydant**



Inspiré de: Finkel T et Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.

*Nature*. 2000; 408(6809), 239-47.

Une élévation des niveaux de 8-oxodG a été associée au vieillissement. Des niveaux plus élevés de 8-oxodG ont été retrouvés dans le foie de rats âgés de 23 mois comparativement à ceux de 6 mois (Hudson et al., 1998). Chez la souris de 27 mois, une augmentation des niveaux de 8-oxodG a également été observée dans le muscle squelettique, le cœur et le cerveau (Sohal et al., 1994).

Bien que moins étudié l'oxydation des polysaccharides n'en demeure pas moins importante. Les ROS peuvent attaquer les protéoglycans renfermés dans la matrice du cartilage articulaire favorisant le développement de l'arthrose (Yudoh et al., 2005). Les radicaux hydroxyles agissent en soustrayant un hydrogène aux carbones de la molécule de glucide entravant ainsi la structure moléculaire.

Les ROS ont également la capacité d'activer certaines voies de signalisation en situation physiologique, leur permettant de réguler différentes fonctions cellulaires telles que la prolifération, l'apoptose, la réponse immunitaire et la réponse inflammatoire (Figure 5) (Seifried et al., 2007). Ainsi, les voies ERK,  $Pi_3K/AKT$  et  $NF-\kappa B$  exercent des effets qui favorisent la survie cellulaire alors que celles impliquant P53, JNK et P38 mènent à l'apoptose (Finkel et Holdbrooks, 2000). En situation de stress oxydant une dérégulation de ces voies de signalisation contribue au vieillissement ou à l'exacerbation des différentes pathologies chroniques qui y sont associées (Finkel et Holdbrook, 2000).

#### **1.8.1.2. La glycation non-enzymatique**

La formation de produits avancés de glycation non-enzymatique (AGE), conséquence de la réaction de Maillard entre le glucose et des groupements aminés d'une protéine, a également été proposée comme un mécanisme associé au vieillissement (Wolff et al., 1991). Des études ont mis en évidence la présence de niveaux sériques élevés d'AGE chez les patients diabétiques de type 1 et 2, suggérant que la formation d'AGE est augmentée avec le diabète (Aso et al., 2000; Miura et al., 2003). Les AGEs peuvent également provenir de source exogène telle que l'alimentation. Les préparations commerciales renferment une quantité élevée d'AGE et la cuisson à haute température des aliments augmente également ces niveaux (Goldberg et al., 2004). Les AGEs stimulent la

production de ROS et conduisent à l'augmentation des dommages oxydatifs. Ils peuvent également agir *via* leurs récepteurs spécifiques (RAGE), membres de la superfamille des immunoglobulines, qui sont présents dans tous les types cellulaires. La liaison ligand-récepteur engendre un signal de stress oxydant à la cellule qui enclenche l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et des MAPK, menant à l'inflammation et la destruction tissulaire (Bierhaus et al., 2005). Les AGEs altèrent les caractéristiques structurales et fonctionnelles des protéines causant entre autres la réticulation de protéines (Bonfont-Rousselot, 2002). Plusieurs études chez l'homme, ont suggéré qu'une accumulation des AGEs soit présente dans plusieurs tissus et soit associée à des pathologies reliés au vieillissement. Ainsi, l'augmentation d'AGE au niveau du cerveau a été associée à la maladie d'Alzheimer, dans l'os à l'ostéoporose, dans le muscle à la sarcopénie, dans l'œil à la cataracte et dans le cœur aux maladies cardiovasculaires (Semba et al., 2010).

### **1.8.1.3. La théorie neuroendocrinienne**

La théorie neuroendocrinienne du vieillissement a été proposée pour la première fois par le professeur Vladimir Dilman (Dilman et Dean, 1992). Cette théorie suggère que le vieillissement soit causé par une perte de la sensibilité des récepteurs aux hormones au niveau hypothalamique et périphérique, ce qui mène progressivement à la diminution de la sécrétion de plusieurs hormones, affectant ainsi une multitude de réponses physiologiques. S'appuyant sur cette théorie, plusieurs thérapies hormonales dites « de remplacement » telles que la GH, la testostérone ou la déhydroépiandrosterone, ont été suggérées afin de contrer certains effets du vieillissement, bien que leur efficacité soit variable (Leow et Loh, 2006). Au niveau hypophysaire, plusieurs hormones telle que la GH (Corpas et al., 1993), la TSH (Leitol et al., 2002), et la LH (Veldhuis, 2000) sont diminuées avec l'âge et pourraient contribuer aux effets du vieillissement. Par exemple, le déclin de GH et, par conséquent, d'IGF-1 est souvent associé à une perte de la masse et force musculaire, une diminution de la masse osseuse (Perrini et al., 2010), ainsi qu'une augmentation de la masse adipeuse (Vahl et al., 1996).

### 1.8.2. Vieillessement de l'axe somatotrope

Plusieurs modifications au niveau de l'axe somatotrope surviennent au cours du vieillissement. Chez les mammifères incluant l'humain, une diminution de la sécrétion de GH est observée avec l'âge (Sonntag et al., 1980; Corpas et al., 1993). Chez le rat, une augmentation du contenu hypophysaire de GH est retrouvée à 12 mois suivie d'une diminution à l'âge de 20 mois (Deslauriers et al., 1991). Une étude utilisant une approche de quantification de l'expression génique sur membrane (*macroarray*) a révélé une diminution significative des niveaux d'ARNm de la GH hypophysaire chez les rats de 24 mois en comparaison à ceux des rats de 3 mois (Kappeler et al., 2003). Une diminution des niveaux d'ARNm et de protéine de la GH a également été rapportée chez des rats de 24 mois (Frutos et al., 2007). Aucun changement de niveaux d'expression de Pit-1 et CREB n'a été observé chez ces rats, suggérant que ces diminutions de GH ne résultent pas de l'action directe de ces facteurs de transcription (Gaudreau et al., 1999). Les niveaux circulants d'IGF-1 sont augmentés chez les rats de 8 mois et diminués chez ceux de 20 mois, suivant le patron d'expression de la GH (Deslauriers et al., 1991). Chez des rats de 27 mois, une diminution des niveaux d'ARNm de l'IGF-1 et d'IGFBP-3 a également été rapportée dans le foie (Velasco et al., 1998).

Ces diminutions sont attribuées, en partie, à une diminution d'expression et du contenu hypothalamique de GHRH. Une diminution du contenu hypothalamique de GHRH a été observée chez les rats de 24 mois en comparaison à ceux de 3 mois (Morimoto et al., 1988). De plus, chez des rats de 20-22 mois, les niveaux d'ARNm du GHRH sont diminués de 45 % par rapport à ceux des rats jeunes (De Gennaro et al., 1989). La participation de la SRIF à ces changements au cours du vieillissement demeure controversée. Certaines études ont rapporté une diminution significative des niveaux hypothalamiques d'ARNm de la SRIF chez les rats de 22 mois comparativement aux rats jeunes (2-4 mois) (Sonntag et al., 1990). D'autres ont montré une augmentation du contenu hypothalamique de la SRIF à l'âge de 8 mois, suivie d'une légère diminution à l'âge de 20 mois (Deslauriers et al., 1991) ou encore aucune différence du contenu entre les rats de 3 et 24 mois (Morimoto et al., 1988).

Des études de stimulation *in vivo* de la GH par le rGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> ont mis en évidence une diminution de la sécrétion de GH chez le rat à partir de l'âge de 12 mois et une absence de réponse à 20 mois. Des résultats similaires ont été observés *in vitro* dans des cellules hypophysaires de rats (Deslauriers et al., 1991). Une diminution de la sécrétion de GH stimulée par le GHRH a également été rapportée dans des cellules hypophysaires isolées provenant de rats de 24 mois en comparaison à celles des rats de 3 mois (Frutos et al., 2007). De plus, une diminution de la stimulation de l'adénylate cyclase en réponse au GHRH a été décrite chez les rats âgés (20-24 mois) (Robberecht et al., 1986). Ces résultats suggèrent qu'une diminution de la sensibilité des cellules somatotropes au GHRH apparaît au cours du vieillissement. Elle pourrait être due à des altérations au niveau du GHRH-R.

Dans l'hypophyse antérieure de rats de 8 mois, la diminution du nombre de sites de liaison à haute affinité du GHRH constitue la première modification survenant au récepteur. Elle est suivie d'une augmentation du nombre de sites à basse affinité à 14 mois. Chez les rats âgés de 18 mois, les sites à haute affinité sont complètement émoussés et une réduction du nombre total de sites de liaison est présente (Aribat et al., 1991; Lefrançois et al., 1995). De plus, une diminution des niveaux de transcrit de 2.5 kb d'ARNm du GHRH et une augmentation de celui de 4 kb ont été observés chez des rats de 18 mois comparativement aux rats jeunes (Girard et al., 1999). Une étude chez des rats de 6 à 24 mois a confirmé, par RT-PCR, une diminution progressive des niveaux d'ARNm du GHRH-R (Shimokawa et al., 2000). Les altérations du GHRH-R pourraient donc être, en partie, responsables de la diminution de la sécrétion de GH observée durant le vieillissement. Chez les rats de 18 mois, un traitement de 14 jours avec 1 mg/kg PC/jour s.c. de rGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> permet de restaurer les paramètres de liaison du GHRH-R dans un état similaire à ceux des rats de 2 mois (Girard et al., 1999). Cette intervention normalise également les niveaux du transcrit de 2.5 kb d'ARNm du GHRH-R, suggérant que le GHRH administré de façon chronique chez le rat âgé puisse stimuler la synthèse *de novo* de GHRH-R. Chez le rat jeune, ce traitement n'influence pas l'affinité des sites de liaison mais modifie la capacité de la classe de sites de haute affinité selon la concentration utilisée (Girard et al., 1999).

En plus d'une diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R, des diminutions d'expression du GHS-R, de la SSTR2 et SSTR5 hypophysaires ont été observé chez les rats

de 24 mois en comparaison à des rats de 3 mois (Frutos et al., 2007). Dans les cellules hypophysaires de ces rats âgés, la sécrétion de GH en réponse à une stimulation par la ghréline est significativement diminuée. Une diminution des niveaux d'ARNm du GHS-R a été rapportée dans l'hypothalamus de rats de 24 mois (Frutos et al., 2007). À l'opposé, une augmentation significative des niveaux d'ARNm et du contenu de ghréline stomacale et de la ghréline circulante a été rapportée chez les rats de 25 mois en comparaison à des rats de 5 mois (Englander et al., 2004).

En conclusion, plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer les processus du vieillissement incluant les théories de la production de stress oxydant, de la génération des AGEs et de la dysfonction neuroendocrinienne. Dans l'axe somatotrope, les effets du vieillissement sont importants et sont principalement associés à une perte de sensibilité des somatotropes au GHRH. Les mécanismes selon lesquels ces effets sont exercés sont en voie d'investigation.

## **1.9. LA RESTRICTION CALORIQUE**

### **1.9.1. Effets de la restriction calorique de longue durée chez les mammifères**

De nombreuses études ont porté sur les relations entre la nutrition et le vieillissement chez l'animal. Il est maintenant acquis qu'une consommation excessive de calories provoque des effets délétères à l'organisme menant à l'obésité, au diabète, à l'athérosclérose, au cancer et accélère les détériorations physiologiques liés au vieillissement (Gracia, 2006 ; Bengmark, 2006). La notion de restriction calorique (RC) a été abordée pour la première fois en 1935 (McCay et al., 1935) et se définit comme une diète réduite en calories, sans malnutrition. Actuellement, la RC modérée de longue durée représente la stratégie la plus efficace pour prévenir ou retarder les maladies liées au vieillissement et allonger l'espérance de vie moyenne et maximale (Fontana, 2010) et possiblement l'espérance de vie en bonne santé.

Les mécanismes par lesquels la RC exerce ses effets bénéfiques sont complexes et encore en investigation. Étant donné les nombreux changements biologiques produits par la

RC, plusieurs hypothèses ont été proposées pour tenter de les expliquer. La diminution du stress oxydant (Sohal et Weindruch, 1996), de l'inflammation (Chung et al., 2001), la reprogrammation métabolique (Anderson et Weindruch, 2010), l'hormèse (Masoro, 1992) et les changements au niveau du système neuroendocrinien (Nelson et al., 1995) en sont quelques exemples. Des études chez le rat âgé ont mis en évidence que la RC modérée (40%) diminuait la production mitochondriale de  $H_2O_2$  et les dommages oxydatifs à l'ADN dans plusieurs tissus dont le foie, le cœur, le muscle squelettique et le cerveau (Gredilla et Barja, 2005). Une augmentation de l'activité et des niveaux d'ARNm d'enzymes antioxydantes, telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase sont retrouvés dans le foie de rats de 28 mois soumis à une RC de 40% (Rao et al., 1990). De plus, des études ont révélé la présence de faibles niveaux circulants de cytokines pro-inflammatoires, de lymphocytes ainsi que des concentrations normales de cortisol chez les rongeurs soumis à la RC (Fontana, 2009). Les rats soumis à la RC ont également des niveaux de glucose et d'insuline diminués comparativement aux rats nourris *ad libitum*, suggérant une amélioration de la sensibilité à l'insuline par la RC (Masoro et al., 1992).

Plusieurs des effets de la RC se produisent *via* la régulation de l'expression de plusieurs gènes dans différents tissus. Des études d'expression génique ont été effectuées dans le foie (Cao et al., 2001), le cœur (Lee et al., 2002), le muscle squelettique (Lee et al., 1999), le tissu adipeux (Higami et al., 2004) et le cerveau (Prolla, 2002) de rongeurs, dans le but d'identifier les différents mécanismes responsables des effets biologiques positifs de cette intervention nutritionnelle. Parmi ceux-ci, une régulation à la hausse des gènes associés à la protection contre le stress oxydant, la réparation d'ADN et la survie cellulaire; une diminution des gènes de l'inflammation ainsi que la prévention de certains changements d'expression induits par le vieillissement (Fontana et Klein, 2007). Une seule étude de régulation de l'expression génique sur membrane portant sur les effets du vieillissement et de la RC a été effectuée à ce jour dans l'hypophyse antérieure de rats jeunes (4 mois) et âgés (25 mois) soumis ou non à une RC de 40% (Chen et al., 2004). Vingt-huit gènes, majoritairement régulés à la baisse, ont été significativement associés au vieillissement et 18 gènes, surtout régulés à la hausse, étaient associés à la RC. Parmi ces gènes, celui codant pour la GH était diminué avec le vieillissement mais non modifié par la RC. Finalement, un effet protecteur de la RC a été observé sur 8 gènes modifiés par le vieillissement (Chen et



al., 2004). Une étude similaire chez des rats âgés de 24 mois a rapporté une faible proportion de gènes régulés avec le vieillissement dans l'hypophyse antérieure (5.2%) et l'hypothalamus (1.5%) (Kappeler et al., 2003). Parmi ces gènes, une augmentation des niveaux d'ARNm de la GH hypophysaire a été observée ainsi qu'une régulation de gènes hypothalamiques associés à la régulation de la prise alimentaire (Kappeler et al., 2003).

Les effets bénéfiques de la RC ont également été étudiés chez les primates. Chez le singe rhésus soumis à une RC de 30% durant 20 ans, la fonction musculaire et la sensibilité à l'insuline était augmentée et le nombre de cas de cancers, de maladies cardiovasculaires et d'atrophie des régions du cerveau contrôlant les fonctions motrices et exécutrices étaient diminués (Colman et al., 2009). Chez l'humain, seules quelques études sur la RC à court terme ont été effectuées en raison de la difficulté de maintenir une telle stratégie à long terme dans un cadre d'études cliniques. Une évaluation des effets d'une RC de 25% durant six mois chez des adultes âgés de 25 à 50 ans a été réalisée dans l'étude CALERIE (*Comprehensive Assessment of the Long-term Effects of Reducing Intake Energy*). Parmi les effets bénéfiques de la restriction calorique, une diminution de la masse adipeuse, de la résistance à l'insuline et des risques de maladies cardiovasculaires ont été observés dans cette étude (Redman et al., 2007; Larson-Meyer et al., 2006; Lefevre et al., 2009).

### **1.9.2. Effets de la restriction calorique sur l'axe somatotrope**

La RC exercerait également un rôle bénéfique dans le maintien de la fonction somatotrope. Chez les rats âgés soumis à une RC de 40 %, le profil de sécrétion de la GH s'apparente à celui des rats jeunes (D'Costa et al., 1993a). Une augmentation des niveaux d'ARNm de la GH a été montrée dans l'hypophyse antérieure de rats de 18 et 24 mois en RC modérée (Han et al., 2001). La RC de 40% protège également de la diminution de la densité des somatotropes observée dans l'hypophyse antérieure de rats de 24 mois nourris *ad libitum* (Shimokawa et al., 1996). Une diminution des niveaux plasmatiques d'IGF-1 est toutefois observée chez les rats soumis à la RC comparativement à des rats âgés *ad libitum* (D'Costa et al., 1993b). De plus, la RC de 40%, implantée chez le rat âgé 8 mois jusqu'à l'âge de 18 mois, favorise le maintien des paramètres de liaison du GHRH similaires à ceux retrouvée dans l'hypophyse antérieure de rats jeunes, suggérant un rôle protecteur sur le

GHRH-R (Girard et al., 1998). À l'opposé, Shimokawa et collaborateurs (2000) n'ont observé aucun changement significatif des niveaux hypophysaires d'ARNm du GHRH-R et de SSTR2 et 5 chez les rats de 24 mois suite à une RC de 30%, obtenue par une privation de nourriture 1 jour sur 2.

En résumé, plusieurs effets bénéfiques de la RC ont été rapportés chez les mammifères au cours du vieillissement. Au niveau de l'axe somatotrope, des effets de la RC sont observés chez le rat âgé, en particulier sur le GHRH-R hypophysaire, et semblent favoriser le maintien de la fonction somatotrope. Des études approfondies seront nécessaires afin de mieux préciser ces effets et leurs mécanismes sous-jacents.

## **1.10. AUTRES INTERVENTIONS NUTRITIONNELLES**

### **1.10.1. Les vitamines**

Selon plusieurs études, les vitamines antioxydantes et suppléments vitaminiques aideraient à réduire le stress oxydant. Jusqu'à présent, les vitamines les plus étudiées pour leur grand pouvoir antioxydant sont les vitamines C et E. La vitamine C, ou acide ascorbique, est une molécule hydrophile dont la fonction principale est de détruire les radicaux libres particulièrement les groupes hydroxyles, peroxylys, l'anion superoxyde et le dioxyde d'azote. Elle participe également à la régénération de la vitamine E, du glutathion et de la  $\beta$ -carotène (Carr et Frei, 1999). Plusieurs fruits et légumes, tels que le poivron rouge, les fraises, les agrumes ainsi que le brocoli contiennent une teneur appréciable en vitamine C (Nutrition et alimentation, Santé et services sociaux du gouvernement du Québec, <http://www.msss.gouv.qc.ca>). La vitamine E existe sous 4 formes : l'alpha-, le bêta-, le delta- ou le gamma-tocophérol (Banks et al., 2010). Parmi ces formes, l' $\alpha$ -tocophérol possède le pouvoir antioxydant le plus efficace. Il est lipophile et protège également les lipides et protéines membranaires ainsi que l'ADN de l'oxydation (Fang et al., 2002). Les huiles végétales, les noix, l'avocat et la papaye sont des aliments riches en vitamine E (Nutrition et alimentation, Santé et services sociaux du gouvernement du Québec, <http://www.msss.gouv.qc.ca>).

Certaines études ont suggéré que l'utilisation de suppléments vitaminiques (C et E) puisse protéger l'organisme de certains effets délétères et pathologies associées au vieillissement. Une augmentation de la durée de vie moyenne, de 40% chez les mâles et de 14 % chez les femelles ainsi qu'une durée de vie maximale de 17% chez les mâles a été rapportée chez des souris soumises à une diète riche en vitamine E (5 g/kg nourriture sèche) à partir de l'âge de 28 semaines (Navaro et al., 2005). Un supplément de vitamine E (500 ppm) administré pendant 6 semaines à des souris de 24 mois a augmenté la réponse immunitaire et diminué la synthèse *ex vivo* de prostaglandines E2 dans les homogénats de cellules hépatiques (Meydani et al., 1986). Chez l'homme, une étude associative chez des sujets âgés de plus de 55 ans, a montré qu'une consommation élevée en vitamine C et E réduisait significativement les risques de maladie d'Alzheimer (Engelhart et al., 2002). Plusieurs études cliniques ont également montré une corrélation inverse entre la prise de vitamine C ou E et le risque de développer des cataractes (Taylor et Hobbs, 2001).

#### **1.10.2. La S-adenosyl-méthionine**

La S-adenosyl-méthionine (SAME) est formée dans le foie à partir de la méthionine et d'adénosine triphosphate (ATP) et est présente dans toutes les cellules de l'organisme. Il est le substrat de plusieurs réactions impliquant le transfert de groupement méthyls par les méthyl-transférases (Bottiglieri, 2002). Ces processus de méthylation sont essentiels au niveau de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des phospholipides et jouent un rôle important dans la transcription, la traduction et la réparation des dommages à l'ADN (Chiang et al., 1996). La SAME sert également de substrat pour les réactions de transulfuration qui permet la synthèse de glutathion, le plus important antioxydant endogène de l'organisme (Bottiglieri, 2002). Plusieurs études cliniques ont mis en évidence que l'administration de SAME avait des effets bénéfiques dans le traitement de l'arthrose, similaires à ceux obtenus avec des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (Di Padova, 1987). De plus, dans des cellules synoviales de lapin, l'ajout de SAME protège contre les effets délétères du TNF- $\alpha$  observés sur la prolifération cellulaire et la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire (Gutierrez et al., 1997). Finalement, une association entre la diminution des niveaux de SAME dans le liquide céphalo-rachidien et dans le cerveau, et l'apparition de la maladie d'Alzheimer a été proposée (Bottiglieri et al. 1990; Morrison et al., 1996).

### 1.10.3. Le soya et les isoflavones

La fève de soya est composée de lipides, de protéines, d'hydrates de carbone et contient également des micronutriments tels que les isoflavones, des phytostérols, des vitamines et minéraux. Les isoflavones font partie des phytoestrogènes, puisqu'ils possèdent un anneau phénolique dans leur structure, leur permettant de se lier au récepteur des œstrogènes. Les phytoestrogènes se retrouvent dans plusieurs fruits et légumes, mais la fève de soya demeure la plus importante source d'isoflavone alimentaire. La génistéine et daidzéine sont les principaux flavonoïdes du soja (Cederroth et Nef, 2009). En plus de leurs propriétés oestrogéniques, les isoflavones pourraient également affecter la régulation du métabolisme du glucose et des lipides. Des études chez l'homme et le rat suggèrent que les protéines de soya ou les phytoestrogènes dérivés pourraient exercer des effets bénéfiques dans la prévention du diabète et de l'obésité (Bhatena et Velasquez, 2002; Velasquez et Bhatena, 2007). De plus, certaines études ont rapporté que des suppléments de soya ou d'isoflavones, pourraient avoir des effets protecteurs des maladies cardiovasculaires et de la densité minérale osseuse chez la femme ménopausée (Goodman-Gruen et Kritz-Silverstein, 2001; Messina, 2010). Néanmoins, ces hypothèses sont controversées par la présence de plusieurs études qui ne montrent aucun effet du soya ou des isoflavones ou des effets bénéfiques uniquement à des doses élevées d'isoflavones ou d'extrait de soya (Cederroth et Nef, 2009; Sacks et al., 2006). Chez le rat et l'humain, il a été postulé que les isoflavones puissent assurer une protection contre le stress oxydant et les dommages à l'ADN (Kawakami et al., 2004; Mahn et al., 2005; Spadafranca et al., 2008). Finalement, une étude chez des jeunes femmes (24 ans) a mis en évidence que l'ingestion orale de protéines de soya seule avait un effet positif sur la sécrétion de GH. Cet effet n'a pas été observé lorsque la protéine de soya était incluse dans un repas complet (Van vught et al., 2008).

En résumé, ces études suggèrent que les stratégies nutritionnelles, telles qu'une supplémentation en composés antioxydants, exercent des effets bénéfiques dans certains tissus et permettent de contrer les effets délétères du stress oxydant au cours du vieillissement.

## **2. JUSTIFICATION DE L'ÉTUDE**

Au cours du vieillissement, des modifications de l'axe somatotrope mènent à une diminution de la sensibilité des cellules somatotropes au GHRH et ultimement à une diminution de la synthèse et de la sécrétion de GH. Des études antérieures chez le rat, ont mise en évidence des modifications de niveaux d'ARNm du récepteur hypophysaire du GHRH (GHRH-R), une diminution importante d'affinité de liaison du GHRH et de la concentration de GHRH-R fonctionnels (Abribat et al., 1991; Girard et al., 1999). Chez le rat âgé, une augmentation significative des niveaux de glucose et d'acides gras libres sérique est observée (Bédard et al., 2008), suggérant que l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie puisse contribuer au dysfonctionnement du GHRH-R hypophysaire au cours du vieillissement.

À ce jour, la restriction calorique modérée de longue durée (RCMLD) constitue l'intervention nutritionnelle la plus efficace pour prévenir ou retarder les détériorations liées à l'âge. Des effets protecteurs de la RCMLD au niveau des perturbations des paramètres de liaison du GHRH ont été observés chez le rat âgé (Girard et al., 1998). Ainsi, la RCMLD imposée chez le rat mature pourrait prévenir les effets délétères observés sur le GHRH-R chez le rat âgé, et constituer un modèle valable pour étudier les mécanismes associés aux effets bénéfiques de la RCMLD. Les objectifs de la première étude étaient donc d'identifier chez le rat âgé, les effets d'une RCMLD sur la fonction somatotrope, avec une attention particulière sur le GHRH-R hypophysaire et d'identifier les facteurs métaboliques ou hormonaux circulants qui pourraient contribuer à ces effets. Des rats mâles SD de 18-20 mois, soumis à une RCMLD à partir de l'âge de 8 mois, ont donc été comparés à des rats de 20 et 2 mois nourris *ad libitum* (voir manuscrit 3.1).

En plus des effets bénéfiques de la RCMLD observés sur le GHRH-R hypophysaire, d'autres effets pourraient être exercés dans les deux tissus essentiels de l'axe somatotrope, soit l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus. Jusqu'à présent, aucune étude complète de régulation génique portant sur les modifications transcriptomiques qui surviennent au cours du vieillissement et de la RCMLD n'a été rapportée dans ces deux tissus. Ainsi, l'objectif principal de la deuxième étude était de mettre en évidence des gènes qui pourraient être impliqués dans les effets du vieillissement et de la RCMLD chez le rat. Les niveaux d'expression des gènes de l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus de rats âgés de 3 mois nourris *ad libitum* (AL) et de 20 mois, soumis ou non à la RCMLD, ont été quantifiés à

l'aide de la biopuce Affymétrie 230.20 (Manuscrit 3.2). Considérant que le soya et les isoflavones puissent aussi avoir des effets bénéfiques sur la fonction somatotrope, les effets d'une substitution de la caséine pour le soya comme apport protéique ont également été évalués.

Parmi les facteurs métaboliques possiblement impliqués dans les effets délétères du vieillissement sur la fonction somatotrope, l'hyperglycémie et hyperlipidémie, source de gluco- ou lipotoxicité, ont été proposés. Des études antérieures, dans des cellules hypophysaires de rats jeunes exposées à des concentrations élevées de glucose ou d'acide caprylique, ont mis en évidence des effets délétères d'une glucotoxicité (Bédard et al., 2008) et d'une lipotoxicité (Renier et al., 1990) sur le GHRH-R et la sensibilité des somatotropes au GHRH. L'objectif de la troisième étude était de mimer une condition de gluco-lipotoxicité *in vivo*, similaire à celle retrouvée chez le rat âgé ou diabétique, et d'en identifier les effets sur la fonction somatotrope chez le rat (voir manuscrit 3.3). Grâce à une collaboration avec le D<sup>r</sup> Vincent Poitout du Centre de recherche du CHUM, nous avons eu accès à des rats âgés de 2 et 6 mois infusés (iv), en continu durant 72 h, avec une solution de glucose (Glu 70% w/w) et d'Intralipides (Il 20% v/v) ou de salin (0.09%).

Finalement l'augmentation de stress oxydant est reconnue comme étant un processus favorisant le vieillissement et l'atténuation de ce stress est considéré comme un mécanisme important de la RC (Sohal et Weindruch, 1996). Nos études précédentes sur la glucotoxicité *in vitro* avaient mis en évidence une augmentation significative de LPO dans les cultures de cellules d'hypophysaires de rat, en fonction de la concentration et de la durée d'exposition au D-glucose (Bédard et al., 2008). Le stress oxydant pourrait donc contribuer aux altérations de l'axe somatotrope observées au cours du vieillissement. Ainsi, une stratégie de protection par les antioxydants devrait être bénéfique pour contrer ces effets chez le rat âgé (Manuscrit 3.4). Une collaboration a été mise en place avec le Dr W Lutt de l'Université du Manitoba, afin d'avoir accès à des rats âgés de 18 mois, ayant été soumis dès l'âge de 7 semaines, soit à une diète enrichie avec 5% de sucrose dans l'eau ou à une diète supplémentée en antioxydants dans la nourriture sèche (vitamine C (12.5 g/kg PC), vitamine E (1.5 g/kg PC) et S-adénosyl-méthionine (5 g/kg PC) ou une combinaison de ces deux interventions. Une étude comparative avec des rats de 2 et 18 mois soumis à une diète normale a permis

d'évaluer l'effet du vieillissement, du sucrose et des antioxydants sur des gènes importants de l'axe somatotrope (Résultats supplémentaires non-publiés).



### **3. MANUSCRITS**

## MANUSCRIT 3.1

**Titre de l'article:**     **Effects of long-term dietary interventions on pituitary growth hormone-releasing hormone receptor in aging rats and potential mechanisms of action.**

**Auteurs:**           **Karine Bédard\***, Karin Robinette\*, Guylaine Ferland, Pierrette Gaudreau. \* Équivalent à titre de premier auteur.

**Statut :**             Publié le 1<sup>er</sup> février 2010 dans *Mechanism of Ageing and Development*.

### **Contribution :**

La mise au point du protocole et les expériences de production d'AMPC *in vitro* stimulées par le rGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>, de même que l'analyse des résultats ont été réalisées par Karine Bédard. La mise au point du protocole et les expériences de culture des cellules d'hypophyse antérieure et d'incorporation du BrdU dans un environnement glucotoxique ont été effectuées par Karine Bédard. L'interprétation immunocytochimique et la compilation des résultats ont été réalisées par Karine Bédard avec l'aide de Padma Madiraju, stagiaire dans le laboratoire du professeur Gaudreau. Les expériences de buvardage de type Northern du GHRH-R et de protection à la RNase ont été effectuées par Karine Robinette. Les essais de liaison avec le (<sup>125</sup>Tyr<sup>10</sup>)hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub> et l'analyse des résultats ont été effectués par Karine Robinette, étudiante à la maîtrise. Les dosages hormonaux et métaboliques ont été effectués par Daniel Langlois, assistant de recherche au laboratoire. Les analyses statistiques des dosages et de caractéristiques des rats jeunes et âgés ont été réalisées par Karine Bédard. La mise en forme des figures et tableaux du manuscrit a été fait par Karine Bédard. Guylaine Ferland et Pierrette Gaudreau sont responsables de la supervision et de la gestion de la colonie de rats Sprague Dawley âgés, nourrie *ad libitum* ou soumis à interventions nutritionnelles, qui fait partie de l'infrastructure Colonies de rats âgés du Réseau Québécois de Recherche sur le Vieillissement (RQRV). L'ensemble de l'étude a été supervisé par Pierrette Gaudreau. Le manuscrit a été rédigé par Karine Bédard et révisé par Pierrette Gaudreau et Guylaine Ferland.

**Effects of long-term dietary interventions on pituitary growth hormone-releasing hormone receptor in aging rats and potential mechanisms of action**

Karine Bédard,<sup>1†</sup> Karin Robinette,<sup>1†</sup> Guylaine Ferland,<sup>2,3</sup> and Pierrette Gaudreau<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, Centre hospitalier de l'Université de Montréal Research Center (CRCHUM), Montreal, QC, Canada H1W 4A4, <sup>2</sup>Institut universitaire de gériatrie de Montréal Research Center, Montreal, QC, Canada H3W 1W5, and Departments of <sup>3</sup>Nutrition and <sup>4</sup>Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada H3C 3J7. <sup>†</sup>Equal contributors as first author

Correspondence and reprint requests should be addressed to:

Pierrette Gaudreau PhD, Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, CRCHUM, Angus Technopole, Room 311, 2901 Rachel Street East, Montreal, QC, Canada H1W 4A4.

Running title: Nutritional regulation of GHRH receptor in aging

Key words: GHRH receptor, GHRH-induced, anterior pituitary, hypothalamus, caloric restriction, protein intake

**ABSTRACT**

Long-term moderate caloric restriction (LTMCR) is a powerful intervention to delay age-related health deterioration. In this study, the effects of 40% caloric restriction (CR), implemented at 8 months with or without protein restriction, and 40% dietary protein restriction alone, implemented at 2 months, were examined on pituitary growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R) and GHRH sensitivity in 12- to 20-month-old male Sprague Dawley rats. An increase of the 4-kb GHRH-R mRNA transcript and 4 kb/2.5 kb ratio, the blunting of high affinity GHRH binding sites and a decrease in GHRH-induced cAMP production were observed in old rats. Only 40% CR maintained youthful levels of GHRH-R transcripts and GHRH binding parameters as well as maximal GHRH-induced cAMP production. Moreover, the GHRH-induced capacity of somatotrophs to synthesize/repair DNA in vitro, in the presence of moderate glucotoxic stress (12 mM D-glucose), was maintained in old CR rats. Among the hormonal and metabolic regulators of GHRH-R that were modified by LTMCR, glucose, free fatty acids (FFA) and glucocorticoids represent promising candidates for future investigation. A better understanding of the molecular and cellular mechanisms by which they regulate the pituitary GHRH-R should help define strategies to mimic the beneficial effects of LTMCR by less demanding interventions.

## INTRODUCTION

In the anterior pituitary, pulsatile growth hormone (GH) release is mainly governed by the opposite action of hypothalamic GH-releasing hormone (GHRH) and somatostatin (SRIF), with participation of the GH secretagogue ghrelin (Tannenbaum and Ling, 1984; Tannenbaum et al., 2003). GHRH and SRIF respectively stimulate and inhibit GH secretion and synthesis (Barinaga et al., 1985; Brazeau et al., 1973, Sarret et al., 1999), by activating specific G<sub>s</sub> and G<sub>i</sub> protein-coupled receptors (GPCR) (Mayo 1734-44; Yamada et al. 251-55).

The GHRH receptor (GHRH-R) has been cloned in the anterior pituitary of several mammals (Gaylinn et al., 1993; Hashimoto et al., 1995; Horikawa et al., 2001; Hsiung et al., 1993; Lin et al., 1992; Mayo, 1992; Tang et al., 1995) and belongs to the family B GPCR (Mayo, 1992). In the rat pituitary, the predominant form of GHRH-R mRNA transcript has an apparent molecular weight of 2.5 kb. A less abundant 4-kb transcript is also observed (Gaylinn et al., 1993; Hashimoto et al., 1995; Horikawa et al., 2001; Hsiung et al., 1993; Lin et al., 1992; Mayo, 1992; Tang et al., 1995). While the 2.5-kb transcript is translated into the 423 amino acid (aa) functional GHRH-R (Miller et al., 1999), little is known about the 4-kb entity, although its level is elevated in old (Girard et al., 1999) and diabetic male Sprague Dawley rats (Bedard et al., 2008). In the rat and human pituitary, the 423-aa GHRH-R is selectively expressed in somatotrophs (Morel et al., 1999).

In the course of aging, pituitary responsiveness to GHRH decreases and circulating levels of GH as well as insulin-like growth factor-I (IGF-I) diminish. It results in an increased body fat and reduced muscle mass with deterioration of several tissue and organ functions (Deslauriers et al., 1991; Lombardi et al., 2005; Thorner et al., 1997; Yeh et al.,

1994). In aging rats, changes in the abundance of pituitary GHRH-R mRNA transcripts and receptor protein have been identified as important events, participating in the alteration of GHRH responsiveness and somatotroph functionality (Atribat et al., 1991; Gaudreau et al., 1999; Girard et al., 1999; Lefrancois et al., 1995).

Although multiple factors contribute to healthy aging, nutrition is considered as a robust regulator. Long-term moderate caloric restriction (LTMCR) is recognized in several species, including rodents, monkeys (Colman et al., 2008; Mair and Dillin, 2008; Yu, 1994), and possibly humans (Everitt and Le Couteur, 2007; Hofer et al., 2008; Kennedy et al., 2007), as a powerful intervention to prevent or delay age-related deterioration and diseases, consequently extending both mean and maximum lifespan. The beneficial effects of LTMCR have been attributed, in part, to the maintenance of youthful GH secretory patterns (D'Costa et al., 1993) and pituitary GHRH-R binding sites (Girard et al., 1998). In addition to calorie intake, changes in the level of dietary protein intake could also regulate the somatotroph axis in the course of aging. This is postulated on the basis of data showing that short-term reduction of protein intake from 23 to 4% impairs the GHRH-induced GH response in 2-month-old rats (Harel and Tannenbaum, 1993).

The objectives of the present study were therefore to: 1) evaluate the effects of aging and the impact of long-term dietary interventions (long-term moderate protein restriction (LTMPR), LTMCR, and LTMCR without protein restriction) on central and peripheral factors known to regulate GHRH-R and/or somatotroph sensitivity to GHRH, and potentially modifiable by dietary interventions, 2) measure in parallel the effects of aging and dietary interventions on anterior pituitary GHRH-R mRNA transcripts, GHRH binding

site characteristics and GHRH-induced cAMP production, and 3) determine in vitro the potential contribution of a mild glucotoxic environment on the sensitivity of 20-month-old rat pituitary cells to GHRH and the effects of LTMCR.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Animals handling and dietary interventions*

Two-month-old male Sprague Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada) were housed individually in wire-bottom cages, in temperature- (22°C), humidity- (65%) and lighting-controlled (12:12 light-dark cycles: lights on at 07:00 h) rooms. They were fed a semi-synthetic powdered diet prepared according to the Teklad control diet TD89248 (Teklad Test Diets, Madison, WI) (Girard et al., 1998). The effect of two dietary protein levels was studied from 2 months of age until death: 22% in the control ad libitum (AL) diet (AL/22%) and 13.2%, corresponding to a 40% protein restriction (AL/13%) (Fig. 1). At 8 months, the AL/22% group was randomized to three subgroups exhibiting no significant difference in body weight (BW). They were fed one of the following diets until death: 1) AL/22% (control group), 2) 40% CR without protein supplementation (CR), reducing protein intake to 13.2% in comparison to the AL/22% group, and 3) 40% CR using a diet containing 37% vitamin-free casein, to maintain the casein intake level at 22% (CR/22%), as in the control group. In the CR/22% group, sucrose was reduced to maintain identical calorie intake in the two CR groups (Fig. 1). LTMCR was implemented gradually at 8 months (Girard et al., 1998), to avoid interference with the period of rapid growth and to study the benefits of adult-onset LTMCR, on the somatotroph GHRH sensitivity in longer-lived mammals.

The impact of a 40% protein restriction in AL rats (AL/13% vs. AL/22%) was investigated in 12- and 18-month-old rats. The effects of a 40% CR with or without protein restriction (CR vs. CR/22%) was examined in 18-month-old rats only, based on previous results indicating that several endocrine and metabolic effects of aging are seen around this age (Girard et al., 1998) and that benefits of CR on the somatotroph axis occur after long-term interventions (Girard et al., 1999). All rats received equivalent amounts of minerals and vitamins compared with the AL/22% group and had free access to water. BW and food intake were recorded regularly and no significant change was observed in food consumption as a function of protein intake: 12- and 18-month-old AL/22% rats ate  $21.7 \pm 0.2$  and  $22.8 \pm 0.5$  g food/day, while 12- and 18-month-old AL/13% ate  $22.7 \pm 0.2$  and  $23.1 \pm 0.4$  g/day. Subsequent experiments on GHRH-induced cAMP production were performed in 19-month-old AL/22% and CR rats. All rats were killed by rapid decapitation, in a block design fashion, along with 2-month-old AL/22% rats, between 08:30 and 11:30 h after a 6-h fast. Macroscopic evaluation revealed no gross pathology in 12- and 18-19-month-old rats. Twenty-month-old rats (AL/22% and CR) from a subsequent colony, raised in the conditions described above, were used after a 24-h fast to study GHRH-induced DNA synthesis/repair in cultured anterior pituitary cells. The protocol was approved by the Animal Care Committee of the CRCHUM, in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

#### *Tissue handling*

Anterior pituitaries from each group of rats were collected in ice-cold Tris acetate buffer for binding (Girard et al., 1999) or cAMP assays (Veyrat-Durebex et al., 2005) and processed within 30 min. For Northern blotting and RNase protection assays (RPA), anterior



pituitaries, hypothalami and livers were snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until RNA extraction, to quantify GHRH-R and GHRH mRNA levels. Trunk blood was collected and sera were kept at -80°C to assess hormone immunoreactive concentrations as well as glucose and free fatty acid (FFA) concentrations. BW and heart, liver and right kidney wet weights were measured at sacrifice.

*Serum hormone immunoassays and glucose and FFA colorimetric assays*

Serum concentrations of IGF-I (total), free T4, free T3, testosterone and corticosterone were quantified with commercial radioimmunoassay (RIA) kits (Instar Corp., Stillwater, MN; Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, TX; ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA). For each RIA, all samples from each age group were analyzed in duplicate in a single assay. Intra-assay coefficients of variation were 6.2, 6.1, 5.4, 7.3 and 6.6 % and assay sensitivity was 21 ng/mL, 0.08 ng/mL, 0.05 pg/mL, 20 ng/mL, and 0.1 ng/mL, respectively. Serum leptin concentrations were measured by ELISA (ACTIVE<sup>TM</sup> murine leptin ELISA kit, Diagnostic Systems Laboratories, Inc.) and serum insulin was determined by RIA (Linco Research, Inc., St. Charles, MO). Serum glucose levels were assessed by colorimetry (glucose oxidase reaction) using an automated analyzer. Serum FFAs were determined, as reported previously, by methyl red colorimetric assay (Girard et al., 1998). Intra-assay coefficients of variation were 7.3, 5.9, 4.0 and 6.7%, and assay sensitivity was 0.04 ng/mL, 0.1 ng/mL, 0.1 mM and 50 µM, respectively.

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

Total RNA was extracted from each anterior pituitary using TRIzol (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada). Northern blotting was performed, as described

previously, with 12  $\mu\text{g}$  of total RNA samples (Boisvert et al., 2002). GHRH-R mRNA signals were normalized in each lane with those of GAPDH, after assessing the stability of GAPDH mRNA levels in our experimental conditions in comparison with those of 28S rRNA. The results are expressed as percentages of relative density to those of 2-month-old rats. All samples were analyzed in triplicate. The intra-assay coefficient of variation of normalized GHRH-R mRNA signals was  $\leq 10\%$  in all experiments.

*Analysis of GHRH mRNA levels in hypothalamus by RPA*

Total RNA was isolated from each hypothalamus with TRIzol, and GHRH mRNA levels were assessed by RPA, as described previously, for GHRH-R mRNA (Boisvert et al., 2002). A GHRH cDNA probe, corresponding to nucleotides 1-205 of the coding sequence (nucleotide position, 285-490; GenBank accession number M73486), was used. GAPDH mRNA levels were determined using a probe spanning the region of exons 5-8 of rat GAPDH cDNA (nucleotide position 369-685; GenBank accession number NM\_017008). After denaturation at 95°C for 3 min, total RNA from each hypothalamus (2.5  $\mu\text{g}$ ) was hybridized for 16 h at 42°C with 2 pM [<sup>32</sup>P]GHRH and [<sup>32</sup>P]GAPDH riboprobes. An external standard (6.25 pg), originating from in vitro transcription of the sense sequence of GHRH cDNA (nucleotides 285-362), was added to each RNA sample before hybridization. Liver total RNA served as specificity control and assay linearity was verified in each experiment with 1.25 to 5  $\mu\text{g}$  of hypothalamic total RNA from 2-month-old rats. After normalization with internal and external standards, the results were expressed as percentages of relative density to those of 2-month-old rats, with a fixed amount of total RNA. All

samples were analyzed in triplicate. The intra-assay coefficient of variation of normalized mRNA signals was  $\leq 12\%$  in all experiments.

*Analysis of anterior pituitary [ $^{125}\text{I-Tyr}^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub> binding parameters*

Tissue preparation and cold saturation experiments were performed as reported previously (Atribat et al., 1991; Girard et al., 1999; Lefrancois et al., 1995). Each assay point was performed in triplicate, with 50  $\mu\text{L}$  of homogenate (62-89  $\mu\text{g}$  prot. for anterior pituitaries from 2- and 12-month-old and 41-101  $\mu\text{g}$  prot. for pituitaries from 18-month-old rats), 35-50 pM [ $^{125}\text{I-Tyr}^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub> ( $^{125}\text{I-GHRH}$ ; 2,000 Ci/mmol, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) and increasing concentrations of [ $^{127}\text{I-Tyr}^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub> (0-1000 nM). Non-specific binding was determined in the presence of 1.0  $\mu\text{M}$  rat GHRH(1-29)NH<sub>2</sub>. Specific binding was 70, 60 and 62% in homogenates from 2-month-old AL/22%, 12-month-old AL/22% and 12-month-old AL/13% rats, respectively. It was 69% in 18-month-old rats. The intra-assay coefficient of variation was  $\leq 10\%$ . [ $^{127}\text{I-Tyr}^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub> and rat GHRH(1-29)NH<sub>2</sub> were synthesized in our laboratory (Gaudreau et al., 1992). The LIGAND program was used to analyze data from cold saturation curves (Munson and Rodbard, 1980).

*Determination of immunoreactive cAMP levels in anterior pituitary homogenates*

Anterior pituitary homogenates ( $\approx 30$   $\mu\text{g}$  prot./tube) from 2-month-old AL/22%, 19-month-old AL/22% and 19-month-old CR were incubated in 30 mM Tris-acetate, pH 7.4, containing 0.5 mM ATP, 10  $\mu\text{M}$  GTP (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada), 1 mM isobutyl-1-methylxanthine (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada), and an ATP-

regenerating system, as described previously (Veyrat-Durebex et al., 2005). Incubations were carried out at 37°C for 10 min, with increasing concentrations of rGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> (0-1000 nM). Ten μM forskolin was the positive control in each experiment. Immunoreactive cAMP levels were measured in supernatants as described elsewhere (Bedard et al., 2008). Each assay point was performed in triplicate and the intra-assay coefficient of variation was ≤10% in all experiments. Basal and GHRH-stimulated levels of immunoreactive cAMP were expressed in pmol/mg prot./min. GHRH-induced cAMP levels (total - basal level) were reported as percentages of relative levels compared to those obtained in the presence of 1000 nM rGHRH, in pituitary homogenates from 2-month-old AL/22% rats.

*Analysis of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation in cultured anterior pituitary cells*

Anterior pituitary cells from 2-month-old AL/22%, 20-month-old AL/22% and 20-month-old CR rats were isolated by enzymatic digestion, centrifuged (800g, 4 min, 4°C), and washed 3 times in DMEM supplemented with 5 or 12 mM D-glucose (DG), 10% fetal bovine serum, 1% penicillin (50 U/ml)/streptomycin (1.25 μg/ml; Invitrogen Canada Inc.), and 0.1% amphotericin (Sigma-Aldrich Canada). They were cultured for 24 h on sterile glass coverslips in 24-well plates, at a density of 1.5 X 10<sup>5</sup> cells/well, in 0.5 ml culture medium, containing 5 or 12 mM DG, mimicking normoglycemic and hyperglycemic states. The cells were subsequently incubated for 16 h with 100 nM rGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> in DMEM-0.2% BSA medium or the vehicle alone, in the presence of 10 μM BrdU. 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Molecular Probes, Invitrogen Canada Inc.) was added for the last 15 min of incubation. The cells were then fixed in 70% ETOH at -20°C for 20 min, washed in PBS 1X (2 times, 5 min, room temperature (RT)) and incubated in PBS-1X-

5% BSA buffer (30 min, RT). BrdU-positive cells were detected using the fluorescein immunodetection kit 1 from Roche Diagnostics, according to the manufacturer's recommendations. They were visualized with an Olympus LX71 inverted fluorescence microscope (10 and 20 X objectives) equipped with an Evolution VF fast camera (Media Cybernetics, Bethesda, MD). For each group (4 rats/group), the results from 4 coverslips/group and from 4 random fields/coverslip were examined ( $\approx 900$  cells/rat group and incubation condition). These results are expressed as percentages of GHRH-induced BrdU-positive cells (i.e. minus basal level) in 5 and 12 mM DG.

#### *Statistical analysis*

The results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistically significant differences were determined by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test or unpaired Student's t test and established at  $p < 0.05$ . Results were analyzed to examine: 1) the effect of aging by comparing aging AL/22% with young AL/22% rats); 2) the of LTMCR by comparing a) old CR rats with old AL/22% rats, and b) old CR with young AL/22%; 3) the impact of a 40% protein restriction by comparing aging AL/22% rats with age-matched AL/13%; and 4) the effect of protein supplementation maintaining 22% daily protein intake, by comparing old CR rats with age-matched CR/22%. Additional significant differences between groups are reported in Tables or Figure legends but not described in the result section.

## RESULTS

### *Characteristics of young and old rats*

The BW of 12-month-old AL/22% rats was 2.5 times higher than that of 2-month-old AL/22% ( $p < 0.001$ ) (Table 1), and their heart, liver and kidney wet weights were 1.7-2.1 times higher ( $p < 0.001$ ; Table 1). Ten months of a 40% protein restriction (AL/13%) had no significant effect on these parameters.

The BW of 18-month-old AL/22% was 2.9 times higher than that of the 2-month-old AL/22% group ( $p < 0.001$ ) while that of 18-month-old CR rats was only 1.5 times higher than that of 2-month-old rats ( $p < 0.001$ ), but 1.9 times lower than that of the 18-month-old AL/22% group ( $p < 0.001$ ) (Table 1). The organ wet weights of 18-month-old AL/22% rats were 1.8-2.3 times higher than those of 2-month-old AL/22% rats ( $p < 0.001$ ) while those of CR rats were not significantly different (heart, liver) or only 1.5 times higher (kidney) ( $p < 0.001$ ). Varying protein intake levels in AL or CR rats had no additional influence on BW and organ wet weight (Table 1).

### *Effects of age and dietary intakes on serum hormone, FFA and glucose concentrations*

In 12-month-old AL/22% rats, serum total IGF-1 ( $p < 0.001$ ), free T4 ( $p < 0.001$ ) and testosterone levels were 1.5-2.7 times lower ( $p < 0.05$ ) and insulin ( $p < 0.001$ ), FFA ( $p < 0.01$ ) and glucose ( $p < 0.001$ ) concentrations were 1.8-2.4 times higher than those of young AL/22% rats. A 40% decrease of protein intake in ad libitum-fed rats (AL/13%) had no impact on these parameters except for free T4 levels (1.2 times lower,  $p < 0.05$ ) (Table 2A).

As shown in Table 2B, several changes were observed in the serum of 18-month-old AL/22% rats, resulting from aging and/or long-term dietary interventions. Serum leptin

concentration was 95 times higher in 18-month-old AL/22% rats compared with 2-month-old rats ( $p < 0.001$ ). This rise was prevented by LTMCR while the level of dietary protein did not influence serum leptin in old AL and CR rats. IGF-I was 1.3 times lower ( $p < 0.05$ ) in 18-month-old AL/22% rats compared with 2-month-old rats. No significant effect of a 40% decrease in protein intake was seen in old rats (AL/13%). LTMCR induced an additional effect on IGF-I concentration (2.3 and 1.7 times lower than in 2- and 18-month-old AL/22% rats;  $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively). Free T4 concentration was 1.5-fold lower in 18-month-old AL/22% rats than in 2-month-old rats ( $p < 0.001$ ). This age effect was not modulated by any of the dietary interventions studied. Free T3 concentration did not decline with age, but LTMCR induced a 2.1 ( $p < 0.01$ ) and 2.6 times decrease ( $p < 0.001$ ) in comparison with 18- and 2-month-old AL/22% rats, respectively. Modulating protein intake in AL or CR rats had no influence on these hormones. Testosterone concentration was 6.4 times lower in 18-month-old AL/22% rats than in 2-month-old rats AL/22% ( $p < 0.001$ ), and no dietary modulation was observed. Corticosterone concentration did not change in 18-month-old AL/22% rats compared with 2-month-old AL/22% rats. It increased 3.6-5.2 times in 18-month-old CR rats vs. old and young AL/22% rats ( $p < 0.01$  to 0.001).

Insulin concentration was 2.3 times higher in 18-month-old AL/22% compared with 2-month-old AL/22% rats ( $p < 0.001$ ). LTMCR allowed maintaining insulin levels to those seen in 2-month-old rats ( $p < 0.001$ ), while varying the level of protein intake had no effect. FFA concentration was 2 times higher in 18-month-old AL/22% rats compared with 2-month-old rats ( $p < 0.01$ ). LTMCR prevented the age-related increase of FFA ( $p < 0.05$ ) and changes in the level of protein intake neither modulate the age nor the CR effect. Finally, glucose concentration was 1.7 higher in 18-month-old AL/22% rats compared with 2-month-old rats ( $p < 0.05$ ) and was significantly increased in AL/13% old rats compared with

AL/22% ( $p < 0.05$ ). LTMCR significantly reduced these increases by 1.3-1.5-fold ( $p < 0.001$ ) but this beneficial effect was not maintained in 18-month-old CR/22% rats.

*Effects of age and dietary intakes on anterior pituitary GHRH-R mRNA transcript levels*

The 2.5- and 4-kb transcripts were present in the anterior pituitary of young and old rats, as reported previously (Bedard et al., 2008; Boisvert et al., 2002; Girard et al., 1999). In 12-month-old AL/22% rats, both transcript levels and the 4/2.5-kb ratio were higher than in 2-month-old AL/22% rats (1.5-2.1 times;  $p < 0.05-0.001$ ). A 40% protein restriction had no impact on the age effect (Fig. 2 A-D). In 2- and 18-month-old AL/22% rats, the 2.5-kb transcript level was not different. It was 1.7 times higher ( $p < 0.01$ ) in the pituitary of 18-month-old CR rats compared with these groups. The 4-kb transcript was 3 times higher in 18-month-old AL/22% rats than in 2-month-old AL/22% rats ( $p < 0.001$ ) and 2.4 times lower in the pituitary of 18-month-old CR compared with that of 18-month-old AL/22% rats ( $p < 0.001$ ). A 40% protein increase in CR rats (CR/22%) abolished the beneficial effect of CR. The 4 kb/2.5-kb ratio was regulated in a manner similar to the 4-kb transcript, and only CR allowed the maintenance of a transcript ratio comparable to that observed in 2-month-old rats (Fig. 2 A-D).

*Effects of age and dietary intakes on anterior pituitary [ $^{127}\text{I-Tyr}^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub> binding parameters*

Co-analysis of binding data, derived from cold saturation studies, revealed the presence of high and low affinity classes of GHRH binding sites in the anterior pituitary of 2-month-old rats, as reported before (Aribat et al., 1991; Girard et al., 1999). In the



pituitary of 12-month-old AL/22% rats, a single class of GHRH binding sites was found, exhibiting a 47 times lower affinity ( $p < 0.05$ ) than  $K_{d1}$  and 75 times higher apparent binding capacity than  $B_{max1}$  ( $p < 0.05$ ) from 2-month-old rats. These parameters were not modulated by a 40% decrease in protein intake (AL/13%) (Table 3A).

In 18-month-old al/22% (fig. 3, table 3B), a single class of binding sites was detected, exhibiting a 23 times lower  $K_d$  ( $p < 0.05$ ) than  $K_{d1}$  and 31 times higher  $B_{max}$  than  $B_{max1}$  ( $p < 0.05$ ) from 2-month-old rats. A 40% reduction in protein intake level had no influence on binding parameters (al/13%). LTMCR had a beneficial impact on GHRH binding parameters, preventing the deleterious effects of aging. This effect was not maintained in 18-month-old cr/22% rats.

#### *Effects of age and LTMCR on anterior pituitary basal and GHRH-induced cAMP levels*

Basal (28-47 pmol/min/mg prot. range) and forskolin-induced cAMP levels (126-153 pmol/min/mg prot. range) were not regulated by aging or LTMCR (data not shown). In the pituitary of 19-month-old AL/22%, the GHRH-induced cAMP response was substantially decreased at all concentrations tested (Fig. 4;  $p < 0.05-0.001$ ) and the maximal response was 1.9-fold lower than that of young rats. In contrast, the maximal GHRH-induced cAMP response elicited by 1000 nM rGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> remained unchanged in the pituitary of 19-month-old CR rats compared with that of young rats. The EC<sub>50</sub> of rGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> was reduced by 20-fold ( $300 \pm 18$  vs.  $15.0 \pm 0.1$  nM;  $p < 0.001$ ) in the pituitary of old rats, but not affected by LTMCR.

*Effects of age and dietary intakes on hypothalamic GHRH mRNA levels*

In 18-month-old rats, hypothalamic GHRH mRNA levels were not altered by aging or a 40% decrease of protein intake (AL/13%) (Fig. 5A and 5B). They were 1.4 times lower ( $p < 0.05$ ) in 18-month-old CR rats than in 2-month-old rats and normalized when protein intake was restored to 22% (CR/22%).

*Effects of aging and LTMCR on BrdU incorporation in cultured anterior pituitary cells stimulated with GHRH: influence of in vitro glucose environment*

In this experiment, 20-month-old AL/22% and CR rats were fasted for 24 h to normalize their serum glucose levels ( $5.69 \pm 0.46$ ,  $5.75 \pm 0.60$  and  $5.65 \pm 0.44$  mM in 2-month-old AL/22%, 20-month-old AL/22% and 20-month-old CR, respectively). Under such a condition, serum insulin was low but remained 1.7-1.9 times higher in 20-month-old AL/22% rats ( $2.10 \pm 0.20$  ng/mL) compared with 20-month-old CR ( $1.2 \pm 0.10$  ng/mL) and 2-month-old AL/22% ( $1.1 \pm 0.10$  ng/mL) ( $p < 0.001$ ). Serum leptin was 11.7-17.7 times higher in 20-month-old AL/22% rats ( $54.8 \pm 10.1$  ng/mL) than in 20-month-old CR ( $3.1 \pm 0.4$  ng/mL) and 2-month-old AL/22% ( $4.7 \pm 1.3$  ng/mL) ( $p < 0.001$ ). Insulin and leptin levels were similarly regulated by age and LTMCR in both colonies.

The capacity of anterior pituitary cells from these rats to respond to GHRH was assessed by measuring BrdU incorporation (Fig. 6), a well-known indicator of cell proliferation. Effects of a normal DG (5 mM) vs. hyperglycemic (12 mM) in vitro environment were examined. Basal BrdU incorporation was unchanged between the three groups when 5 or 12 mM DG was used in culture medium (data not shown). GHRH-induced BrdU incorporation was similar between the three groups of rats when the cells were

exposed to 5 mM DG (2-month-old AL/22%: 3.5%; 20-month-old AL/22%: 3.6%; 20-month-old CR: 3.0%). However, in the presence of a glucotoxic environment, such as 12 mM DG in culture media, GHRH-induced BrdU incorporation increased 3.0-3.4-fold ( $p < 0.001$ ) in cells from 2-month-old AL/22% and 20-month-old CR rats compared with those from 20-month-old AL/22% rats.

## **DISCUSSION**

We have reported previously that LTMCR implemented in 8-month-old male rats protects anterior pituitary GHRH binding sites from age-related alterations (Girard et al., 1998). In the present study, we measured hypothalamic GHRH mRNA levels and circulating concentrations of several hormonal and metabolic parameters, potentially regulating the expression of functional GHRH-R and/or GHRH sensitivity and being modified by aging and dietary interventions. In parallel, we analyzed the effects of LTMCR and LTMCR, with or without 40% protein supplementation, on anterior pituitary GHRH-R mRNA transcripts, GHRH binding site characteristics and GHRH-induced cAMP production.

We observed that aging led to a significant increase in BW and organ weight as well as serum leptin concentrations, a valuable index of body fat mass. LTMCR implemented in mature rats, without or with protein supplementation, allowed these parameters to be maintained at the level of younger animals. This was not mimicked by varying the dietary protein intake alone by 40%, indicating that a decrease in total energy intake is required to obtain the optimal benefits of LTMCR. Moreover circulating levels of IGF-1, free T4 and testosterone decreased with age while those of corticosterone, insulin, glucose and FFAs

increased. Since several of them were modulated by LTMCR, they could be involved in mechanisms by which GHRH-R nutritional regulation is operating in aging.

In the anterior pituitary of 12-month-old AL/22% rats, the two GHRH-R mRNA transcripts and the 4/2.5-kb ratio were increased. In 18-month-old AL/22% rats, the 2.5-kb transcript appear to be decreased in comparison with 12-month-old AL/22%, while the 4-kb transcript and the 4/2.5-kb ratio remained elevated, as previously reported (Gaudreau et al., 1999). These changes were associated with a blunting of high affinity GHRH binding sites known to mediate the physiological responses of GHRH (Mayo, 1992), and a decline of GHRH-induced cAMP production. LTMCR prevented these deleterious effects (GHRH-R transcripts, GHRH binding sites, GHRH-induced maximal cAMP production), and neither LTMPR alone nor CR with 40% protein supplementation could prevent GHRH-R alterations. Frutos et al. (2007) and Shimokawa et al. (2000) have reported diminutions of both GHRH-R mRNA transcripts and decreases in GHRH-R mRNA levels, respectively, in the pituitary of 24-month-old male Wistar rats compared with 3-month-old animals. In previous studies, we observed a decrease of the 2.5-kb GHRH-R mRNA transcript together with an increase of the 4-kb and the 4/2.5-kb ratio in the pituitary of 18-month-old Sprague Dawley rats compared with 2-month-old animals (Gaudreau et al., 1999; Girard et al., 1999). In the present colony, our results suggest that a more significant decline of 2.5-kb transcript levels might have required older rats. The present data resemble the regulation of GHRH-R transcripts in the pituitary of diabetic rats, 21 and 60 days post-streptozotocin administration, indicating that glucotoxicity-induced oxidative stress may play a role in GHRH-R dysregulation in the course of aging (Bedard et al., 2008).

Shimokawa et al. (2000) could not demonstrate an effect of CR on pituitary GHRH-R mRNA levels (semi-quantitative RT-PCR) in 24-month-old Wistar rats subjected to a 30% equivalent CR (ad libitum standard chow on alternate days, 3 days per week) since the age of 6 weeks. These discrepancies could be related to the CR model used, the age of the rats or the method of quantifying GHRH-R mRNA levels. Since the effect of LTMCR on GHRH binding site characteristics from two independent colonies has consistently been significant (Girard et al., 1998), it could be proposed that CR has a beneficial effect on the maintenance of somatotroph functionality in aging rats.

To identify elements of the complex mechanism by which GHRH-R nutritional regulation is operating in aging, several hormonal and metabolic parameters were analyzed. GHRH, known to regulate the level of its own receptor *in vitro* (Horikawa et al., 1996) and *in vivo* (Girard et al., 1999), could participate in the maintenance of GHRH-R functionality in aging CR rats. A 72-h fasting has been shown to lower hypothalamic GHRH mRNA levels to 20% in young rats (Bruno et al., 1990). Re-feeding with a standard diet normalized them, whereas re-feeding with a diet devoid of protein had no beneficial effect (Bruno et al., 1993). In old rats, hypothalamic GHRH mRNA levels did not vary as a function of aging or a 40% change in protein intake. A combined decrease in energy and protein intake, such as in LTMCR, reduced them to 70%. Restoration of protein intake to 22% equivalent normalized hypothalamic GHRH mRNA levels in old CR rats. LTMCR may positively regulate GHRH mRNA translation and stimulate the *de novo* synthesis of functional pituitary GHRH-R. Alternatively, GHRH mRNA levels could reflect hypothalamic peptide content and may not, therefore, represent a major element of pituitary GHRH-R regulation in LTMCR.

Circulating levels of total IGF-I were decreased in aged rats (Girard et al., 1998; Girard et al., 1999), and LTMCR did not have a beneficial effect, as reported previously (Girard et al., 1999). Circulating levels of IGF-I-binding proteins, particularly IGF-binding protein 3, the most abundant form in the peripheral circulation, could increase with age, be normalized by LTMCR, and raise the concentrations of free IGF-I (preliminary unpublished results). However, an increase of circulating free IGF-1 could not explain the regulatory effects of LTMCR on the pituitary GHRH-R since it has been reported that IGF-I decreased GHRH-R mRNA levels in cultured adult rat pituitary cells (Kamegai et al., 1998; Sugihara et al., 1999) and did not modulate hypothalamic GHRH mRNA levels (Kamegai et al., 1998).

Circulating thyroid and steroid hormones are known to control pituitary GHRH-R gene expression. Thyroid hormones are important positive regulators of GHRH-R mRNA in young rats (Boulanger et al., 1999; Tam et al., 1996). Moreover, a T3 response element is present in the promoter region of the rat GHRH-R gene (Nogami et al., 2002). Free T4 was decreased in the various groups of old rats, while free T3 was diminished by LTMCR, indicating that they are not likely key regulators of GHRH-R levels in our animal model. Sex hormones have also been shown to affect GHRH-R mRNA levels. CR has been reported to protect male gonadal functions, by preventing a decrease of tissue testosterone and estrogen, and a decline of aromatase and estrogen receptor mRNA levels (Hamden et al., 2008). However, only a negative response element has been identified for estrogens on the GHRH-R gene promoter (Lam et al., 1996) and no response element has been found for testosterone. Since LTMCR, with or without 40% protein supplementation, did not restore

testosterone levels in old rats, it can not be proposed as a regulator of pituitary GHRH-R levels. Finally, since glucocorticoids positively regulate GHRH-R (Lam et al., 1996; Miller and Mayo, 1997; Seifert et al., 1985), a sustained increase in their circulating levels, as found in CR rats, could contribute to increase the number of functional GHRH-R (Gursoy et al., 2001; Zhu et al., 1997).

Circulating levels of insulin were elevated in aged AL/22% and AL/13% rats, while they were normalized to those in young rats by LTMCR. Luque and Kineman (2006) have shown that cultured anterior pituitary cells from young C57BL/6J male mice exhibit a decrease in pituitary GHRH-R mRNA levels after 24-h insulin exposure (0-50 nM; control value 0 nM). However, our results in 2-month-old rat anterior pituitary cultured cells indicate that physiological (0.3 and 1.0 nM) or supra-physiological (5 nM) concentrations of insulin does not significantly regulate GHRH-R and GH mRNA levels (Fig. S1). Alternatively, since circulating levels of insulin were taken after a 6-h fast, overall daily output may not have been fully appreciated.

Finally, an increase of circulating FFA and/or glucose concentrations in aging, leading to an increase of oxidative stress, could participate in GHRH-R dysfunction, and LTMCR might be protective (Bedard et al., 2008). FFAs, such as caprylic acid, have been found to decrease the binding affinity of rGRF(1-29)NH<sub>2</sub> in anterior pituitary homogenates of young rats, but not at the concentration measured in old AL/22% rats (Renier et al., 1990). Alternatively, in vitro glucotoxicity has been shown to directly regulate rat pituitary GHRH-R expression and reduce GHRH-R internalization and the GHRH-induced cAMP response (Bedard et al., 2008). In the present study, LTMCR significantly lowered FFA and glucose levels compared with ad libitum-fed rats. Therefore, CR may protect pituitary

GHRH-R from age-related deterioration, at least in part, by mechanisms involving the normalization of biochemical parameters with pro-oxidant properties and/or potentiating cellular antioxidant defenses (Martin et al., 2007).

To further explore the hypothesis of glucotoxicity, the effects of aging and LTMCR were studied on the ability of GHRH to induce DNA synthesis and/or repair as well as cell proliferation in cultured anterior pituitary cells. After a 24-h fast, to reduce serum glucose levels in 20-month-old AL/22% rats to that in young rats, anterior pituitary cells from young, 20-month-old AL/22% and 20-month-old CR rats did not respond differently to GHRH, when cultured in a physiological glucose environment (5 mM DG). This result suggests that similar levels of somatotroph proliferation can be obtained with GHRH in a normoglycemic environment, independently of age or nutritional effects. Alternatively, old cells from AL/22% rats may recover their sensitivity to GHRH, when exposed to a physiological environment for at least 40 h. This interpretation is in agreement with previous findings showing that exposure of rat anterior pituitary cells to 6 mM DG reverts the negative effect of 22 mM DG on GHRH-induced GH secretion (Renier and Serri, 1991). Interestingly, when 12 mM DG was imposed as stressor, anterior pituitary cells from 20-month-old AL/22% rats did not respond to GHRH in comparison with those of young AL and aged CR rats, suggesting that the aging somatotroph machinery cannot cope with moderate glucotoxic stress. As BrdU labeling likely also reflected different levels of DNA repair in the various groups studied, this issue will have to be directly addressed in the future.



In conclusion, the present findings indicate that 40% long-term CR, as opposed to 40% long-term CR without protein restriction or 40% LTMPR alone, represents the best maneuver to delay the aging of anterior pituitary GHRH-R and somatotroph functionality in rats. Among the metabolic and hormonal regulators of GHRH-R that were modified by LTMCR, glucose, FFAs and glucocorticoids represent promising candidates for future investigation. A better understanding of the molecular and cellular mechanisms by which they regulate the pituitary GHRH-R should help define strategies to mimic the effects of CR by less demanding nutritional, hormonal or pharmacological interventions.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful to Dr. K.E. Mayo (Department of Biochemistry, Molecular Biology and Cell Biology, Northwestern University, Evanston, IL) for providing us with rGHRH-R and GHRH cDNAs. We thank Ms. Padma Madiraju for her expert assistance in cell culture and immunocytochemistry.

This work was supported by the Dairy Farmers of Canada, the Canadian Institutes of Health Research and the Quebec Network for Research on Aging. KB is the recipient of a doctoral studentship from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and KR was recipient of a master studentship from the FRSQ.

## **DISCLOSURE STATEMENT**

None of the authors have actual or potential conflicts of interest, including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the research work submitted that inappropriately influenced this work.

**REFERENCES**

- Abribat, T., Deslauriers, N., Brazeau, P., and Gaudreau, P., 1991. Alterations of pituitary growth hormone-releasing factor binding sites in aging rats. *Endocrinology* 128, 633-635.
- Barinaga, M., Bilezikjian, L. M., Vale, W. W., Rosenfeld, M. G., and Evans, R. M., 1985. Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314, 279-281.
- Bedard, K., Strecko, J., Theriault, K., Bedard, J., Veyrat-Durebex, C., and Gaudreau, P., 2008. Effects of a high-glucose environment on the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor: type 1 diabetes compared with in vitro glucotoxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, E740-E751.
- Boisvert, C., Pare, C., Veyrat-Durebex, C., Robert, A., Dubuisson, S., Morel, G., and Gaudreau, P., 2002. Localization and regulation of a functional GHRH receptor in the rat renal medulla. *Endocrinology* 143, 1475-1484.
- Boulanger, L., Andersen, P. H., and Gaudreau, P., 1999. Development of a site-directed polyclonal antibody against the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its use to estimate GHRH receptor concentration in normal and hypothyroid rats. *Neuroendocrinology* 70, 117-127.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., and Guillemin, R., 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179, 77-79.
- Bruno, J. F., Olchovsky, D., White, J. D., Leidy, J. W., Song, J., and Berelowitz, M., 1990. Influence of food deprivation in the rat on hypothalamic expression of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 127, 2111-2116.
- Bruno, J. F., Song, J., Xu, Y., and 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.
- Colman, R. J., Beasley, T. M., Allison, D. B., and Weindruch, R., 2008. Attenuation of sarcopenia by dietary restriction in rhesus monkeys. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63, 556-559.

- D'Costa, A. P., Ingram, R. L., Lenham, J. E., and Sonntag, W. E., 1993. The regulation and mechanisms of action of growth hormone and insulin-like growth factor 1 during normal ageing. *J Reprod Fertil Suppl* 46, 87-98.
- Deslauriers, N., Gaudreau, P., Abribat, T., Renier, G., Petitcherc, 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.
- Everitt, A. V. and Le Couteur, D. G., 2007. Life extension by calorie restriction in humans. *Ann N Y Acad Sci* 1114, 428-433.
- Frutos, MG., Cacicedo, L., Mendez, C. F., Vicent, D., Gonzalez, M., and Sanchez-Franco, F., 2007. Pituitary alterations involved in the decline of growth hormone gene expression in the pituitary of aging rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62, 585-597.
- Gaudreau, P., Boulanger, L., and 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.
- Gaudreau P., Boulanger L., Morel G., 1999. Axe somatotrope et vieillissement: importance du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance. *Méd Sci* 15, VII-IX.
- Gaylinn, B. D., Harrison, J. K., Zysk, J. R., Lyons, C. E., Lynch, K. R., and Thorner, M. O., 1993. Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 7, 77-84.
- Girard, N., Boulanger, L., Denis, S., and Gaudreau, P., 1999. Differential in vivo regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor by GHRH in young and aged rats. *Endocrinology* 140, 2836-2842.
- Girard, N., Ferland, G., Boulanger, L., and Gaudreau, P., 1998. Long-term calorie restriction protects rat pituitary growth hormone-releasing hormone binding sites from age-related alterations. *Neuroendocrinology* 68, 21-29.
- Gursoy, E., Cardounel, A., Hu, Y., and Kalimi, M., 2001. Biological effects of long-term caloric restriction: adaptation with simultaneous administration of caloric stress plus repeated immobilization stress in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 97-102.

- Hamden, K., Silandre, D., Delalande, C., Elfeki, A., Carreau, S., 2008. Protective effects of estrogens and caloric restriction during aging on various rat testis parameters. *Asian J Androl* 10, 837-845.
- Harel, Z. and Tannenbaum, G. S., 1993. Dietary protein restriction impairs both spontaneous and growth hormone-releasing factor-stimulated growth hormone release in the rat. *Endocrinology* 133, 1035-1043.
- Hashimoto, K., Koga, M., Motomura, T., Kasayama, S., Kouhara, H., Ohnishi, T., Arita, N., Hayakawa, T., Sato, B., and Kishimoto, T., 1995. Identification of alternatively spliced messenger ribonucleic acid encoding truncated growth hormone-releasing hormone receptor in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 2933-2939.
- Hofer, T., Fontana, L., Anton, S. D., Weiss, E. P., Villareal, D., Malayappan, B., and Leeuwenburgh, C., 2008. Long-term effects of caloric restriction or exercise on DNA and RNA oxidation levels in white blood cells and urine in humans. *Rejuvenation Res* 11, 793-799.
- Horikawa, R., Gaylinn, B. D., Lyons, C. E., Jr., and Thorner, M. O., 2001. Molecular cloning of ovine and bovine growth hormone-releasing hormone receptors: the ovine receptor is C-terminally truncated. *Endocrinology* 142, 2660-2668.
- Horikawa, R., Hellmann, P., Cella, S. G., Torsello, A., Day, R. N., Muller, E. E., and Thorner, M. O., 1996. Growth hormone-releasing factor (GRF) regulates expression of its own receptor. *Endocrinology* 137, 2642-2645.
- Hsiung, H. M., Smith, D. P., Zhang, X. Y., Bennett, T., Rosteck, P. R., Jr., and Lai, M. H., 1993. Structure and functional expression of a complementary DNA for porcine growth hormone-releasing hormone receptor. *Neuropeptides* 25, 1-10.
- Kamegai, J., Unterman, T. G., Frohman, L. A., and Kineman, R. D., 1998. Hypothalamic/pituitary-axis of the spontaneous dwarf rat: autocrine regulation of growth hormone (GH) includes suppression of GH releasing-hormone receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 139, 3554-3560.
- Kennedy, B. K., Steffen, K. K., and Kaeberlein, M., 2007. Ruminations on dietary restriction and aging. *Cell Mol Life Sci* 64, 1323-1328.

- Lam, K. S., Lee, M. F., Tam, S. P., and Srivastava, G., 1996. Gene expression of the receptor for growth-hormone-releasing hormone is physiologically regulated by glucocorticoids and estrogen. *Neuroendocrinology* 63, 475-480.
- Lefrancois, L., Boulanger, L., and 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.
- Lin, C., Lin, S. C., Chang, C. P., and Rosenfeld, M. G., 1992. Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360, 765-768.
- Lombardi, G., Tauchmanova, L., Di Somma, C., Musella, T., Rota, F., Savanelli, M. C., and Colao, A., 2005. Somatopause: dimetabolic and bone effects. *J Endocrinol Invest* 28, 36-42.
- Luque, R. M. and Kineman, R. D., 2006. Impact of obesity on the growth hormone axis: evidence for a direct inhibitory effect of hyperinsulinemia on pituitary function. *Endocrinology* 147, 2754-2763.
- Mair, W. and Dillin, A., 2008. Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annu Rev Biochem* 77, 727-754.
- Martin, B., Golden, E., Egan, J. M., Mattson, M. P., and Maudsley, S., 2007. Reduced energy intake: the secret to a long and healthy life? *IBS J Sci* 2, 35-39.
- Mayo, K. E., 1992. Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 6, 1734-1744.
- Miller, T. L. and Mayo, K. E., 1997. Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 138, 2458-2465.
- Miller, T. L., Godfrey, P. A., Dealmeida, V. I., and Mayo, K. E., 1999. The rat growth hormone-releasing hormone receptor gene: structure, regulation, and generation of receptor isoforms with different signaling properties. *Endocrinology* 140, 4152-4165.
- Morel, G., Gallego, R., Boulanger, L., Pintos, E., Garcia-Caballero, T., and Gaudreau, P., 1999. Restricted presence of the growth hormone-releasing hormone receptor to somatotropes in rat and human pituitaries. *Neuroendocrinology* 70, 128-136.

- Munson, P. J. and Rodbard, D., 1980. Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 107, 220-239.
- Nogami, H., Hiraoka, Y., Matsubara, M., Nonobe, E., Harigaya, T., Katayama, M., Hemmi, N., Kobayashi, S., Mogi, K., Aiso, S., Kawamura, K., and Hisano, S., 2002. A composite hormone response element regulates transcription of the rat GHRH receptor gene. *Endocrinology* 143, 1318-1326.
- Renier, G., Aribat, T., Brazeau, P., Deslauriers, N., and Gaudreau, P., 1990. Cellular mechanism of caprylic acid-induced growth hormone suppression. *Metabolism* 39, 1108-1112.
- Renier, G. and Serri, O., 1991. Effects of acute and prolonged glucose excess on growth hormone release by cultured rat anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 54, 521-525.
- Sarret, P., Nouel, D., Dal Farra, C., Vincent, J. P., Beaudet, A., and Mazella, J., 1999. Receptor-mediated internalization is critical for the inhibition of the expression of growth hormone by somatostatin in the pituitary cell line AtT-20. *J Biol Chem* 274, 19294-19300.
- Seifert, H., Perrin, M., Rivier, J., and Vale, W., 1985. Growth hormone-releasing factor binding sites in rat anterior pituitary membrane homogenates: modulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 117, 424-426.
- Shimokawa, I., Yanagihara, K., Higami, Y., Okimoto, T., Tomita, M., Ikeda, T., and Lee, S., 2000. Effects of aging and dietary restriction on mRNA levels of receptors for growth hormone-releasing hormone and somatostatin in the rat pituitary. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55, B274-B279.
- Sugihara, H., Emoto, N., Tamura, H., Kamegai, J., Shibasaki, T., Minami, S., and Wakabayashi, I., 1999. Effect of insulin-like growth factor-I on growth hormone-releasing factor receptor expression in primary rat anterior pituitary cell culture. *Neurosci Lett* 276, 87-90.
- Tam, S. P., Lam, K. S., and Srivastava, G., 1996. Gene expression of hypothalamic somatostatin, growth hormone releasing factor, and their pituitary receptors in hypothyroidism. *Endocrinology* 137, 418-424.

- Tang, J., Lagace, G., Castagne, J., and Collu, R., 1995. Identification of human growth hormone-releasing hormone receptor splicing variants. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 2381-2387.
- Tannenbaum, G. S., Epelbaum, J., and Bowers, C. Y., 2003. Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 144, 967-974.
- Tannenbaum, G. S. and 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.
- Thorner, M. O., Chapman, I. M., Gaylinn, B. D., Pezzoli, S. S., and Hartman, M. L., 1997. Growth hormone-releasing hormone and growth hormone-releasing peptide as therapeutic agents to enhance growth hormone secretion in disease and aging. *Rec Prog Horm Res* 52, 215-244.
- Veyrat-Durebex, C., Pomerleau, L., Langlois, D., and Gaudreau, P., 2005. Internalization and trafficking of the human and rat growth hormone-releasing hormone receptor. *J Cell Physiol* 203, 335-344.
- Yamada, Y., Post, S. R., Wang, K., Tager, H. S., Bell, G. I., and Seino, S., 1992. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 251-255.
- Yeh, J. K., Aloia, J. F., Chen, M., and Sprintz, S., 1994. Effect of growth hormone administration and treadmill exercise on the body composition of rats. *J Appl Physiol* 77, 23-29.
- Yu, B. P., 1994. How diet influences the aging process of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 205, 97-105.
- Zhu, Z., Haegele, A. D., and Thompson, H. J., 1997. Effect of caloric restriction on pre-malignant and malignant stages of mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18, 1007-1012.



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

Group	BW (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidney (g)
2-month-old AL/22%	309 ± 12	1.14 ± 0.06	11.9 ± 0.4	1.05 ± 0.03
12-month-old AL/22%	779 ± 22 <sup>a</sup>	1.94 ± 0.06 <sup>a</sup>	24.7 ± 1.3 <sup>a</sup>	1.87 ± 0.05 <sup>a</sup>
12-month-old AL/13%	747 ± 26 <sup>a</sup>	2.01 ± 0.10 <sup>a</sup>	24.4 ± 1.3 <sup>a</sup>	1.77 ± 0.05 <sup>a</sup>
2-month-old AL/22%	317 ± 10	1.15 ± 0.04	12.71 ± 0.30	1.13 ± 0.09
18-month-old AL/22%	917 ± 25 <sup>a, b, c</sup>	2.05 ± 0.13 <sup>a, d, e</sup>	28.75 ± 2.07 <sup>a, b, c</sup>	2.34 ± 0.07 <sup>a, b, c</sup>
18-month-old AL/13%	915 ± 37 <sup>a, b, c</sup>	1.82 ± 0.05 <sup>f</sup>	31.25 ± 2.26 <sup>a, b, c</sup>	2.12 ± 0.09 <sup>a, g</sup>
18-month-old CR	479 ± 11 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.24	12.83 ± 0.42	1.67 ± 0.12 <sup>a</sup>
18-month-old CR/22%	503 ± 9 <sup>a</sup>	1.37 ± 0.04	13.91 ± 0.35	1.79 ± 0.04 <sup>a</sup>

Values represent the mean ± SEM of 12-14 rats.

<sup>a</sup>  $p < 0.001$  when compared to 2-month-old ad libitum-fed rats,

<sup>b</sup>  $p < 0.001$  when compared to 18-month-old CR rats,

<sup>c</sup>  $p < 0.001$  when compared to 18-month-old CR/22% protein-fed rats,

<sup>d</sup>  $p < 0.05$  when compared to 18-month-old CR rats,

<sup>e</sup>  $p < 0.01$  when compared to 18-month-old CR/22% protein-fed rats,

<sup>f</sup>  $p < 0.01$  when compared to 2-month-old ad libitum/22% protein-fed rats,

<sup>g</sup>  $p < 0.01$  when compared to 18-month-old CR rats.

**TABLE 2 : Serum hormones, FFA and glucose concentrations: effect of age, long-term caloric restriction and dietary protein intake****A) Two- and 12-month-old rats**

Group	2-month-old		12-month-old
	AL/22%	AL/22%	AL/13%
IGF-I (ng/mL)	1702 ± 81	1022 ± 56 <sup>a</sup>	1170 ± 98 <sup>a</sup>
Free T4 (pmol/L)	41.4 ± 1.5	28.0 ± 1.5 <sup>a, b</sup>	22.6 ± 1.2 <sup>a</sup>
Testosterone (ng/mL)	1.89 ± 0.54	0.71 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.90 ± 0.14 <sup>c</sup>
Insulin (ng/mL)	2.51 ± 0.30	6.11 ± 0.41 <sup>a</sup>	5.51 ± 0.34 <sup>a</sup>
FFA (µmol/L)	225 ± 26	456 ± 47 <sup>d</sup>	379 ± 47
Glucose (mM)	6.73 ± 0.37	12.35 ± 0.80 <sup>a</sup>	13.70 ± 0.70 <sup>a</sup>

Values represent the mean ± SEM of samples tested in duplicate from 8-13 rats.

<sup>a</sup>  $p < 0.001$  when compared to 2-month-old ad libitum-fed rats,

<sup>b</sup>  $p < 0.05$  when compared to 12-month-old ad libitum/13% protein-fed rats,

<sup>c</sup>  $p < 0.05$  when compared to 2-month-old ad libitum-fed rats,

<sup>d</sup>  $p < 0.01$  when compared to 2-month-old ad libitum-fed rats.

**B) Two- and 18-month-old rats**

Group	2-month-old		18-month-old		
	AL/22%	AL/22%	AL/13%	CR	CR/22%
Leptin (ng/mL)	0.13 ± 0.05	12.31 ± 0.56 <sup>a, b, c</sup>	11.18 ± 0.72 <sup>a, b, c</sup>	0.25 ± 0.07	0.43 ± 0.14
IGF-I (ng/mL)	2647 ± 152	1987 ± 128 <sup>d, e</sup>	1963 ± 210 <sup>d, e</sup>	1175 ± 81 <sup>a</sup>	1567 ± 123 <sup>a</sup>
Free T4 (pmol/L)	38.7 ± 1.5	25.7 ± 2.5 <sup>a</sup>	28.0 ± 1.6 <sup>f, g</sup>	17.4 ± 2.1 <sup>a</sup>	25.6 ± 1.5 <sup>a</sup>
Free T3 (ng/mL)	3.9 ± 0.4	3.1 ± 0.3 <sup>c, e</sup>	3.1 ± 0.2 <sup>c, e</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.2 <sup>a</sup>
Testosterone (ng/mL)	3.2 ± 0.5	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.4 <sup>f</sup>	1.4 ± 0.2 <sup>f</sup>
Corticosterone (ng/mL)	27.6 ± 9.4	39.7 ± 16.3 <sup>e</sup>	ND	142.3 ± 28.1 <sup>a</sup>	ND
Insulin (ng/mL)	2.19 ± 0.30	5.01 ± 0.44 <sup>a, b, c</sup>	6.00 ± 0.37 <sup>a, b, c</sup>	1.93 ± 0.28	1.72 ± 0.32
FFA (µmol/L)	263 ± 51	519 ± 66 <sup>f, g</sup>	571 ± 33 <sup>a, e, h</sup>	318 ± 23	364 ± 42
Glucose (mM)	6.33 ± 0.37	10.90 ± 0.31 <sup>a, b, i</sup>	12.44 ± 0.35 <sup>a, b, c</sup>	8.44 ± 0.38 <sup>f, j</sup>	10.28 ± 0.33 <sup>a</sup>

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

<sup>a</sup>  $p < 0.001$  compared with 2-month-old AL/22% rats,

<sup>b</sup>  $p < 0.001$  compared with 18-month-old CR rats,

<sup>c</sup>  $p < 0.001$  compared with 18-month-old CR/22% rats,

<sup>d</sup>  $p < 0.05$  compared with 2-month-old AL/22% rats,

<sup>e</sup>  $p < 0.01$  compared with 18-month-old CR rats,

<sup>f</sup>  $p < 0.01$  compared with 2-month-old AL/22% rats,

<sup>g</sup>  $p < 0.05$  compared with 18-month-old CR rats,

<sup>h</sup>  $p < 0.05$  compared with 18-month-old CR/22% rats,

<sup>i</sup>  $p < 0.05$  compared with 18-month-old AL/13% rats,

<sup>j</sup>  $p < 0.01$  compared with 18-month-old CR/22% rats.

ND: not determined.

**TABLE 3. Estimates of [<sup>127</sup>I-Tyr<sub>10</sub>]hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub> binding parameters in anterior pituitary homogenates: effect of age, long-term caloric restriction and dietary protein intake**

**A) Two- and 12-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 prot.)	B <sub>max2</sub> (pmol/mg prot.)	B <sub>max</sub> (pmol/mg prot.)
2-month-old AL/22%	0.18 ± 0.07	51 ± 11		28 ± 9	2.83 ± 0.40	
12-month-old AL/22%			8.45 ± 1.99 <sup>a, b</sup>			2.09 ± 0.50 <sup>c</sup>
12-month-old AL/13%			4.73 ± 2.31 <sup>b</sup>			1.41 ± 0.71

Estimates of binding parameters were derived from cold saturation studies.

Values represent mean ± SEM of 4 independent experiments performed in triplicate.

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  when compared to K<sub>d1</sub> in pituitaries from 2-month-old rats,

<sup>b</sup>  $p < 0.05$  when compared to K<sub>d2</sub> in pituitaries from 2-month-old rats,

<sup>c</sup>  $p < 0.05$  when compared to B<sub>max1</sub> in pituitaries from 2-month-old rats.

**B) Two- and 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 prot.)	B <sub>max2</sub> (pmol/mg prot.)	B <sub>max</sub> (pmol/mg prot.)
2-month-old AL/22%	0.12 ± 0.03	28.8 ± 12.7		14.9 ± 3.3	2.56 ± 0.89	
18-month-old AL/22%			2.76 ± 0.63 <sup>a</sup>			0.46 ± 0.11 <sup>c</sup>
18-month-old AL/13%			3.04 ± 1.06 <sup>a</sup>			0.47 ± 0.16
18-month-old CR	0.23 ± 0.18 <sup>b</sup>	9.43 ± 4.05		24.2 ± 20.0 <sup>d, e</sup>	0.98 ± 0.30	
18-month-old CR/22%			3.54 ± 1.00 <sup>a</sup>			0.80 ± 0.23

Estimates of binding parameters were derived from cold saturation studies.

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

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  compared with K<sub>d1</sub> from 2-month-old AL/22% rats,

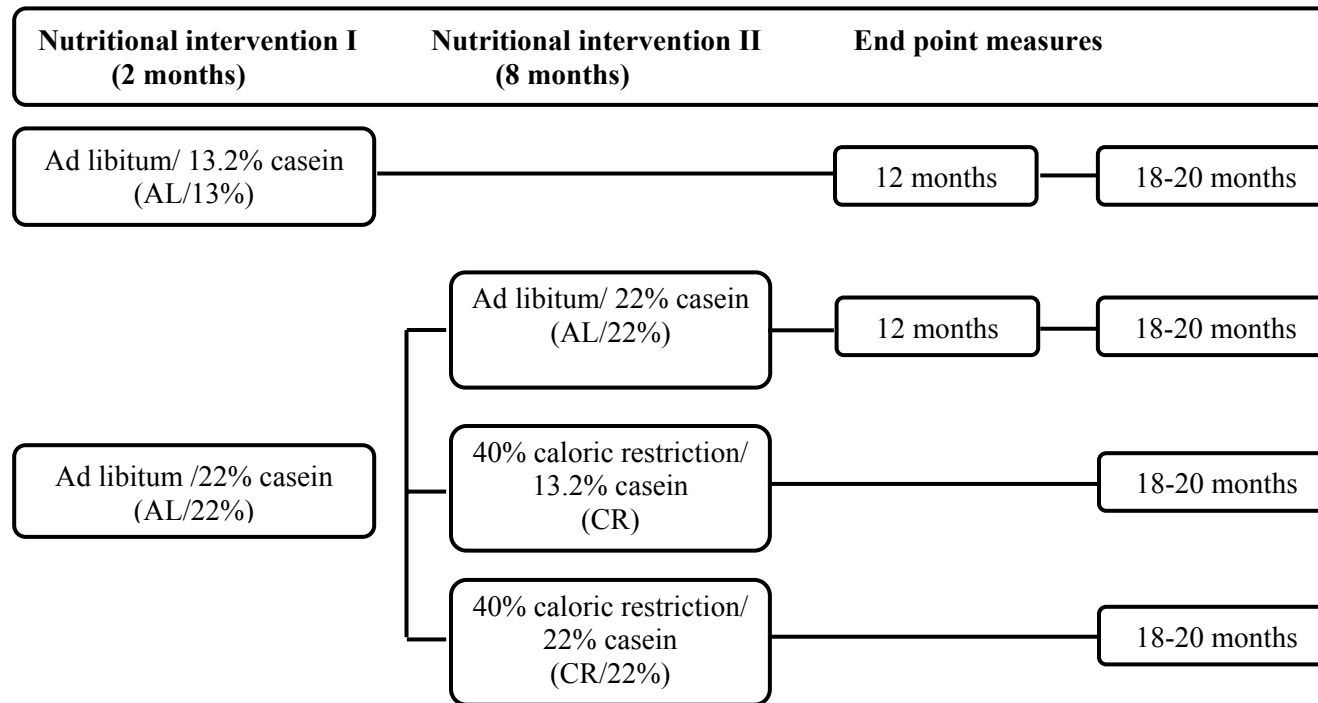
<sup>b</sup>  $p < 0.05$  compared with K<sub>d</sub> from 18-month-old CR/22% rats,

<sup>c</sup>  $p < 0.05$  compared with B<sub>max1</sub> from 2-month-old AL/22% rats,

<sup>d</sup>  $p < 0.05$  compared with B<sub>max</sub> from 18-month-old AL/22% rats,

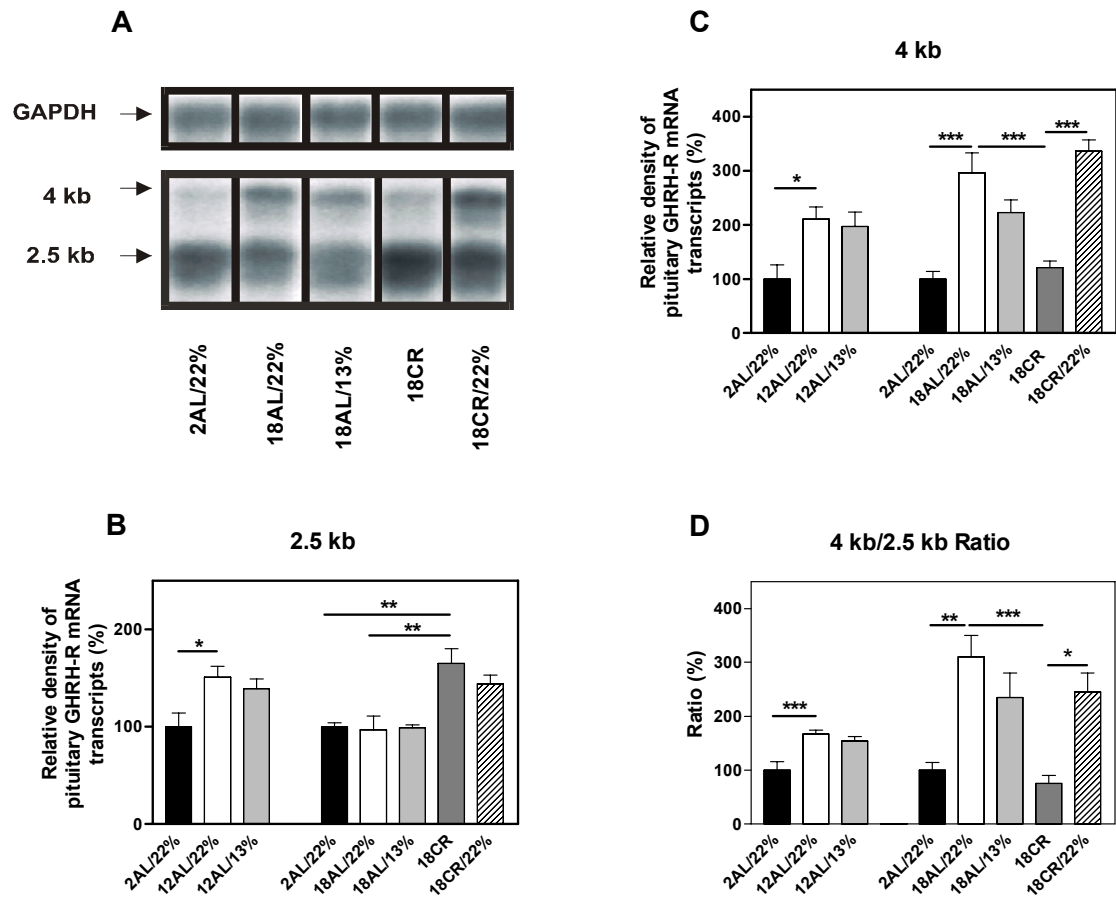
<sup>e</sup>  $p < 0.05$  compared with B<sub>max</sub> from 18-month-old CR rats.

FIGURE 1



**Figure 1.** Experimental design of dietary interventions (for details, see Materials and Methods).

FIGURE 2



**Figure 2.** Effects of age, LTMCR and dietary protein intake on anterior pituitary GHRH-R mRNA transcript levels in 12- and 18-month-old rats.

Twenty micrograms of total RNA from each rat pituitary were analyzed by Northern blotting. A: Autoradiogram of GHRH-R and GAPDH mRNA levels, from representative 2-month-old AL/22% (2AL/22%), 18-month-old AL/22% (18AL/22%), 18-month-old AL/13% (18AL/13%), 18-month-old CR (18CR) and 18-month-old CR/22% (18CR/22%) rats. B, C and D: Relative density of anterior pituitary GHRH-R mRNA 2.5 and 4 kb transcripts (%) and transcript ratio, respectively, in arbitrary units (AU) for 12-month-old AL/22% (12AL/22%), 12-month-old AL/13% (12AL/13%) rats and the four groups of 18-month-old rats described in A, compared to 2-month-old AL/22% rats.

Values represent the mean  $\pm$  SEM of 2 independent experiments, with 5-8 rats per group.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  using ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test.

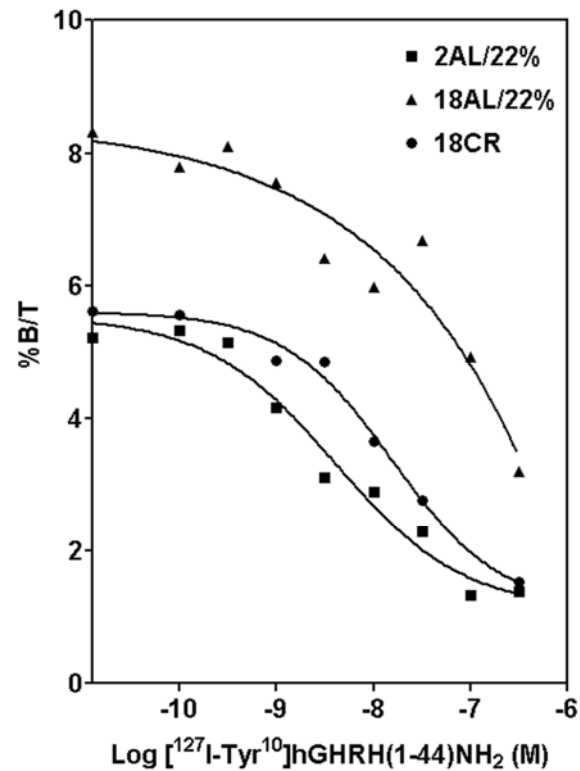
**Additional significant differences not shown in the figures:**

2.5-kb transcript:  $p < 0.05$  between 2AL/22% and 18CR/22%; 18AL/22% and 18CR/22%; 18AL/13% and 18CR/22%;  $p < 0.01$  between 18AL/13% and 18CR/22%.

4-kb transcript:  $p < 0.05$  between 2AL/22% and 18AL/13%; 18AL/13% and 18CR; 18AL/13% and 18CR/22%;  $p < 0.001$  between 2AL/22% and 18CR/22%.

4/2.5-kb ratio:  $p < 0.05$  between 2AL/22% and 18CR/22%; 18AL/13% and 18CR

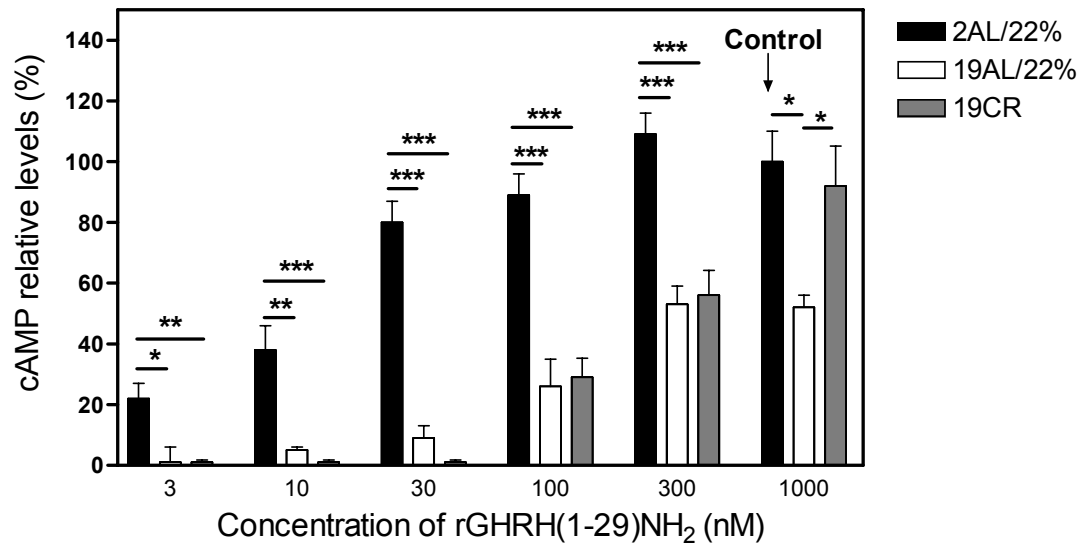
FIGURE 3



**Figure 3.** Effects of age and LTMCR on anterior pituitary  $[^{125}\text{I-Tyr}^{10}]\text{hGHRH}(1-44)\text{NH}_2$  binding profiles in 18-month-old rats.

Representative binding curves in anterior pituitary homogenates from 2-month-old AL/22% (■ 2AL/22%), 18-month-old AL/22% rats (▲ 18AL/22%) and 18-month-old CR rats (● 18CR). Values are expressed in % of specific binding, corrected for 75  $\mu\text{g}$  protein, over the total amount of radioligand added (B/T).

FIGURE 4



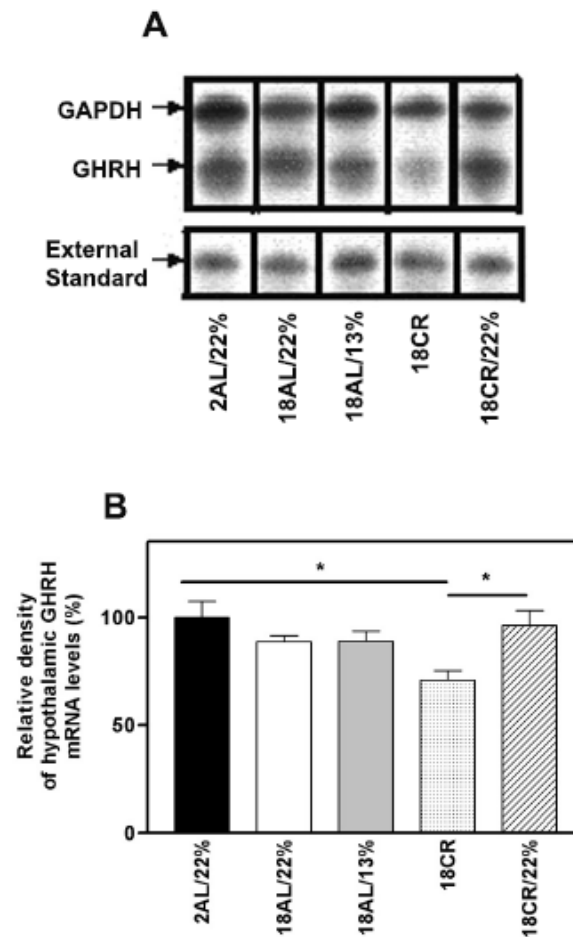
**Figure 4.** Effects of age and LTMCR on GHRH-induced cAMP production in the anterior pituitary of 19-month-old rats.

cAMP levels from anterior pituitary homogenates from 19-month-old AL/22% (19AL/22%) and 19-month-old CR (19CR) rats were compared with those of 2-month-old AL/22% (2AL/22%) rats. cAMP production in anterior pituitary homogenates from 2-month-old rats, with 1000 nM rGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>, was used as the control value (100%). Values represent the mean  $\pm$  SEM of 3-5 independent experiments.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ , using ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test.



FIGURE 5

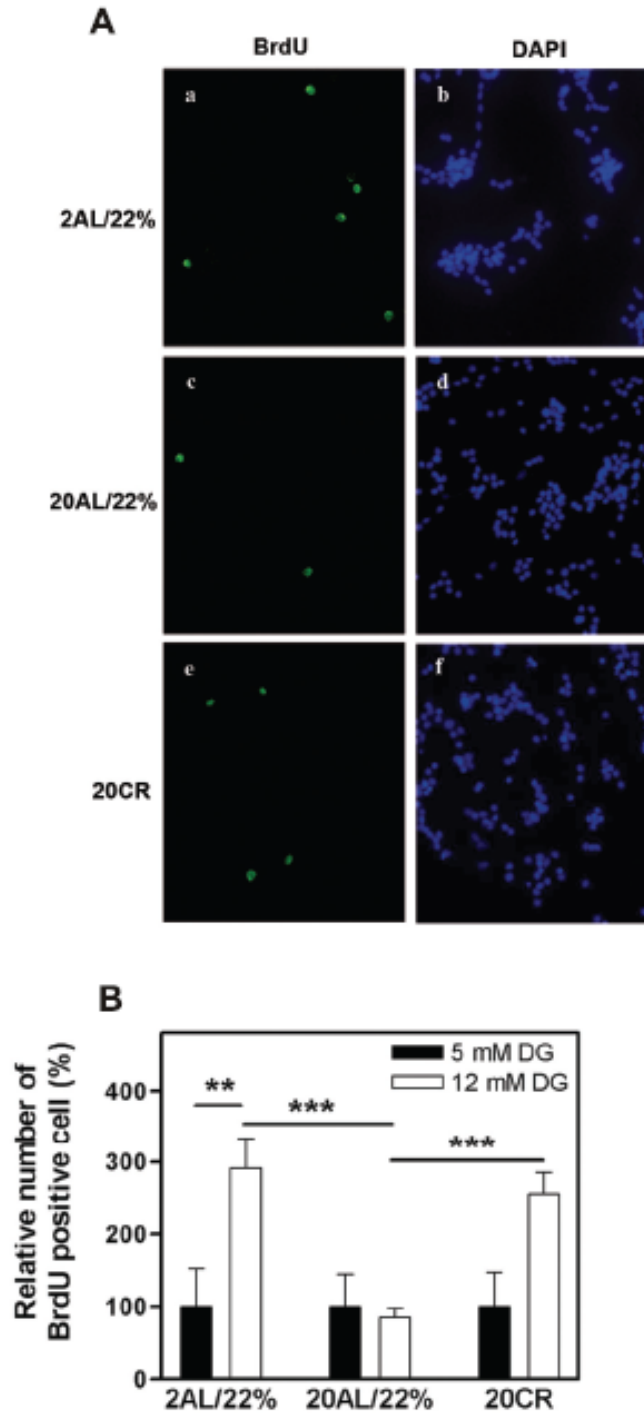


**Figure 5.** Effects of age, LTMCR and dietary protein intake on hypothalamic GHRH mRNA levels in 18-month-old rats.

Two and a half micrograms of total RNA from each hypothalamus were analyzed by RPA. A: Autoradiogram of GHRH, GAPDH and external standard mRNA levels, from representative 2-month-old (2AL/22%), 18-month-old AL/22% (18AL/22%), 18-month-old AL/13% (18AL/13%), 18-month-old CR (18CR) and 18-month-old CR/22% (18CR/22%) rats. B: Relative density of hypothalamic GHRH mRNA levels (%) for the 4 groups of old rats described in A, compared to 2-month-old AL/22% rats.

Values represent the mean  $\pm$  SEM of 2 independent experiments, with 6-8 rats per group. \* $p < 0.05$ , by ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test.

FIGURE 6



**Figure 6.** Effects of age and LTMCR on GHRH-induced BrdU incorporation in anterior pituitary cells from 20-month-old rats.

Cells were dispersed and cultured in the presence of a physiological (5 mM) or elevated (12 mM) concentration of D-glucose (DG). A: Representative labeling of anterior pituitary cells with BrdU (green) and DAPI (blue), cultured in the presence of 12 mM DG. Cells from 2-month-old AL/22% rats (2AL/22%; a, b), 18-month-old AL/22% rats (18AL/22%; c, d) and 18-month-old CR rats (18CR; e, f) were studied. B: Relative number of BrdU immunoreactive cells from the rat groups described above, after 16-h stimulation with 100 nM rGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> in the presence of BrdU.

Values represent the mean  $\pm$  SEM of 2 independent experiments.

\*\*\* $p < 0.001$ , using ANOVA and Tukey's multiple comparisons post-test.

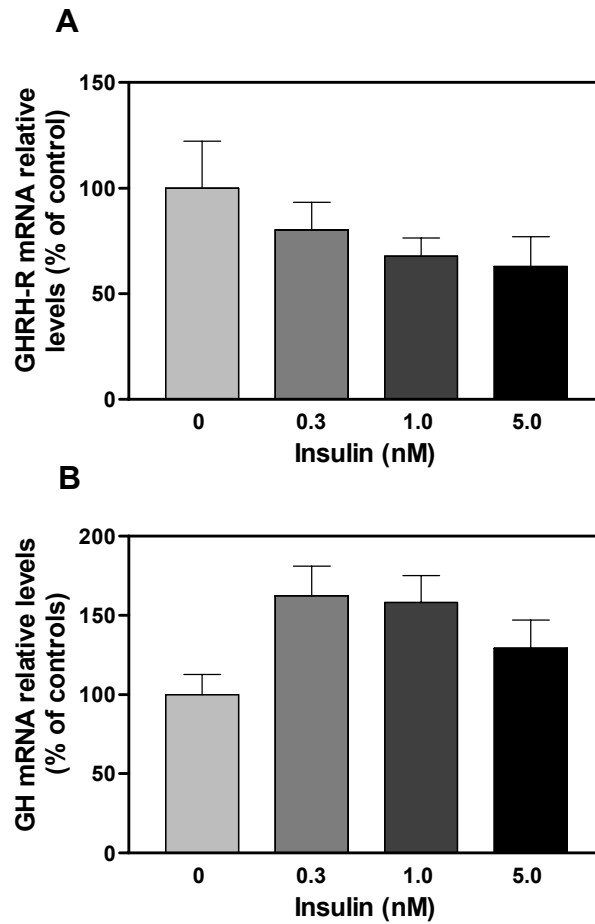
\*\* $p < 0.01$ , using Student's t test.

## SUPPLEMENTARY DATA

### Material and methods

Anterior pituitary cells from 2-month-old rats were isolated as described previously (Bedard et al., 2008). They were plated at a density of  $8 \times 10^5$  cells/well in 12-well plates and incubated overnight in DMEM with 5 mM D-glucose, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin (50 U/ml)/streptomycin (1.25 µg/ml; Invitrogen Canada Inc.), and 0.1% amphotericin (Sigma-Aldrich Canada). They were subsequently incubated for 2 h in serum-free medium containing 0.1% BSA and for 24 h in the presence of 0, 0.3, 1.0 or 5.0 nM of recombinant human insulin (Humulin R, HI-210, 100 U/mL, Eli Lilly Canada, Toronto, ON, Canada). A concentration of 0.3 nM was chosen to mimic serum insulin from 2-month-old AL/22% and 18-month-old CR rats, and 1.0 nM to mimic that of 18-month-old AL/22% rats. Experiments were performed 3 times in duplicate. Cell viability as determined by the trypan blue exclusion method was not different between 0 and 5 nM insulin (89 vs. 90%).

At the end of incubation, total RNA was extracted using TRIzol reagent. The RNA integrity number of all samples, determined using a BioAnalyser RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies), was  $>9.0$ . Rat GHRH-R and GH mRNA levels were assessed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) (Bedard et al., 2008). The specificity of the PCR products for rGH (forward: 5'-CAAGAGGCTGGTGCTTTACC-3' and reverse 5'-AGAACGCAGCCTGGGCATTC-3' nt: 123-292, NM\_001034848) was established by melting curve analysis and electrophoresis on 2% agarose gel. The results are expressed in relative levels of mRNA compared with 0 nM insulin as 100%.

**FIGURE S1**

**Figure S1.** Direct effect of insulin on GHRH-R and GH mRNA levels in anterior pituitary cultured cells from 2-month-old rats.

A: GHRH-R mRNA levels. B: GH mRNA levels.

Values are expressed in % of relative level using 0 nM insulin as control. They represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments performed in duplicate. Statistically significant differences were determined by one-way ANOVA ( $p > 0.05$ ), no post-test performed.

## MANUSCRIT 3.2

**Titre du manuscrit:** **Aging and diets regulate the rat anterior pituitary and hypothalamic transcriptome**

**Auteurs:** **Karine Bédard**, Julie Bédard, Guylaine Ferland, Pierrette Gaudreau.

**Statut :** Soumis le 20 juin 2011 à *Neuroendocrinology*

### **Contribution:**

La stratégie expérimentale utilisée a été élaborée par Karine Bédard, Julie Bédard et Pierrette Gaudreau. Les extractions d'ARN d'hypophyse antérieure et d'hypothalamus ont été réalisées par Julie Bédard, assistante de recherche au laboratoire du professeur Gaudreau. L'analyse préliminaire des résultats a été effectuée par Karine Bédard et Julie Bédard. Les analyses statistiques, l'annotation des gènes et la génération des listes ont été réalisées par Karine Bédard. La classification finale des gènes selon les fonctions biologiques a été effectuée par Karine Bédard avec l'aide de Julia Garshin, stagiaire de niveau baccalauréat. La validation par RT-PCR a été effectuée par Karine Bédard avec l'aide de Julie Bédard. Les expériences de stimulation de cellules hypophysaires avec l'IGFBP3 ou du REG3b ont été effectuées et analysées par Karine Bédard. Les dosages hormonaux et métaboliques ont été effectués par Daniel Langlois, assistant de recherche du laboratoire du Dr Gaudreau. La quantification de l'IGFBP3 sérique a été réalisée par Karine Bédard. Guylaine Ferland et Pierrette Gaudreau sont responsables de la supervision et de la gestion de la colonie de rats Sprague Dawley âgés, nourrie *ad libitum* ou soumis à interventions nutritionnelles, qui fait partie de l'infrastructure Colonies de rats âgés du RQRV. L'ensemble de l'étude a été supervisé par Pierrette Gaudreau. Le manuscrit a été rédigé par Karine Bédard et révisé par Pierrette Gaudreau et Guylaine Ferland.

**Aging and diets regulate the rat anterior pituitary and hypothalamic transcriptome**

Karine Bédard<sup>a</sup>, Julie Bédard<sup>a</sup>, Guylaine Ferland<sup>b,c</sup> and Pierrette Gaudreau<sup>a,d</sup>.

<sup>a</sup>Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, *Centre hospitalier de l'Université de Montréal* Research Center (CRCHUM), Montreal, QC, Canada H1W 4A4, <sup>b</sup>*Institut universitaire de gériatrie de Montréal* Research Center, Montreal, QC, Canada H3W 1W5, and Departments of <sup>c</sup>Nutrition and <sup>d</sup>Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada H3C 3J7.

Correspondence should be addressed to:

Pierrette Gaudreau PhD, Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, CRCHUM, Angus Technopole, Room 311, 2901 Rachel Street East, Montreal, QC, Canada H1W 4A4.

**Abbreviated title:** Aging and diets regulate rat transcriptome

**Key words:** Microarray, Aging, Caloric restriction, Soy diet, Casein diet, Anterior pituitary, Hypothalamus.

**Abstract**

Long-term moderate caloric restriction (LTMCR) is a powerful intervention to prevent or delay age-related deteriorations and diseases. Its beneficial effects have been observed in several tissues and species. This microarray study investigated the effects of aging, LTMCR and long-term dietary soy on the regulation of gene expression in the rat anterior pituitary and hypothalamus. In both tissues, aging regulated genes mainly involved in cell defense and repair mechanisms related to apoptosis, DNA repair, cellular stress and immune response. In the aging pituitary, the highest up-regulated gene was the regenerating islet-derived 3 beta (5.77-fold), coding for a secretory protein involved in acute stress and inflammation. Beneficial effects of LTMCR were mainly observed in the pituitary for genes involved in cell stress and immune response. In addition, protective effects of LTMCR on age-related regulation of gene expression was observed for 37 pituitary genes, including some related to oxidative stress defense, cell proliferation and immune response. In the hypothalamus, the effects of LTMCR on age-related changes were modest. Finally, changing the quality of dietary protein (20% casein for soy) had a low impact on the regulation of mRNA levels in both tissues. A regulation of genes involved in the somatotroph function is also worth mentioning. The *Igfbp3* gene was up-regulated in the aging pituitary (2.89-fold) and LTMCR not only prevented this effect (-2.33-fold) but also up-regulated the *Ghrh-r* gene (1.77-fold). Altogether, this study proposes novel pituitary and hypothalamic targets and signaling pathways to help understanding the mechanisms involved in aging processes and LTMCR.



## Introduction

Long-term moderate caloric restriction (LTMCR), without malnutrition, is recognized as a powerful intervention to prevent or delay age-related deteriorations and diseases, maintain physiological functions and extend mean and maximum life span [1, 2]. LTMCR has been studied in various species such as yeasts, mice, rats and non-human primates [1, 3]. Recent results from a 20-year LTMCR study in rhesus monkeys have shown improvements in muscle function and insulin sensitivity, and a reduction of the incidence of cancer, cardiovascular diseases and brain atrophy in regions regulating motor and executive functions [4]. In 25-50-year-old overweight humans, beneficial effects of a 6-month caloric restriction were observed on fat mass, insulin resistance and cardiovascular risk factors [5, 6, 7]. Finally, a study in healthy seniors ( $60.7 \pm 7.6$  years) reported that a 30% caloric restriction from *ad libitum* (AL) previous daily food consumption for three months, improved some cognitive performances [8].

Multiples mechanisms by which LTMCR could exert its beneficial effects have been proposed such as hormesis as well as a reduction of metabolic rate, nutrient sensing pathways signaling, oxidative stress and inflammation [1, 9, 10]. Since LTMCR may exert tissue-specific effects, transcriptomic profiles have been analyzed in rodent liver [11], heart [12], skeletal muscle [13], adipose tissue [14] and brain [15] to target functions that could be affected by aging and preserved by LTMCR. To date, two macroarray studies have been conducted in the rat anterior pituitary and hypothalamus to examine the effects of age [16, 17] and caloric restriction [17].

The hypothalamo-pituitary axis is a neuroendocrine system exerting crucial physiological roles such as growth, reproduction, metabolism and response to stress. The somatotroph axis is particularly impaired in the course of aging [18, 19, 20]. The decline in

circulating growth hormone (GH) appears to be due, at least in part, to a diminution of functional GHRH receptors (GHRH-R), leading to a decrease of somatotroph sensitivity to GHRH [21]. We have shown that LTMCR maintains youthful levels of functional GHRH-R in the anterior pituitary of old rats [22, 23].

Consumption of functional food may also improve health and influence the development of age-related diseases [24, 25]. Soy and isoflavones dietary supplementation were reported to protect from cardiovascular diseases and maintain bone mineral density in postmenopausal women [26, 27]. In humans, ingestion of a soy protein drink (0.6 g/kg body weight (BW)) stimulates GH secretion [28]. Moreover, consumption of a soy-rich diet, deficient in iodine, was shown to increase the number of thyroid stimulating hormone, prolactin and GH immunoreactive cells in the rat anterior pituitary [29]. No study has been performed to determine the effects of a long-term soy protein diet in the anterior pituitary and hypothalamus of aging rats.

The objective of the present study was therefore to perform cDNA microarray analysis to examine the effects of aging, LTMCR and the source of dietary protein on the rat anterior pituitary and hypothalamic transcriptome. The results will help to identify important age-related changes in these neuroendocrine structures and to reveal new mechanisms involved in the beneficial effects of LTMCR and/or dietary soy protein.

## **Material and methods**

### *Animal handling and dietary interventions*

Management of the rat colony was performed as previously described [23]. Two-month-old male Sprague Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, CA) were housed individually. The rats were fed a chow diet containing either 20% casein or soy as the

source of protein, prepared according to the Teklad control diet TD89248 (Harland Laboratories Inc., Madison, WI) [22]. At 8 months, the casein-rats were randomized in 2 groups: AL or LTMCR. In the latter group, rats were submitted to a gradual restriction: 20% for two weeks and 40% thereafter (Fig. 1). All restricted rats received the same amounts of minerals and vitamins as the AL groups and had free access to water. At 20 months of age, rats were euthanized (08:30-11:30 h AM), after an overnight fast, by complete blood withdrawal *via* the abdominal aorta under pentobarbital anesthesia (50 mg/100 g BW). Three-month-old casein-fed AL rats were always euthanized along with old rats. Macroscopic evaluation indicated no major pathology or tumor. Anterior pituitaries and hypothalami were dissected rapidly, snap-frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C until RNA extraction. Sera were kept at -80°C for subsequent measures. The animal protocol was approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal, in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

#### *Serum immunoassays*

Total insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations were measured with radioimmunoassay (RIA) kits (Diagnostic Systems Laboratories Inc. and Webster, TX and MP Biomedicals, Solon, OH, respectively). IGF binding protein-3 (IGFBP-3) and leptin concentrations were quantified by ELISA kits (Alpco Diagnostic, Salem, NH and, Diagnostic Systems Laboratories Inc). For each assay, all samples were analyzed in duplicate in a single assay. The sensitivity of the IGF-1, insulin, IGFBP-3 and leptin assays was 21, 0.17, 0.078 and 0.3 ng/mL, respectively, and their intra-assay coefficient of variation (CV) was 5.3, 8.25, 8.6 and 6.9 %. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM of the 4-7 rats used for the pituitary and hypothalamus microarray study. Statistically

significant differences were determined by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons post-test.

#### *Total RNA isolation and hybridization*

Total RNA from rat anterior pituitaries and hypothalami was isolated with TRIzol (Invitrogen, Burlington, ON, CA). Samples with the highest quality were selected for microarray hybridization (RNA integrity number  $\geq 8.8$ , using a 2100 Bioanalyser, Agilent Technologies, Mississauga, ON, CA). Pituitary and hypothalamus were selected from the same rat only when the previous criterion was met. Double strand cDNA was synthesized using 10  $\mu\text{g}$  of total RNA from four anterior pituitaries and hypothalami per group and processed through an in vitro transcription reaction to generate biotin-labeled cRNA. Sample labeling and array hybridization were performed by the McGill University and Génome Québec Innovation Center (Montreal, CA) according to the manufacturer's instructions (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA). Gene expression profiles were analyzed using the Affymetrix GeneChip  $\text{\textcircled{R}}$  Rat Genome 230.20 Array, comprising over 28,000 genes.

#### *Processing and analysis of microarray data*

Background correction and normalization of raw data was performed with Robust Multichip Analysis (RMA). Statistical analysis was done using the Partek $\text{\textcircled{R}}$  Genomic Suite 6.3 (St-Louis, MO). Significance of changes in pituitary or hypothalamus mRNA levels with age (comparison of 20- and 3-month-old AL casein-fed rats: 20CA vs 3CA), LTMCR (comparison of 20-month-old AL and calorie-restricted casein-fed rats: 20CA vs 20CR), and soy protein diet (comparison 20-month-old AL casein- and soy-fed rats: 20CA vs 20SA)

(Fig. 1) was subsequently assessed using a Student's *t* test. Genes with a fold change (FC)  $\geq$  1.30 and a *P* value  $<$  0.05 were considered of interest and special attention was given to highly regulated genes. All probe sets were annotated for gene name, function, chromosomal and cellular location using the NetAffx network (<http://www.affymetrix.com>). The Venn Diagram tool of the Partek® Genomic Suite was used to identify genes commonly affected by age and LTMCR or age and soy. Association of significantly regulated genes with a biological function was performed using the Ingenuity Pathways Analysis software (IPA, Ingenuity® Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)). Biological functions with a *P*  $<$  0.05 (5,0 E-02), calculated with the right-tailed Fisher's exact test, were considered relevant.

#### *Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) validation*

Expression levels of selected genes were confirmed by real-time RT-PCR [30], using the specific primer sets listed in Supplemental Table 1. Reverse transcription of 2  $\mu$ g from the RNA samples used in microarray experiments, was performed using the Superscript II RT kit and oligo (dT)<sub>12-18</sub> primers following the manufacturer instructions (Invitrogen). RT-PCR was performed at 95°C for 15 min followed by repeated 40 cycles at 94 °C for 15 sec, 56-60 °C (Supplemental Table 1) for 35 sec, 72 °C for 30 sec, a final elongation step at 72 °C for 45 sec and a melting step ramping from 72 °C to 99 °C at 1 °C/5 sec. Reactions were performed in duplicate, using the Quantitect SYBR Green PCR kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), in a Rotor Gene 3000 real-time thermal cycler (Corbett Life Sciences, Montreal Biotech, Kirkland, QC, Canada). Specificity of the RT-PCR products was assessed by melting curve analysis and electrophoresis on 2% agarose gel. Data were analyzed as described previously [30] and according to Pfaffl [31]. Glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase (GAPDH) and  $\beta$ -actin were used as reference genes and gave similar results. The intra-assay CV was  $\leq 2.5\%$  in all experiments. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of mRNA relative levels normalized with those of GAPDH. As for the microarray experiments, statistical significance of differences was determined using the Student's *t* test.

#### *Microarray data presentation*

For each condition studied in the anterior pituitary and hypothalamus (aging, LTMCR, soy diet), the results are presented in the following order: 1) number of genes significantly regulated, 2) major biological functions regulated with emphasis on the most significant one, 3) genes with the highest significant fold change, and 4) genes validated by real-time RT-PCR.

## **Results**

#### *Characteristics of young and old rats*

At sacrifice, the BW of 20-month-old AL rats was 2-fold higher than that of 3-month-old CA rats ( $P < 0.001$ ) (Table 1). It was also 1.7-fold higher than that of 20-month-old CR rats ( $P < 0.001$ ). No significant difference of BW was seen between 3CA and 20CR rats. The effect of LTMCR was also observed on body mass index (BMI), which was 1.5-1.6-fold lower in 20CR compared to 20AL rats ( $P < 0.001$ ) and similar to that of 3CA rats (Table 1). The source of dietary protein had no effect on BW and BMI.

#### *Effect of age and diet on serum hormone concentrations*

In 20-month-old AL rats, serum leptin concentrations were 18-21-fold higher than in 3CA rats ( $P < 0.001$ ) (Table 1). This increase was not observed in 20CR rats. Insulin

concentrations were 1.8 and 2.4-fold higher in 20CA rats than in 3CA and 20CR rats. Serum total IGF-1 concentrations were 1.5 and 1.8-fold lower in 20 CA and 20 CR rats, respectively, compared to 3CA ( $P < 0.01-0.001$ ). Although insulin (20CA vs 3CA and 20CR) and IGF-1 (20CA vs 20 CR: 1.2-fold) changes did not reach significance in the subgroup of rats selected for microarray experiments, they were significant in the entire colony of 15-20 rats per groups ( $P < 0.05-0.001$ ). Similarly, serum IGFBP3 concentrations were 1.6-2.2-fold lower in old rats ( $P < 0.001$ ) than in 3CA rats and were not affected by LTMCR. Dietary soy had no effect on any hormone levels compared to 20CA rats.

*Effect of aging on anterior pituitary gene expression regulation*

In the rat anterior pituitary, aging up- and down-regulated 515 and 258 genes, respectively (Fig. 2A and Supplemental Table 2). The five most significantly represented biological functions are listed in Table 2A ( $P < 0.05$  or  $5.0E-02$ ) and a large number of genes in these categories were up-regulated. The most significant function was related to cell death (185 genes) (Table 2A and Supplemental Table 3A). In this category, pro-apoptotic genes such as the apoptosis-associated tyrosine kinase (Aatk), tumor necrosis factor (TNF) superfamily member 12 (Tnfsf12), TNF receptor superfamily member 1 alpha-associated *via* death domain (Tradd) and TNF receptor-associated factor 3 interacting protein 2 (Traf3ip2) were increased (FC: 1.31–1.53) while the apoptotic peptidase activating factor 1 (Apaf1) was decreased (FC: -1.53). Anti-apoptotic genes such as B-cell lymphoma 2-associated athanogene (Bag1), nucleolar protein 3 (Nol3) and NF-kappa-B inhibitor alpha2 (Nfkbia) were also up-regulated (FC: 1.40–2.36). In addition, genes involved in DNA repair such as xeroderma pigmentosum, complementation group A (Xpa),

proliferating cell nuclear antigen (Pcna) and replication protein A1, 70 kDa (Rpa1) were up-regulated (FC: 1.32–1.57).

In this tissue, the most highly regulated gene was the regenerating islet-derived 3 beta (Reg3B, 5.77-fold increase), coding for a secretory protein involved in acute stress and inflammatory responses. This result was confirmed by real-time RT-PCR (Fig. 3A). Among the genes up-regulated with a high FC (3.19–5.77), some were related to immune response such as the gamma-2a immunoglobulin heavy chain (IgG-2a), immunoglobulin heavy chain alpha (Igha) and complement component 4, gene 2 (C4-2) (Supplemental Table 2). The apolipoprotein D (Apod) gene, encoding an enzyme involved in lipoprotein metabolism, was also up-regulated (FC: 3.19). The genes highly down-regulated (FC: -3.10– -7.42) include the heat-shock protein (Hsp) family member 7 (Hspb7) gene, coding for a molecular chaperone involved in the unfolded protein response to endoplasmic reticulum stress and the pyrroline-5-carboxylate reductase 1 (Pycr1) gene, coding for a mitochondrial enzyme with oxidoreductase activity (Supplemental Table 2).

Genes encoding anterior pituitary hormones such as luteinizing hormone (LH), folliculo-stimulating hormone (FSH) and GH were decreased (FC: -1.29– -2.11) while expression of the thyrotropin hormone receptor gene (Trhr) was increased (FC: 2.26) (Supplemental Table 2). Other anterior pituitary genes associated with the somatotroph axis, antioxidant defenses and transcription factors were examined and validated by real-time RT-PCR (Fig. 3B). The Igfbp3 gene was highly up-regulated (FC: 2.89) while the somatostatin receptor 3 (Sstr3) gene was down-regulated (FC: -1.54). Genes coding for glutathione peroxidase 2 (Gpx2) and 4 (Gpx4) and glutaredoxin 1 (Glr1), associated with antioxidant defenses, were up-regulated (FC: 1.42–2.56). Finally, genes coding for transcription factors such as Jun and FBJ osteosarcoma oncogene (Fos) were up-regulated (FC: 1.59–1.65,



respectively), while the cyclic adenosine monophosphate responsive element modulator (Crem) was down-regulated (FC: -1.70). For these selected genes, RT-PCR differential levels were significant or nearly significant except for Crem.

#### *Effect of aging on hypothalamus gene expression regulation*

In the hypothalamus, the magnitude of regulation was lower than in the anterior pituitary. Aging led to up- and down-regulation of 125 and 79 genes, respectively (Fig. 2B and Supplemental Table 4). The five most significantly represented biological functions are listed in Table 2A ( $P < 0.05$  or  $5.0E-02$ ). As in the pituitary, the most significant function was related to cell death (19 genes) (Table 2A and S3B). In this category, the most highly up-regulated genes (FC: 1.59–1.89) were: the intracellular adhesion molecule 1 (Icam1), the heat-shock 27kDa protein 1 (Hspb1) implicated in cell stress response, the signal transducer and activator of transcription 1 (Stat1) mediator of many cytokines and growth factors signaling, and the cluster of differentiation 4 gene (Cd4) involved in T cell activation. Of interest in the same category, pro-apoptotic genes (FC: 1.39–1.58) included caspase 4 (Casp4), pyrin and caspase recruitment domain containing (Pycard) and thioredoxin interacting protein (Txnip). The most highly genes regulated by aging (FC: 3.07–5.39) were the complement components C3 and C4 and the interferon alpha inducible protein 27 like B (Ifi2712b), all related to the immune response (Supplemental Table 4). SRIH and GHRH gene expression were down-regulated (microarray FC: -1.33 and -1.99; RT-PCR FC: -1.22- and -2.34, respectively). As in the anterior pituitary, the IGFbp3 gene was up-regulated by age (microarray FC: 1.90; RT-PCR FC: 2.08). The cyclin D2 (Ccnd2) gene, associated with cell cycle regulation, was down-regulated (FC: -1.72). Signal transducers and activator of transcription family transcription factor genes (Stat1-2) were also up-regulated (FC: 1.52

and 1.42, respectively). Finally, galanin (Gal) and the hypocretin (orexin) receptor type 1 (Hcrtr1) genes, involved in the regulation of food intake, were down-regulated (microarray FC: -1.46 and -1.38; RT-PCR FC: -1.56 and -1.85, respectively).

*Effect of caloric restriction on anterior pituitary and hypothalamus gene expression regulation*

In the anterior pituitary, LTMCR up-regulated 42 genes and down-regulated 69 genes (Fig. 2A and Supplemental Table 5). The most significantly represented biological function was cell growth/proliferation (5 genes) which includes the Igfbp3 and vascular endothelial growth factor A (Vegfa) genes (FC: -2.33 and -1.74, respectively). Other genes affected by LTMCR were mainly associated with cell morphology (6 genes) and protein synthesis (7 genes) (Table 2B and S6A). The strongest up-regulation was for the synuclein gamma gene (Snca) (FC: 3.11), encoding a centrosome-associated protein potentially involved in brain neural integrity. Other notable genes increased by LTMCR included the Hsp 40 homolog subfamily B member 1 (Dnajb1) and the Hsp70 protein 1A (Hspa1a) (FC: 1.67 and 1.79, respectively), both associated with cell stress response. Among the selected genes of interest associated with the somatotroph axis, the Ghrh-r was up-regulated by LTMCR (FC: 1.77). The age-induced expression of the Igfbp3 gene was prevented by LTMCR (FC: -2.33). Genes related to glutathione antioxidant system such as glutathione s-transferase alpha 3 (Gsta3) and Glx1 were also regulated by LTMCR (FC: 1.66 and -1.42, respectively).

In the hypothalamus, LTMCR positively regulated 34 genes and negatively regulated 12 genes (Fig. 2B and Supplemental Table 7). These genes were mainly involved in cell death (5 genes) and cell-to-cell signaling (4 genes) (Table 2B and S6B). Among genes included in the cell death category, caspase 8 (Casp8) and Hspa1a were the most highly regulated (FC:

1.35 and 1.56, respectively). Finally, the gene coding for the cocaine- and amphetamine-regulated transcript (Cart), known to play a role in the control of food intake, was down-regulated by LTMCR (microarray FC: -1.33; RT-PCR FC: -1.36).

*Anterior pituitary and hypothalamic gene regulation by both aging and caloric restriction*

In the anterior pituitary, 40 genes were significantly regulated by both aging and LTMCR ( $P < 0.05$ , Table 3). For 37 of them, the effect of aging (mostly an up-regulation) was prevented by LTMCR. Genes of interest include Igfbp3, Glrx1, encoding an enzyme involved in glutathione metabolism and those associated with immune response such as serine peptidase inhibitor, clade G, member 1 (Serping1), lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein (Lgals3bp) and HLA-B associated transcript 5 (Bat5). A similar pattern of regulation was observed for genes involved in cell proliferation such as protein tyrosine phosphatase 4a3 (Ptp4a3) and Vegfa, and in DNA synthesis such as ribonucleotide reductase M1 (Rrm1), H2A histone family, member J (H2afj) and guanosine monophosphate reductase (Gmpr).

In the hypothalamus, three genes were regulated in opposite directions by aging and LTMCR. Matrilin 2 (Matn2), encoding an extracellular matrix protein, the calcium/calmodulin-dependent kinase1 gamma (Camk1g), a serine/threonine kinase that is activated by calcium, and finally the synaptotagmin VI (Syt6) which is involved in vesicular trafficking and exocytosis.

*Anterior pituitary and hypothalamic gene expression regulation by soy protein diet*

In the anterior pituitary, consumption of soy protein affected 86 genes, 12 were up-regulated and 74 genes were down-regulated (Fig. 2A and Supplemental Table 8A). The

most significantly represented functions regulated by soy involved genes coding for cell assembly and organization (18 genes), cell movement (16 genes), small molecule biochemistry (19 genes) and lipid metabolism (7 genes) (Supplemental Table 9). An effect of soy on preventing age-related changes in gene expression was observed for 24 genes. The highest effect seen was a down-regulation of the genes coding for Igfbp3, roundabout homolog 2 (Robo2) which is a receptor involved in cell migration and Vegfa which is implicated in angiogenesis ( $FC \leq -2.08$ ). Moreover, both soy protein and LTMCR similarly regulated 15 genes ( $FC \geq 1.30$ ; Supplemental Table 8A). Among these genes, those highly regulated encoded Robo2, Igfbp3 and Vegfa ( $FC \leq -2.08$ ).

In the hypothalamus, regulation of gene expression by soy was very modest, only 14 genes were affected (Fig. 2B). The genes coding the proto-oncogene transcription factor Jun D (Jund) and for ADP-ribosyltransferase 3 (Art3), an enzyme involved in posttranslational modification of proteins, were both down-regulated ( $FC$ : -1.65 and -1.52, respectively) (Supplemental Table 8B). Only three genes were regulated in opposite directions by age and soy and the effect was weak ( $FC \leq 1.34$ ).

## **Discussion**

The present study is the first to examine the effects of aging, LTMCR and long-term dietary soy on gene expression regulation, in the rat anterior pituitary and hypothalamus. In our colony, old AL-fed rats were characterized by a higher BW, BMI, and serum leptin and insulin concentrations than young rats. This phenotype was not present in old rats submitted to LTMCR, in agreement with our previous studies [22, 23]. Serum total IGF-1 and IGFBP3 were also decreased in old AL-fed rats and IGF-1 was further diminished by LTMCR. Modifying the source of dietary protein from casein to soy had no effect on these

anthropometric and hormonal parameters, indicating that reduction of energy intakes is a stronger determinant of gene expression regulation in the anterior pituitary and hypothalamus and possibly in other tissues.

### *Effects of aging*

Analysis of microarray data revealed that several genes involved in the activation of defense and repair mechanisms were regulated in aging anterior pituitary (Fig. 4A). It can be hypothesized that these key genes play a role in fighting aggressions (*e.g.* reactive oxygen species (ROS), inflammation, bacterial and viral infections), counteracting accumulation of cellular and molecular damages and maintaining cell and tissue integrity and functionality. This hypothesis is closely related to the free radical and inflammation theories of aging where the accumulation of ROS, damage to macromolecules and low-grade chronic inflammation play critical roles in cell fate [32, 33]. Our results suggest that apoptotic, DNA repair, cellular stress and immune response pathways may act in concert to combat aging in the anterior pituitary (Fig. 4A).

Accumulation of ROS, glycation products, and damaged DNA and proteins in the anterior pituitary may lead to the regulation of genes involved in apoptosis as an adaptive mechanism to eliminate these dysfunctional cells, as previously hypothesized in other tissues [34]. In our study, pro-apoptotic genes related to the TNF family were up-regulated (Tnfsf21 and Tradd, Fig. 4A), suggesting that TNF-mediated apoptosis is enhanced with aging. Interestingly, an increased expression of TRADD has been observed in old human lymphocytes [35]. Moreover, TNF- $\alpha$  was shown to induce apoptosis in anterior pituitary cells of young rats [36].

Genes with anti-apoptotic functions were also up-regulated with aging and could be important for the maintenance of cellular homeostasis and survival (Bag1 and Nl3, Fig. 4A). Certain genes involved in DNA repair, specifically nucleotide excision repair (NER) (Xpa, Rpa1 and Pcna, Fig. 4A), were up-regulated in the anterior pituitary of old rats and likely counteract DNA damage that accumulates with aging. In rodents and humans, mutation of genes involved in NER mechanism leads to premature aging or cancer [37]. An age-related decrease of XPA, RPA1 and PCNA mRNA and protein levels was observed in human skin fibroblasts [38], suggesting that important genes involved in DNA repair mechanisms might be differently regulated according to tissues and/or species.

Genes involved in cell stress response were also regulated in the aging anterior pituitary. Those encoding enzymes involved in the glutathione pathway (Gpx2, Gpx4 and Glx1, Fig. 4A), a major antioxidant defense system in mammals [39] were up-regulated, suggesting that a coordinated response of this system is needed to counteract oxidative stress. In addition, genes coding for heat shock proteins (Hspb1, 7 and 8) exerting chaperone activity in the folding of nascent proteins and protein damage repair [40] were also regulated. In mammals, accumulations of damaged or misfolded proteins contribute to aging and neurodegenerative diseases [41, 42]. In drosophila, overexpression of Hspb8 was shown to extend lifespan and increase resistance to oxidative stress [43].

The most highly up-regulated gene in the aging anterior pituitary was Reg3b, another stress response gene. It is a member of the regenerating gene family expressed in the pancreas and stomach [44] and up-regulated in cell stress/inflammatory conditions such as acute pancreatitis [45]. The Reg3b gene is present in somatotrophs [44] and was proposed to play a role in GH cell proliferation [46]. Additional studies will be necessary to define the precise role of Reg3b in aging somatotrophs.

In the course of aging, decline and dysfunction of the immune system (immunosenescence) may contribute to an increased susceptibility to infections and/or autoimmune diseases [47]. In the anterior pituitary, immunoresponsive genes coding for members of the complement classical pathway and immunoglobulins (C1q, C4, C2, Igha and IgG2a, Fig. 4A) were positively regulated by aging and may compensate for subtle decreases of other immune responses. An increased of complement factor mRNA levels, including C1q and C4, has been observed in the brain of 24-month-old mice [48]. In human and mice, the complement factor C1q is recognized as a key player in inflammation, phagocytosis, neutralization of viruses, immune tolerance, cell development and apoptosis [49].

In the hypothalamus, the effect of aging on gene expression was less marked than in the anterior pituitary. However, our results suggest that cell defense mechanisms are also increased in this tissue, in response to aging. Among them, pro-apoptotic genes involved in cell death were the most significantly represented category. Of interest, Txnip, encoding a thioredoxin inhibitor, was up-regulated. This protein was reported to promote ROS accumulation and apoptosis in mouse pancreatic beta-cells [50] and could exert a similar function in specific brain structures. Chaperone and immune response genes were also up-regulated in aging hypothalamus indicating that pathways involved in cell damage repair are also activated.

When comparing the categories of genes mostly regulated by aging in the anterior pituitary and hypothalamus, such as cell stress and immune response, we observed similarities. These results are in agreement with those of Lee *et al.* [51], showing that genes coding for chaperones, antioxidant enzymes and immunity proteins were regulated in the

neocortex and cerebellum of old mice. Moreover, a recent meta-analysis identified a common gene expression signature of aging in various tissues of rat, mice and humans [52]. Out of the 73 common genes identified, 15 of them were significantly regulated in the present study (*e.g.* pituitary: *Apod*, *C2*, *C4*, *Lgals3* and *Serping1*; hypothalamus: *C3* and *Txnip*), indicating that some of these defense mechanisms are conserved across cell types, tissues and species.

Since our laboratory has a long time interest in the aging somatotroph function, the regulation of genes related to this axis was examined. Pituitary GH mRNA levels were diminished as previously reported [53]. The increase of IGFBP3 mRNA levels in the aging rat anterior pituitary contrasts with the decrease of IGFBP3 immunoreactive levels observed in the serum of these animals and supports the concept of multiple biological functions for this protein. In human senescent fibroblasts, IGFBP3 mRNA and protein were also reported to be augmented [54]. In human umbilical vein endothelial cells, knockdown of the *Igfbp3* gene reduces a variety of senescent phenotypes [55]. In addition to its IGF-1-binding action, IGFBP3 has been implicated in apoptosis, cell survival, metabolism, angiogenesis and neural protection [56]. Therefore, IGFBP3 could exert some of these roles in the aging rat anterior pituitary.

The gene expression of the two main hypothalamic regulators of the somatotroph axis, GHRH and SRIH, were also decreased with aging. These results are in agreement with a study reporting a decrease of GHRH and SRIH mRNA levels in the hypothalamus of 20 month-old rats compared to 8 month-old rats [57], but are at variance with results obtained in the hypothalamus of 18-month-old male SD rats showing no significant effect of age on GHRH mRNA levels [23].



### *Effects of LTMCR*

The present study highlights the beneficial effects of LTMCR in the aging anterior pituitary. In agreement with our proposed mechanisms of cell response to aging (Fig. 4A), this dietary intervention promotes the regulation of additional genes involved in cell stress response and prevent the up-regulation of genes involved in the immune response (Fig. 4B). Among them, genes associated with heat shock proteins were up-regulated and could reflect an increased capacity to reduce stress-induced protein damage (Hsp70 and Dnajb1, Fig. 4B). LTMCR was shown to prevent age-related decrease of Hsp70 mRNA levels in the rat liver [58] and alveolar macrophages [59] following heat shock. HSP70 protein was also found to be increased in the hippocampus and cerebral cortex of old rats submitted to LTMCR [60]. We also observed beneficial effects of LTMCR on genes encoding enzymes related to antioxidant defenses. The regulation of Glrx1 and Gsta3 genes in the anterior pituitary of old rats (Fig. 4B) suggests a beneficial effect on the maintenance of a favorable anti-oxidant balance. These results are in agreement with the general effects of LTMCR to reduce oxidative stress and damage [10]. In addition, LTMCR likely prevents age-related regulation of certain genes. We also identified 37 genes that were regulated in opposite directions with aging and LTMCR in the anterior pituitary, including some related to oxidative stress defense, cell proliferation and immune response (*e.g.* Glrx1, Igfbp3, Serping1). Overall, these results suggest that anterior pituitary cells from old rats submitted to LTMCR are better equipped to face age-related stresses.

In the hypothalamus, the effect of LTMCR was less pronounced than in the anterior pituitary. Fewer genes were regulated and minor effects were observed on age-related changes. A recent study has shown that more changes in the regulation of hypothalamic gene expression could be observed in mature (12 months) than in old calorie-restricted

mice (24 months) [61]. Whether or not this is the case in the hypothalamus of aging rats submitted to LTMCR remains to be documented.

Concerning the somatotroph axis, LTMCR did not prevent the decrease of pituitary GH and hypothalamic GHRH and SRIH mRNA levels. However, it increased pituitary GHRH-R mRNA levels. This effect appears to be selective since other G-protein-coupled receptor genes such as *Srif* and ghrelin receptors were not affected. These results support previous data showing a beneficial effect of LTMCR on GHRH-R expression [22, 23]. The increase of GHRH-R mRNA levels in 18- to 19-month-old calorie-restricted rats was associated with the maintenance of youthful GHRH binding parameters and GHRH-induced cAMP production [23]. Very interestingly, LTMCR prevented the aged-related increase of pituitary *Igfbp3* gene expression and may represent a novel adaptive mechanism to counteract the deleterious effects of aging leading to senescence.

#### *Effects of soy protein diet*

Introducing soy as the source of dietary protein regulated genes involved in cell assembly and organization. Five genes, including the *Igfbp3* gene, were similarly regulated by soy and LTMCR suggesting that the two dietary interventions induce some beneficial effects by activating common mechanisms. The absence of important effects of the soy diet either in pituitary or hypothalamus contrasts with the beneficial effects of soy reported in other studies, in rats or humans [27, 29, 62]. However, it should be noted that many of the studies performed in rodents investigated short term effects of high doses of purified isoflavones or soy protein extracts (30-40% soy protein) [62]. In addition, Van Vught *et al.* have shown that the somatotrophic effect of soy proteins was reduced when ingested as part

of a meal instead of alone [28]. These observations may explain in part the modest results observed in the present study where the 20% soy content was mixed with other nutrients in the chow.

## **Conclusion**

This is the first study showing that in the rat anterior pituitary and hypothalamus aging regulates the expression of several genes implicated in cell defense and repair. These genes are participating in pathways related to apoptosis, DNA repair, cellular stress and immune response that likely work in concert to counteract many deleterious effects of aging. LTMCR exerts its beneficial effects by regulating the transcription of genes involved in these pathways. The overall impact on protein levels and cell functions will have to be addressed now to further circumscribe the importance of the proposed mechanisms in different cell populations. Considering the impact of somatopause on several physiological functions and the greater abundance of somatotrophs in the anterior pituitary compared to other cell types [63], these cells represent a highly relevant target to confirm the importance of aforementioned mechanisms involved in aging and regulated by LTMCR.

**Acknowledgements**

We thank Julia Garshin for her assistance in the classification of gene functions.

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research and the Quebec Network for Research on Aging/*Fonds de la Recherche en santé du Québec* (FRSQ). KB was the recipient of a doctoral studentship from FRSQ and the Faculty of Graduate Studies of the University of Montreal.

## References

1. Fontana L, Partridge L, Longo VD: Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 2010; 328: 321-326.
2. Anderson RM, Shanmuganayagam D, Weindruch R: Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys. *Toxicol Pathol* 2009; 37: 47-51.
3. Masoro EJ: Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 913-922.
4. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R: Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 2009; 325: 201-204.
5. Redman LM, Heilbronn LK, Martin CK, Alfonso A, Smith SR, Ravussin E for the Pennington CALERIE Team: Effect of calorie restriction with or without exercise on body composition and fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 865-872.
6. Larson-Meyer DE, Heilbronn LK, Redman LM, Newcomer BR, Frisard MI, Anton S, Smith SR, Alfonso A, Ravussin E: Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity beta-cell function fat cell size and ectopic lipid in overweight subjects. *Diabetes Care* 2006; 29: 1337-1344.
7. Lefevre M, Redman LM, Heilbronn LK, Smith JV, Martin CK, Rood JC, Greenway FL, Williamson DA, Smith SR, Ravussin E: Caloric restriction alone and with exercise improves CVD risk in healthy non-obese individuals. *Atherosclerosis* 2009; 203: 206-213.
8. Witte AV, Fobker M, Gellner R, Knecht S, Floel A: Caloric restriction improves memory in elderly humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 1255-1260.

9. Shimokawa I, Chiba T, Yamaza H, Komatsu T: Longevity genes: insights from calorie restriction and genetic longevity models. *Mol Cells* 2008; 26: 427-435.
10. Masoro EJ: Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: A critique of proposed mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 1040-1048.
11. Cao SX, Dhabhi JM, Mote PL, Spindler SR: Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10630-10635.
12. Lee CK, Allison DB, Brand J, Weindruch R, Prolla TA: Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 14988-14993.
13. Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA: Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 1999; 285: 1390-1393.
14. Higami Y, Pugh TD, Page GP, Allison DB, Prolla TA, Weindruch R: Adipose tissue energy metabolism: altered gene expression profile of mice subjected to long-term caloric restriction. *FASEB J* 2004; 18: 415-417.
15. Prolla TA: DNA microarray analysis of the aging brain. *Chem Senses* 2002; 27: 299-306.
16. Kappeler L, Gourdjji D, Zizzari P, Bluet-Pajot MT, Epelbaum J: Age-associated changes in hypothalamic and pituitary neuroendocrine gene expression in the rat. *J Neuroendocrinol* 2003; 15: 592-601.
17. Chen H: Gene expression by the anterior pituitary gland: effects of age and caloric restriction. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 222: 21-31.
18. Corpas E, Harman SM, Blackman MR: Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev* 1993; 14: 20-39.

19. Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J: Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology* 1980; 107: 1875-1879.
20. Deslauriers N, Gaudreau P, Abribat T, Renier G, Petitclerc D, Brazeau P: Dynamics of growth hormone responsiveness to growth hormone releasing factor in aging rats: peripheral and central influences. *Neuroendocrinology* 1991; 53: 439-446.
21. Girard N, Boulanger L, Denis S, Gaudreau P: Differential in vivo regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor by GHRH in young and aged rats. *Endocrinology* 1999; 140: 2836-2842.
22. Girard N, Ferland G, Boulanger L, Gaudreau P: Long-term calorie restriction protects rat pituitary growth hormone-releasing hormone binding sites from age-related alterations. *Neuroendocrinology* 1998; 68: 21-29.
23. Bédard K, Robinette K, Ferland G, Gaudreau P: Effects of long-term dietary interventions on pituitary growth hormone-releasing hormone receptor in aging rats and potential mechanisms of action. *Mech Ageing Dev* 2010; 131: 169-178.
24. Hasler CM: The changing face of functional foods. *J Am Coll Nutr* 2000; 19: 499S-506.
25. Everitt AV, Hilmer SN, Brand-Miller JC, Jamieson HA, Truswell AS, Sharma AP, Mason RS, Morris BJ, Le Couteur DG: Dietary approaches that delay age-related diseases. *Clin Interv Aging* 2006; 1: 11-31.
26. Goodman-Gruen D, Kritz-Silverstein D: Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *J Nutr* 2001; 131: 1202-1206.
27. Messina M: Insights gained from 20 years of soy research. *J Nutr* 2010; 140: 22890-2295.

28. Van Vught AJ, Nieuwenhuizen AG, Brummer RJ, Westerterp-Plantenga MS: Somatotropic responses to soy protein alone and as part of a meal. *Eur J Endocrinol* 2008; 159: 15-18.
29. Kajiya H, Takekoshi S, Miyai S, Ikeda T, Kimura S, Osamura R: Dietary soybean enhances Pit-1 dependent pituitary hormone production in iodine deficient rats. *J Mol Histol* 2005; 36: 265-274.
30. Bédard K, Strecko J, Thériault K, Bédard J, Veyrat-Durebex C, Gaudreau P: Effects of a high-glucose environment on the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor: type 1 diabetes compared with in vitro glucotoxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294: E740-E751.
31. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: E45.
32. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H: Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 477-503.
33. Goto M: Inflammaging (inflammation + aging): A driving force for human aging based on an evolutionarily antagonistic pleiotropy theory? *Biosci Trends* 2008; 2: 218-230.
34. Higami Y, Shimokawa I: Apoptosis in the aging process. *Cell Tissue Res* 2000; 301: 125-132.
35. Aggarwal S, Gollapudi S, Gupta S: Increased TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in lymphocytes from aged humans: Changes in TNF-  $\alpha$  receptor expression and activation of caspases. *J Immunol* 1999; 162: 2154–2161.
36. Candolfi M, Zaldivar V, De Laurentiis A, Jaita G, Pisera D, Seilicovich A: TNF-alpha induces apoptosis of lactotropes from female rats. *Endocrinology* 2002; 143: 3611-3617.



37. Schumacher B, Hoeijmakers JH, Garinis GA: Sealing the gap between nuclear DNA damage and longevity. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 299: 112-117.
38. Goukassian D, Gad F, Yaar M, Eller MS, Nehal US, Gilchrest BA: Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB J* 2000; 14:1325–1334.
39. Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC: Mitochondrial glutathione a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 2685-2700.
40. Arslan MA, Csermely P, Soti C: Protein homeostasis and molecular chaperones in aging. *Biogerontology* 2006; 7: 383-389.
41. Haigis MC, Yankner BA: The aging stress response. *Mol Cell* 2010; 40: 333-344.
42. Morimoto RI: Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev* 2008; 22: 1427-1438.
43. Morrow G, Samson M, Michaud S, Tanguay RM: Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *FASEB J* 2004; 18: 598-599.
44. Yamamoto T, Katsumata N, Tachibana K, Friesen HG, Nagy JI: Distribution of a novel peptide in the anterior pituitary gastric pyloric gland and pancreatic islets of rat. *J Histochem Cytochem* 1992; 40:221-229.
45. Graf R, Schiesser M, Lüssi A, Went P, Scheele GA, Bimmler D: Coordinate regulation of secretory stress proteins (PSP/reg PAP I PAP II and PAP III) in the rat exocrine pancreas during experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 2002; 105: 136-144.
46. Katsumata N, Chakraborty C, Myal Y, Schroedter IC, Murphy LJ, Shiu RP, Friesen HG: Molecular cloning and expression of peptide 23 a growth hormone-releasing hormone-inducible pituitary protein. *Endocrinology* 1995; 136: 1332-1339.

47. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B: The aging of the immune system. *Transpl Int* 2009; 22: 1041-1050.
48. Reichwald J, Danner S, Wiederhold KH, Staufenbiel M: Expression of complement system components during aging and amyloid deposition in APP transgenic mice. *J Neuroinflammation* 2009; 6: 35.
49. Lu JH, Teh BK, Wang L, Wang YN, Tan YS, Lai MC, Reid KB: The classical and regulatory functions of C1q in immunity and autoimmunity. *Cell Mol Immunol* 2008; 5: 9-21.
50. Chen J, Saxena G, Mungrue IN, Lusic AJ, Shalev A: Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis. *Diabetes* 2008; 57: 938-944.
51. Lee CK, Weindruch R, Prolla TA: Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet* 2000; 25: 294-297.
52. De Magalhães JP, Curado J, Church GM: Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics* 2009; 25: 875-881.
53. Velasco B, Cacicedo L, Escalada J, Lopez-Fernandez J, Sanchez-Franco F: Growth hormone gene expression and secretion in aging rats is age dependent and not age-associated weight increase related. *Endocrinology* 1998; 139: 1314-1320.
54. Goldstein S, Moerman EJ, Baxter RC: Accumulation of insulin-like growth factor binding protein-3 in conditioned medium of human fibroblasts increases with chronologic age of donor and senescence in vitro. *J Cell Physiol* 1993; 156: 294-302.
55. Kim KS, Kim MS, Seu YB, Chung HY, Kim JH, Kim JR: Regulation of replicative senescence by insulin-like growth factor-binding protein 3 in human umbilical vein endothelial cells. *Aging Cell* 2007; 6: 535-545.

56. Yamada PM, Lee KW: Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs systemic action. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 296: C954-976.
57. De Gennaro Colonna V, Fidone F, Cocchi D, Müller EE: Feedback effects of growth hormone on growth hormone-releasing hormone and somatostatin are not evident in aged rats. *Neurobiol Aging* 1993; 14: 503-507.
58. Heydari AR, Wu B, Takahashi R, Strong R, Richardson A: Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 2909-2918.
59. Moore SA, Lopez A, Richardson A, Pahlavani MA: Effect of age and dietary restriction on expression of heat shock protein 70 in rat alveolar macrophages. *Mech Ageing Dev* 1998; 104:59–73.
60. Sharma S, Singh R, Kaur M, Kaur G: Late-onset dietary restriction compensates for age-related increase in oxidative stress and alterations of HSP 70 and synapsin 1 protein levels in male Wistar rats. *Biogerontology* 2010; 11: 197-209.
61. Wu P, Jiang C, Shen Q, Hu Y: Systematic gene expression profile of hypothalamus in calorie-restricted mice implicates the involvement of mTOR signaling in neuroprotective activity. *Mech Ageing Dev* 2009; 130: 602-610.
62. Cederroth CR, Nef S: Soy phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 304: 30-42.
63. Morel G, Gallego R, Boulanger L, Pintos E, Garcia-Caballero T, Gaudreau P: Restricted presence of the growth hormone-releasing hormone receptor to somatotropes in rat and human pituitaries. *Neuroendocrinology* 1999; 70:128-36.

**TABLE 1: Effect of age and diet on BW, BMI and serum hormone concentrations**

Group	Three-month old	Twenty-month old		
	Casein-AL (3CA)	Casein-AL (20CA)	Casein-CR (20CR)	Soy-AL (20SA)
<b>BW (g)</b>	468 ± 12	930 ± 42 <sup>a</sup>	539 ± 19 <sup>b,c</sup>	938 ± 50 <sup>a</sup>
<b>BMI</b>	0,697 ± 0,021	1,038 ± 0,052 <sup>a</sup>	0,677 ± 0,024 <sup>b,c</sup>	1,077 ± 0,045 <sup>a</sup>
<b>Leptin (ng/mL)</b>	3,2 ± 0,7	66,3 ± 11,2 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,8 <sup>b,c</sup>	58,6 ± 9,5 <sup>a</sup>
<b>Insulin (ng/mL)</b>	6,2 ± 0,7	10,9 ± 3,0	4,5 ± 1,5	9,0 ± 2,5
<b>IGF-1 (ng/mL)</b>	1245 ± 131	832 ± 80 <sup>d</sup>	708 ± 27 <sup>a</sup>	729 ± 18 <sup>a</sup>
<b>IGFBP3 (ng/mL)</b>	419 ± 26	263 ± 27 <sup>a</sup>	207 ± 7 <sup>a</sup>	193 ± 9 <sup>a</sup>

Values represent the mean ± SEM of sample tested from 4-7 rats.

<sup>a</sup>  $P < 0,001$  compared to 3-month-old casein AL rats

<sup>b</sup>  $P < 0,001$  compared to 20-month-old casein AL rats

<sup>c</sup>  $P < 0,001$  compared to 20-month-old soy AL rats

<sup>d</sup>  $P < 0,01$  compared to 3-month-old casein AL rats

**TABLE 2 : Most significant biological functions represented among regulated genes****A- Effect of aging**

<b>Category</b>	<b>P-value</b>	<b>Total genes</b>	<b>Up-regulated</b>	<b>Down-regulated</b>
<b>ANTERIOR PITUITARY</b>				
Cell Death	3,51E-04 - 4,86E-02	185	129	56
Cell Movement	5,66E-04 - 4,85E-02	56	42	14
Gene Expression	9,96E-04 - 3,6E-02	12	12	0
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	1,31E-03 - 3,6E-02	42	23	19
Cell Development	2,03E-03 - 4,85E-02	61	45	16
<b>HYPOTHALAMUS</b>				
Cell Death	1,19E-03 - 4,35E-02	19	12	7
Cell Signaling	1,41E-03 - 4,03E-02	12	3	9
Small Molecule Biochemistry	1,41E-03 - 4,45E-02	36	10	26
Cell Cycle	1,77E-03 - 3,54E-02	4	3	1
Lipid Metabolism	1,82E-03 - 3,54E-02	11	1	10

**B- Effect of LTMCR**

<b>Category</b>	<b>P-value</b>	<b>Total genes</b>	<b>Up-regulated</b>	<b>Down-regulated</b>
<b>ANTERIOR PITUITARY</b>				
Cell Growth and Proliferation	9,91E-04 - 3,77E-02	5	1	4
Cell Morphology	3,86E-03 - 2,84E-02	6	1	5
Protein Synthesis	4,46E-03 - 4,68E-02	7	2	5
Cell Signaling	5,59E-03 - 4,68E-02	4	2	2
Molecular Transport	6,57E-03 - 3,77E-02	6	2	4
<b>HYPOTHALAMUS</b>				
Cell Death	3,41E-03 - 2,17E-02	5	3	2
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	3,41E-03 - 3,36E-02	4	2	2
Cell Assembly and Organization	3,41E-03 - 4,02E-02	2	1	1
Cell Compromise	3,41E-03 - 1,36E-02	2	1	1
Cell Growth and Proliferation	3,41E-03 - 6,81E-03	1	1	0

**TABLE 3: List of genes regulated by aging and LTMCR in the anterior pituitary ( $P < 0.05$  ;  $FC \geq 1.3$ )**

Gene symbol	Gene title	RefSeq transcript ID	P value	Fold change	
				Effect of aging (20CA-3CA)	Effect of LTMCR (20CR-20CA)
Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3	NM_012588	0,0037	<b>2,89</b>	<b>-2,33</b>
Serping1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	NM_199093	0,0105	<b>2,28</b>	<b>-1,76</b>
Ptp4a3	protein tyrosine phosphatase 4a3 (predicted)	NM_001114405	0,0012	<b>1,93</b>	<b>-1,74</b>
Syn2	synapsin II	NM_001034020	0,0398	<b>1,88</b>	<b>-1,73</b>
Arsb	arylsulfatase B	NM_033443	0,0172	<b>1,83</b>	<b>-1,64</b>
Vegfa	vascular endothelial growth factor A	NM_001110333	0,0398	<b>1,82</b>	<b>-1,74</b>
Palmd	palmdelphin	NM_001025688	0,0396	<b>1,78</b>	<b>1,47</b>
Glrx1	glutaredoxin 1 (thioltransferase)	NM_022278	0,0171	<b>1,77</b>	<b>-1,42</b>
Myh14	myosin, heavy polypeptide 14	NM_001100690	0,0371	<b>1,73</b>	<b>-1,39</b>
Robo2	Roundabout homolog 2 (Drosophila)	XM_001064680	0,0391	<b>1,73</b>	<b>-1,88</b>
Edg1	endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1	NM_017301	0,0424	<b>1,66</b>	<b>-1,42</b>
Pah	phenylalanine hydroxylase	NM_012619	0,0293	<b>1,65</b>	<b>-1,58</b>
Lgals3bp	lectin, galactoside-binding, soluble 3 binding protein	NM_139096	0,0377	<b>1,64</b>	<b>-1,32</b>
Atp5s	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit s	NM_001007749	0,0437	<b>1,63</b>	<b>-1,31</b>
F2r	coagulation factor II (thrombin) receptor	NM_012950	0,0221	<b>1,61</b>	<b>-1,76</b>
Slc43a2	solute carrier family 43, member 2 (predicted)	NM_001105812	0,0238	<b>1,61</b>	<b>-1,47</b>
Npas2	neuronal PAS domain protein 2 (predicted)	NM_001108214	0,0201	<b>1,58</b>	<b>-1,59</b>
Tgfbi	transforming growth factor, beta induced	XM_001067964	0,0422	<b>1,57</b>	<b>-1,36</b>
Shank2	SH3/ankyrin domain gene 2	NM_001004133	0,0455	<b>1,54</b>	<b>-1,36</b>
Rrm1	ribonucleotide reductase M1	NM_001013236	0,0100	<b>1,53</b>	<b>-1,35</b>
Galm	galactose mutarotase	NM_001007704	0,0088	<b>1,52</b>	<b>-1,33</b>
Chchd6	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6 (predicted)	NM_001106608	0,0011	<b>1,51</b>	<b>-1,35</b>
Tfpi	tissue factor pathway inhibitor	NM_017200	0,0006	<b>1,50</b>	<b>-1,38</b>
H2afj	H2A histone family, member J	NM_001109610	0,0026	<b>1,49</b>	<b>-1,46</b>
Bat5	HLA-B associated transcript 5	NM_212531	0,0229	<b>1,47</b>	<b>-1,32</b>
Trim24	tripartite motif-containing 24	NM_001044266	0,0203	<b>1,43</b>	<b>-1,32</b>
Mettl7a	methyltransferase like 7A	NM_001037355	0,0061	<b>1,43</b>	<b>1,32</b>
Klc1	kinesin light chain 1	NM_001081972	0,0336	<b>1,43</b>	<b>-1,37</b>
Cd151	CD151 antigen (Raph blood group)	NM_022523	0,0113	<b>1,43</b>	<b>-1,32</b>
Slco3a1	Solute carrier organic anion transporter family, member 3a1	NM_177481	0,0254	<b>1,41</b>	<b>-1,44</b>
Camk2d	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	NM_012519	0,0326	<b>1,41</b>	<b>-1,31</b>
Gmpr	guanosine monophosphate reductase	NM_057188	0,0241	<b>1,34</b>	<b>-1,30</b>
Mrps18a	mitochondrial ribosomal protein S18A	NM_198756	0,0011	<b>1,34</b>	<b>-1,32</b>
Vrk1	vaccinia related kinase 1	NM_001012194	0,0182	<b>1,33</b>	<b>-1,30</b>
Igfbp7	insulin-like growth factor binding protein 7	NM_001013048	0,0493	<b>1,32</b>	<b>-1,42</b>
Syncrip	Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	NM_001047916	0,0066	<b>-1,40</b>	<b>1,34</b>
Fkbp14	FK506 binding protein 14	NM_001013210	0,0285	<b>-1,52</b>	<b>1,42</b>
Adamtsl4	ADAMTS-like 4	NM_001034012	0,0229	<b>-1,75</b>	<b>1,61</b>
Svil	supervillin (predicted)	NM_001108416	0,0206	<b>-2,06</b>	<b>1,89</b>
Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	NM_012731	0,0377	<b>-2,35</b>	<b>1,31</b>

FIGURE 1

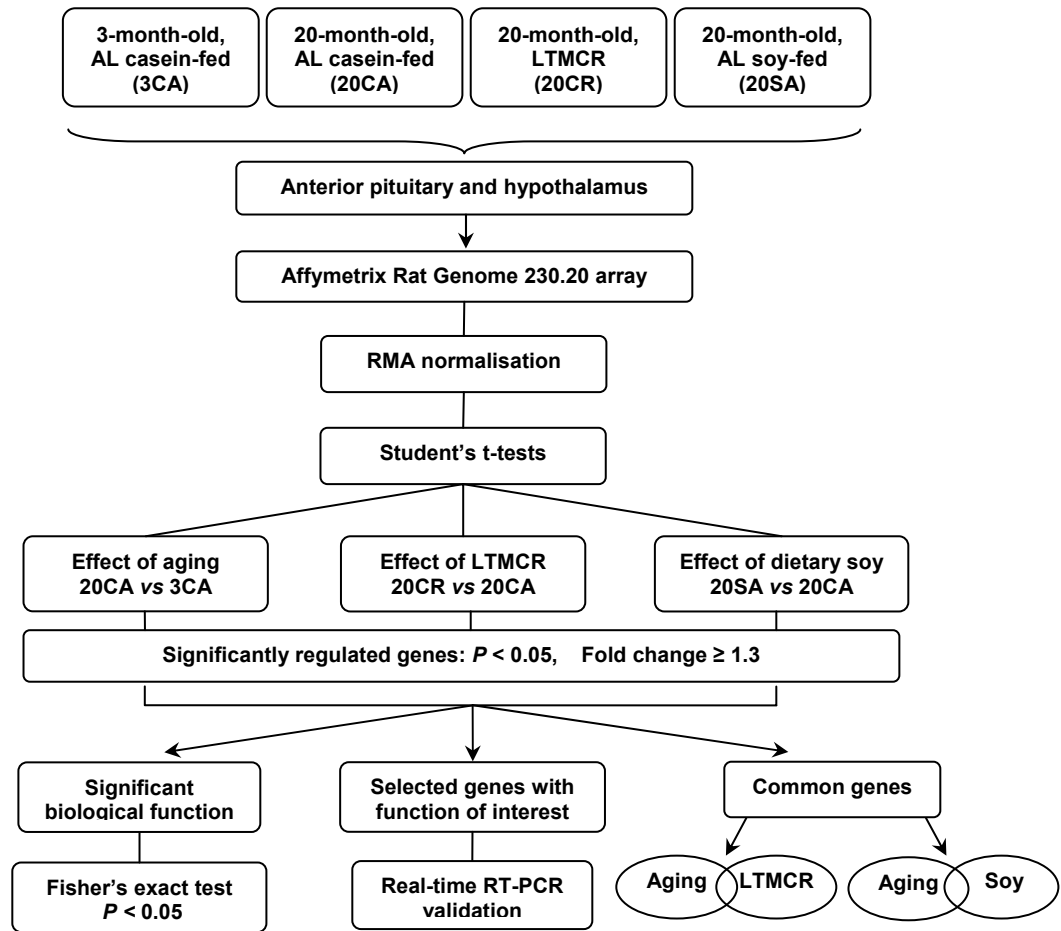
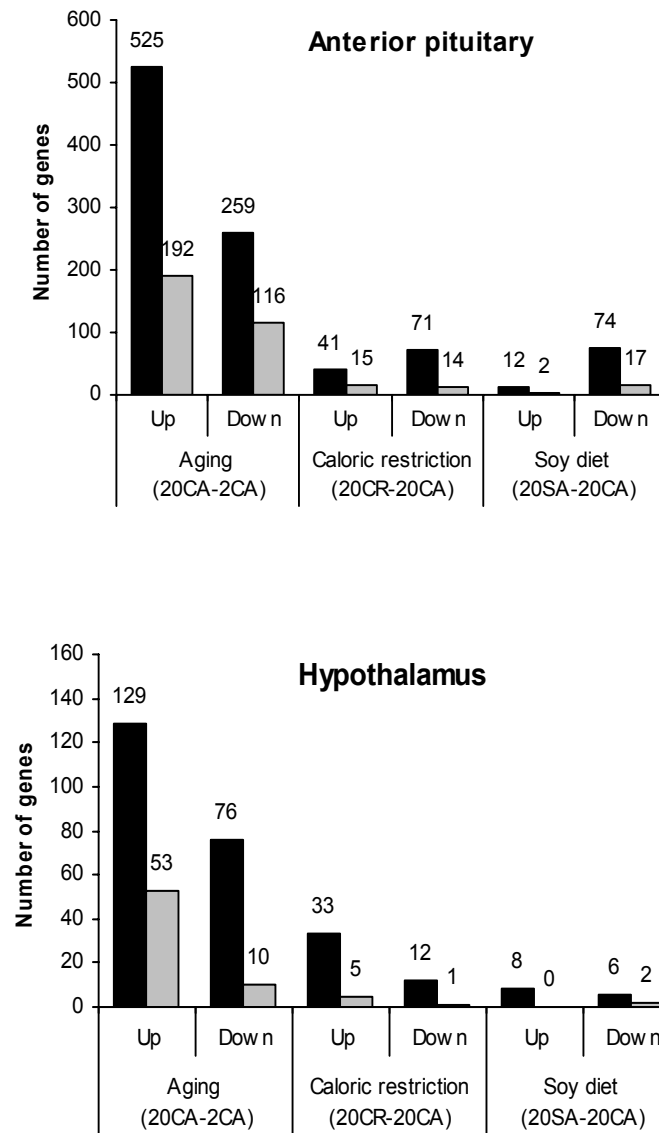


FIG. 1. Schematic experimental design and analysis of microarray data

FIGURE 2

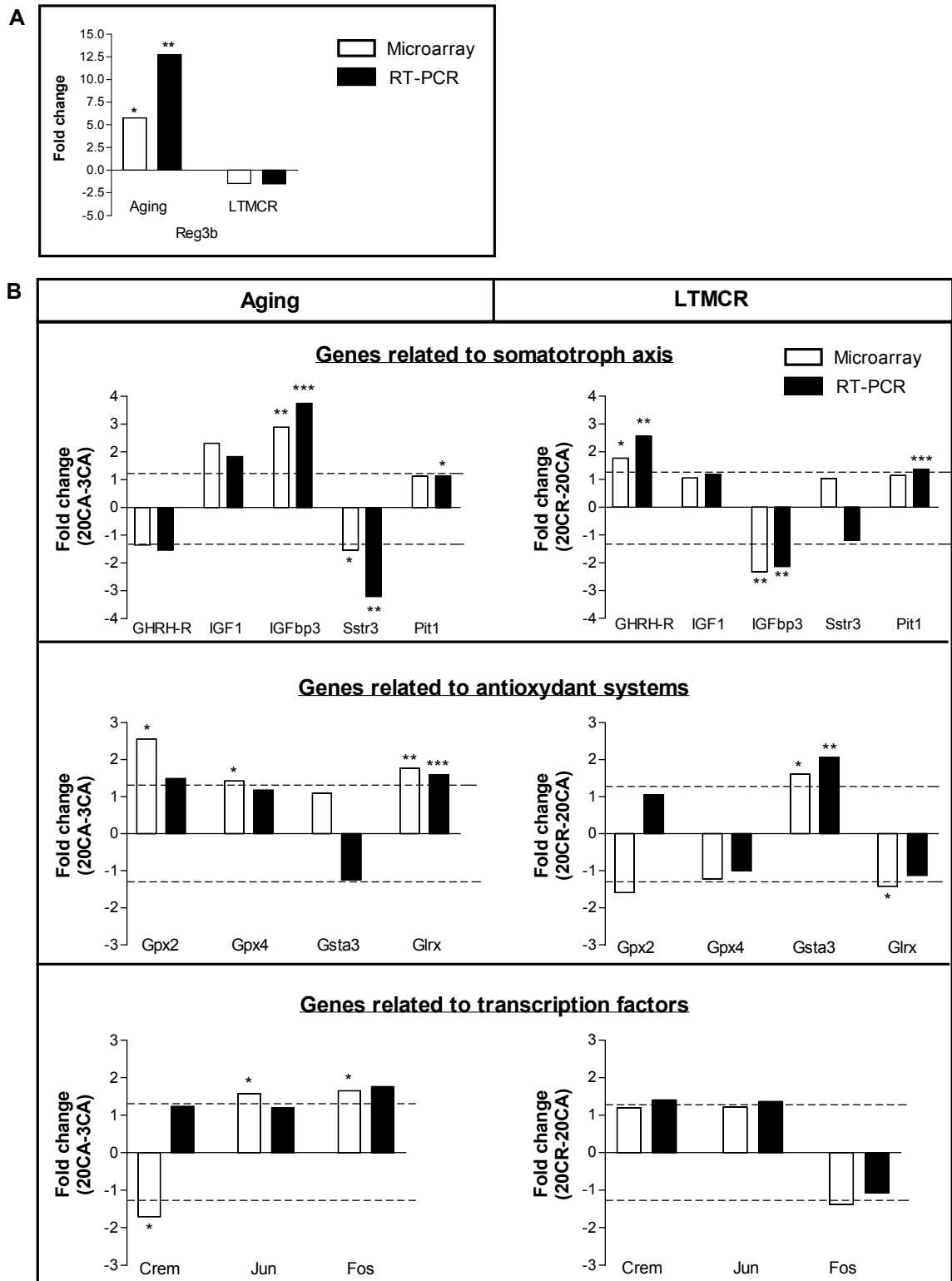


**FIG. 2.** Number of differentially expressed genes in the anterior pituitary and hypothalamus.

The number of significant genes up- or down-regulated with aging, LTMCR and soy diet in rat anterior pituitary (A) and hypothalamus (B). Black and grey bars represent a FC  $\geq 1.30$  and  $\geq 1.5$ , respectively.



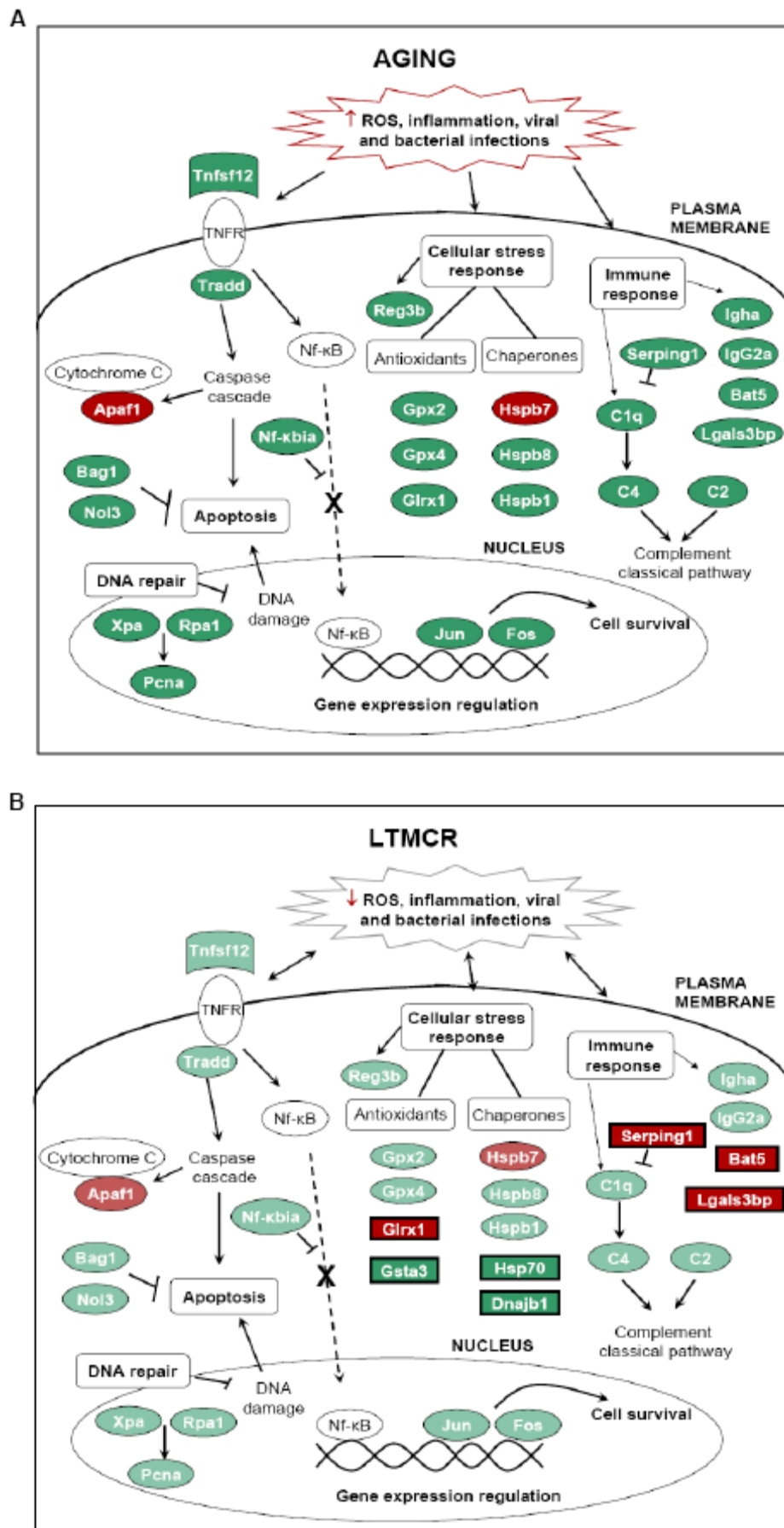
FIGURE 3



**FIG. 3.** Real-time RT-PCR validation of selected genes in the anterior pituitary.

Comparative expression levels of selected genes regulated by aging (20CA/3CA) and LTMCR (20CR/20CA) as determined by microarray *vs* real-time RT-PCR. For real-time RT-PCR experiments, mRNA levels were normalized using GAPDH levels. Results represent the mean ratio of relative mRNA levels of 3-4 rats performed in triplicate. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

FIGURE 4



**FIG. 4.** Schematic proposed mechanisms of cell response to aging (A) and LTMCR (B) in the anterior pituitary.

In A and B, the green and red structures represent genes that were respectively up- and down-regulated. In B, darkest colors represent genes that were specifically regulated by LTMCR.

Apaf1: apoptotic peptidase activating factor 1, Bag1: B-cell lymphoma 2-associated athanogene, Bat5: HLA-B associated transcript 5, C1q: complement component 1 q subcomponent, C3: complement component 3, C4: complement component 4, Dnajb1: Hsp 40 homolog subfamily B member 1, Fos: FBJ osteosarcoma oncogene, Glrx1: glutaredoxin 1, Gpx2: glutathione peroxidase 2, Gpx4: glutathione peroxidase 4, Gsta3: glutathione s-transferase alpha 3, Hspb1: heat-shock 27kDa protein 1, Hspb7: heat-shock protein family member 7, Hspb8: heat shock 22kDa protein 8, Hsp70: Hsp70 protein 1A, IgG-2a: gamma-2a immunoglobulin heavy chain, Igha: immunoglobulin heavy chain alpha, Jun: Jun oncogene, Lgals3bp: lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein, NF- $\kappa$ B: NF-kappa-B, NF- $\kappa$ bia : NF- $\kappa$ B inhibitor alpha2, Nol3: nucleolar protein 3, Pcna: proliferating cell nuclear antigen, Reg3b: regenerating islet-derived 3 beta, Rpa1: replication protein A1, 70 kDa, Serping1: serine peptidase inhibitor, clade G, member 1, Tnfsf12: tumor necrosis factor (TNF) superfamily member 12, TNFR: TNF receptor, Tradd: TNF receptor superfamily member 1 alpha-associated *via* death domain, Xpa: xeroderma pigmentosum, complementation group A.

Supplemental Table 1: Primers used for real-time RT-PCR validation

Gene ID	NCBI accession number	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon length (bp)
rat $\beta$ -actin	NM_031144.2	ATCGCTGACAGGATGCAGAAG	AGAGCCACCAATCCACACAGA	58	108
rat Cart	NM_017110	AACGCATTCCGATCTATGAG	TCACAAGCACTTCAAGAGGA	54	152
rat Ccnd2	NM_022267	TCTGTGTGCTACCGACTTCA	AGGCTTTGAGACAATCCACA	54	179
rat Cdkn2c	NM_131902	CGCTGCAGGTTATGAAACTT	GAACTCCAGCAAAGCCTGTA	54	153
rat Crem	NM_001110860	AGAGGAAGAAGGGACACCAC	GCTGATTGTGCTGCATACTG	58	220
rat Crem-3'	NM_001110860	CAGTATGCAGCACAATCAGC	CCTTGTGGCAAAGCAGTAGT	58	189
rat Fos	NM_022197.2	AGTAGAGCAGCTATCTCCTG	GGGCTGCCAAAATAAACTCC	56	215
rat Gal	NM_033237	GATGCCAACAAAGGAGAAGA	AGCAACACTTCCTAGTCTCC	58	163
rat GAPDH	NM_017008.3	AGGGCTGCCTTCTTGTGAC	TGGGTAGAATCATACTGGAACATGTAG	58	101
rat GHRH	NM_031577	ATGCCACTCTGGGTGTTCTTT	GCAGTTTGCGGGCATATAAT	58	157
rat GHRH-R	NM_012850	CTGCTGTCTTCAGGGTGAT	TAGGAGATGTGGAGGCCAAC	58	159
rat Glrx1	NM_022278.1	TCCTCAGTCAACTGCCTTTC	TCCGCCTATGCAGTCTTTAC	58	152
rat Gpx2	NM_183403.2	TCGGACATCAGGAGAACTGT	GTAGGGCAGCTTGTCTTTCA	60	164
rat Gpx2-3'	NM_183403.2	TGAAAGACAAGCTGCCCTAC	GATGTTGATGGTCTGGAAGG	60	179
rat Gpx4	NM_017165.2	CTGGATAAGTACAGGGGTTG	TGATTACTTCCTGGCTCCTG	56	176
rat Gpx4-3'	NM_017165.2	CTGTGTAATGGGGACGATG	TAGAGATAGCACGGCAGGTC	60	195
rat Gsta3	NM_031509.2	GGCTAAGGAATGATGGGAGT	GGGGAATGTAAGGGTAATGG	56	214
rat Hcrtr1	NM_013064	GCTGGTTTTTGCCTCTGTT	ATTTGCCACTGAGGAAGTTG	56	182
rat IGF-1	NM_001082477.2	TACTTCAACAAGCCCACAGG	CTTCTGAGCTTGGGCATGT	58	189
rat IGFbp3	NM_012588.1	CGTCTCCTGGAAACACCACT	AGTTCTGGGTGTCTGTGC	60	204
rat Jun	NM_021835.3	ATCGACATGGAGTCTCAGGA	GTTTAAGCTGTGCCACCTGT	58	196
rat Jun-3'	NM_021835.3	GCTCCGTAAGAACACAAAAGC	CTTACAAAGGCAGGAAGCTG	58	180
rat Pit1	NM_013008.2	CAGGTCGGAGCTTTGTACAA	TTCACCCGTTTTTCTCTCTG	58	224
rat Reg3b	S77413	TCCTGCCTGATGCTCTTATC	GCCAGTTCTGCATCAAACCA	58	155
rat SRIF	NM_0126559	CTCTGCATCGTCTGGCTTT	GCATCGTTCTCTGTCTGGTT	58	164
rat SSTR3	NM_133522.1	TCTCTGGTGTACCTGGTGGT	AGACGACACATGAGAGAGCC	60	212
rat Stat1	NM_032612	TGTGAAGCTGAGACTGTTGG	GAACTCAGCTGCCAAACTTC	58	187
rat Stat2	NM_001011905.1	AAGGGGTGGACCTGCAGAA	TCACCAGCAGTCTTGTTCGG	58	162

**Supplemental Table 2: List of genes regulated by aging in the anterior pituitary (P < 0.05 ; FC ≥ 1.3)**

Gene Symbol	Gene Title	RefSeq Transcript ID	P value	Fold Change	Gene Ontology Biological Process
<b>Up-regulated</b>					
Reg3b	regenerating islet-derived 3 beta	NM_053289	0,0042	<b>5,77</b>	0006953 // acute-phase response
Igha_mapped	immunoglobulin heavy chain (alpha polypeptide) (mapped)	NM_001014264	0,0018	<b>5,41</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
IgG-2a	gamma-2a immunoglobulin heavy chain		0,0214	<b>3,88</b>	
C4-2	complement component 4, gene 2	NM_001002805	0,0158	<b>3,51</b>	0001569 // patterning of blood vessels
Pcsk2	proprotein convertase subtilisin/kexin type 2	NM_012746	0,0000	<b>3,42</b>	0006508 // proteolysis
Slc6a15	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 15	NM_172321	0,0097	<b>3,33</b>	0006810 // transport
Olfm3	olfactomedin 3	NM_145777	0,0021	<b>3,32</b>	0042462 // eye photoreceptor cell development
Krt25	keratin 25	NM_001008822	0,0137	<b>3,22</b>	
Apod	apolipoprotein D	NM_012777	0,0126	<b>3,19</b>	0006810 // transport
Sez6	seizure related gene 6	XM_001080832	0,0007	<b>2,96</b>	
Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3	NM_012588	0,0039	<b>2,89</b>	0001558 // regulation of cell growth
Klk1b3	kallikrein 1-related peptidase b3	NM_031523	0,0005	<b>2,64</b>	0006508 // proteolysis
Tagln3	transgelin 3	NM_001035236	0,0344	<b>2,56</b>	0007517 // muscle development
Gpx2	glutathione peroxidase 2	NM_183403	0,0197	<b>2,56</b>	0001659 // temperature homeostasis
Akr1c19	aldo-keto reductase family 1, member C19	NM_001100576	0,0043	<b>2,50</b>	
Kcnc2	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 2	NM_139216	0,0025	<b>2,40</b>	0006810 // transport
Cldn7	claudin 7	NM_031702	0,0197	<b>2,40</b>	0016338 // calcium-independent cell-cell adhesion
C1qa	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	NM_001008515	0,0157	<b>2,37</b>	0006817 // phosphate transport

Nol3	nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	NM_053516	0,0022	<b>2,36</b>	0001666 // response to hypoxia
Cpxm2	carboxypeptidase X 2 (M14 family) (predicted)	NM_001106306	0,0066	<b>2,29</b>	0006508 // proteolysis
Rasd1	RAS, dexamethasone-induced 1	XM_001077321	0,0096	<b>2,28</b>	0007263 // nitric oxide mediated signal transduction
Serping1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	NM_199093	0,0023	<b>2,28</b>	0006955 // immune response
Trhr	thyrotropin releasing hormone receptor	NM_013047	0,0055	<b>2,26</b>	0007165 // signal transduction
Slco4a1	solute carrier organic anion transporter family, member 4a1	NM_133608	0,0169	<b>2,23</b>	0006810 // transport
Ascl1	achaete-scute complex homolog-like 1	NM_022384	0,0153	<b>2,23</b>	0001764 // neuron migration
Ngb	neuroglobin	NM_033359	0,0019	<b>2,21</b>	0006810 // transport
Sncb	synuclein, beta	NM_080777	0,0015	<b>2,19</b>	0042417 // dopamine metabolic process
Fmo5	flavin containing monooxygenase 5	NM_144739	0,0002	<b>2,19</b>	0055114 // oxidation reduction
Rgs5	regulator of G-protein signaling 5	NM_019341	0,0446	<b>2,16</b>	0007165 // signal transduction
Lrrc4c	leucine rich repeat containing 4C (predicted)	NM_001107753	0,0000	<b>2,15</b>	0050770 // regulation of axonogenesis
C1qc	complement component 1, q subcomponent, C chain	NM_001008524	0,0055	<b>2,14</b>	0006817 // phosphate transport
Ifi2712b	interferon, alpha-inducible protein 27 like 2B	NM_206846	0,0211	<b>2,12</b>	
Nol4	nucleolar protein 4 (predicted)	NM_001107401	0,0071	<b>2,11</b>	
Gfra3	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 3	NM_053398	0,0018	<b>2,09</b>	0001764 // neuron migration
Gucy1a3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	NM_017090	0,0016	<b>2,08</b>	0006182 // cGMP biosynthetic process
Lgals1	lectin, galactose binding, soluble 1	NM_019904	0,0039	<b>2,06</b>	0043123 // positive regulation of I-kappaB kinase/ NF-kappaB cascade
Nt5dc1	5'-nucleotidase domain containing 1 (predicted)	NM_001106393	0,0118	<b>1,99</b>	
Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	NM_053843	0,0048	<b>1,99</b>	0001788 // antibody-dependent cellular cytotoxicity
Zc3h6	zinc finger CCCH type containing 6 (predicted)	NM_001107772	0,0420	<b>1,98</b>	
Htra1	HtrA serine peptidase 1	NM_031721	0,0004	<b>1,97</b>	0001558 // regulation of cell growth

Abhd3	abhydrolase domain containing 3 (predicted)	NM_001106162	0,0375	<b>1,96</b>	
Apoe	apolipoprotein E	NM_138828	0,0200	<b>1,95</b>	0001937 // negative regulation of endothelial cell proliferation
Suds3	suppressor of defective silencing 3 homolog (S. cerevisiae)	XM_001080131	0,0018	<b>1,95</b>	0016481 // negative regulation of transcription
Ptgds	prostaglandin D2 synthase (brain)	NM_013015	0,0242	<b>1,95</b>	0001516 // prostaglandin biosynthetic process
Pcdh19	protocadherin 19 (predicted)	XM_001067802	0,0046	<b>1,95</b>	
Myo1b	myosin Ib	NM_053986	0,0039	<b>1,93</b>	0007399 // nervous system development
Gabra1	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 1	NM_183326	0,0144	<b>1,93</b>	0006810 // transport
Ptp4a3	protein tyrosine phosphatase 4a3 (predicted)	NM_001114405	0,0053	<b>1,93</b>	0006470 // protein amino acid dephosphorylation
Crtac1	cartilage acidic protein 1	XM_001059110	0,0435	<b>1,92</b>	
Plcb1	phospholipase C, beta 1	NM_001077641	0,0139	<b>1,91</b>	0006800 // oxygen and reactive oxygen species metabolic process
Gabrg2	gamma-aminobutyric acid A receptor, gamma 2	NM_183327	0,0016	<b>1,91</b>	0006810 // transport
Rhobtb3	Rho-related BTB domain containing 3 (predicted)	NM_001107645	0,0015	<b>1,90</b>	
Rps6ka4	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 4	NM_001108517	0,0023	<b>1,90</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Chd1l	chromodomain helicase DNA binding protein 1-like (predicted)	NM_001107704	0,0023	<b>1,90</b>	
Plekhb1	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 1	NM_172033	0,0006	<b>1,89</b>	0045595 // regulation of cell differentiation
Mllt3	myeloid/lymphoid or mixed lineage-leukemia translocation to 3 homolog	NM_053718	0,0196	<b>1,88</b>	0006355 // regulation of transcription, DNA-dependent
Syn2	synapsin II	NM_001034020	0,0271	<b>1,88</b>	0007269 // neurotransmitter secretion
Cdcp1	CUB domain containing protein 1 (predicted)	NM_001106869	0,0192	<b>1,87</b>	
Bruno15	bruno-like 5, RNA binding protein	XM_001075513	0,0233	<b>1,87</b>	
Gria4	glutamate receptor, ionotropic, AMPA4	NM_001113184	0,0013	<b>1,86</b>	0006810 // transport
Myo1d	myosin ID	NM_012983	0,0228	<b>1,84</b>	0006810 // transport



Pap2d	phosphatidic acid phosphatase type 2	NM_001107720	0,0039	<b>1,84</b>	
Ahcy12	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2	XM_001062287	0,0107	<b>1,84</b>	
Tcfcp2l2	transcription factor CP2-like 2	NM_001037354	0,0398	<b>1,84</b>	
Arsb	arylsulfatase B	NM_033443	0,0087	<b>1,83</b>	0006914 // autophagy
Hspb1	heat shock protein 1	NM_031970	0,0210	<b>1,82</b>	0006916 // anti-apoptosis
Vegfa	vascular endothelial growth factor A	NM_001110333	0,0177	<b>1,82</b>	0001525 // angiogenesis
Agtr1b	angiotensin receptor 1b	NM_031009	0,0428	<b>1,82</b>	0001568 // blood vessel development
Cdkn1c	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	NM_001033757	0,0259	<b>1,81</b>	0007050 // cell cycle arrest
Kitl	kit ligand	NM_021843	0,0060	<b>1,80</b>	0001541 // ovarian follicle development
Gulp1	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1	NM_001013171	0,0045	<b>1,79</b>	0006810 // transport
Gpha2	glycoprotein hormone alpha 2	NM_133619	0,0252	<b>1,78</b>	
Cadps2	Ca2+-dependent activator protein for secretion 2	XM_001060172	0,0023	<b>1,78</b>	0045921 // positive regulation of exocytosis
Accn4	amiloride-sensitive cation channel 4, pituitary	NM_022234	0,0023	<b>1,77</b>	0006810 // transport
Khdrbs2	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 2	NM_133318	0,0352	<b>1,77</b>	0006350 // transcription
Aqp1	aquaporin 1	NM_012778	0,0275	<b>1,77</b>	0006810 // transport
Glx1	glutaredoxin 1 (thioltransferase)	NM_022278	0,0038	<b>1,77</b>	0006810 // transport
Sox4	SRY-box containing gene 4 (predicted)	XM_001068302	0,0006	<b>1,77</b>	0001666 // response to hypoxia
Fam80b	family with sequence similarity 80, member B	XM_001060530	0,0103	<b>1,76</b>	
Ifitm1	interferon induced transmembrane protein 1 (predicted)	NM_001106314	0,0023	<b>1,76</b>	0009607 // response to biotic stimulus
Fam117a	family with sequence similarity 117, member A	NM_001109039	0,0484	<b>1,76</b>	
Rwdd3	RWD domain containing 3	XM_001074742	0,0155	<b>1,75</b>	
Fcgrt	Fc receptor, IgG, alpha chain transporter	NM_033351	0,0012	<b>1,75</b>	0006955 // immune response
Tenc1	tensin like C1 domain containing phosphatase (predicted)	NM_001108114	0,0035	<b>1,75</b>	0006470 // protein amino acid dephosphorylation
Gpr162	G protein-coupled receptor 162 (predicted)	NM_001108646	0,0034	<b>1,74</b>	0007186 // G-protein coupled receptor protein signaling pathway

Myh14	myosin, heavy polypeptide 14	NM_001100690	0,0037	<b>1,73</b>	0030048 // actin filament-based movement
Robo2	Roundabout homolog 2	XM_001064680	0,0496	<b>1,73</b>	0007411// axon guidance
Dync1i1	dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 1	NM_019234	0,0004	<b>1,71</b>	0047496 // vesicle transport along microtubule
Zbtb4	zinc finger and BTB domain containing 4 (predicted)	XM_001079524	0,0017	<b>1,71</b>	0007186 // G-protein coupled receptor protein signaling pathway
Plk2	polo-like kinase 2	NM_031821	0,0276	<b>1,71</b>	0000278 // mitotic cell cycle
Fam110b	family with sequence similarity 110, member B	NM_001024341	0,0115	<b>1,70</b>	
Ssfa2	sperm specific antigen 2 (predicted)	NM_001107738	0,0173	<b>1,70</b>	
Ap1s2	adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit (predicted)	XM_001068004	0,0067	<b>1,69</b>	
Pgcp	plasma glutamate carboxypeptidase	NM_031640	0,0004	<b>1,68</b>	0006508 // proteolysis
Igf2	insulin-like growth factor 2	NM_031511	0,0093	<b>1,68</b>	0008283 // cell proliferation
Hsf4	heat shock transcription factor 4 (predicted)	NM_001106177	0,0197	<b>1,68</b>	0001654 // eye development
Dgkb	diacylglycerol kinase, beta	NM_019304	0,0355	<b>1,68</b>	0007205 // activation of protein kinase C activity
Fam151b	family with sequence similarity 151, member B	XM_001066002	0,0034	<b>1,67</b>	
Edg1	endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1	NM_017301	0,0125	<b>1,66</b>	0001525 // angiogenesis
Kcnq2	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 2	NM_133322	0,0124	<b>1,66</b>	0006810 // transport
C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	NM_019262	0,0418	<b>1,66</b>	0006817 // phosphate transport
Pah	phenylalanine hydroxylase	NM_012619	0,0207	<b>1,65</b>	0006558 // L-phenylalanine metabolic process
Etv1	ets variant gene 1 (predicted)	NM_001108709	0,0271	<b>1,65</b>	0007411 // axon guidance
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	NM_022197	0,0181	<b>1,65</b>	0006355 // regulation of transcription, DNA-dependent
Cndp2	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)	NM_001010920	0,0479	<b>1,65</b>	0006508 // proteolysis
Sept_4	septin 4	NM_001011893	0,0281	<b>1,64</b>	0007049 // cell cycle
Sh3kbp1	SH3-domain kinase binding protein 1	NM_053360	0,0035	<b>1,64</b>	0006897 // endocytosis
Anxa4	annexin A4	NM_024155	0,0000	<b>1,64</b>	0006887 // exocytosis

Lgals3bp	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	NM_139096	0,0289	<b>1,64</b>	
Cirbp	cold inducible RNA binding protein	NM_031147	0,0051	<b>1,63</b>	0006950 // response to stress
Atp5s	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit s	NM_001007749	0,0020	<b>1,63</b>	0006810 // transport
Hspb8	heat shock protein 8	NM_053612	0,0171	<b>1,63</b>	0006950 // response to stress
Ubx6	UBX domain containing 6 (predicted)	NM_001106086	0,0014	<b>1,63</b>	
Palmd	palmdelphin	NM_001025688	0,0003	<b>1,62</b>	0008360 // regulation of cell shape
St5	suppression of tumorigenicity 5 (predicted)	NM_001107547	0,0306	<b>1,62</b>	
Map2k6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	NM_053703	0,0105	<b>1,62</b>	0000165 // MAPKKK cascade
Tcfcp2l1	transcription factor CP2-like 1 (predicted)	NM_001107170	0,0350	<b>1,62</b>	0000122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
Rbbp9	retinoblastoma binding protein 9	NM_019219	0,0223	<b>1,62</b>	0042127 // regulation of cell proliferation
Nup54	nucleoporin 54	NM_017361	0,0258	<b>1,62</b>	0006605 // protein targeting
Pde1a	phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	NM_030871	0,0149	<b>1,62</b>	0007165 // signal transduction
Gphn	gephyrin	NM_022865	0,0012	<b>1,62</b>	0006605 // protein targeting
Thsd7a	thrombospondin, type I, domain containing 7A	XM_001055908	0,0342	<b>1,61</b>	
F2r	coagulation factor II (thrombin) receptor	NM_012950	0,0305	<b>1,61</b>	0007596 // blood coagulation
Bag1	Bcl2-associated athanogene 1 (predicted)	NM_001106647	0,0395	<b>1,61</b>	0006464 // protein modification process
Ltb4dh	leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	NM_138863	0,0196	<b>1,60</b>	0008152 // metabolic process
Lamb1	laminin, beta 1	NM_001106721	0,0195	<b>1,60</b>	0007566 // embryo implantation
Flot1	flotillin 1	NM_022701	0,0043	<b>1,60</b>	
Fn3k	fructosamine 3 kinase	NM_001109051	0,0185	<b>1,60</b>	0030389 // fructosamine metabolic process
Cebpd	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	NM_013154	0,0183	<b>1,60</b>	0006350 // transcription
Hdac5	histone deacetylase 5	XM_001081495	0,0323	<b>1,60</b>	0006325 // establishment and/or maintenance of chromatin architecture
Krt18	keratin 18	NM_053976	0,0077	<b>1,59</b>	0006915 // apoptosis
Pdpx	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6)	XM_001076209	0,0014	<b>1,59</b>	0008152 // metabolic process

Jund	Jun D proto-oncogene	NM_138875	0,0446	<b>1,59</b>	0002076 // osteoblast development
Ddx41	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 41 (predicted)	NM_001108046	0,0374	<b>1,59</b>	
Pex5l	peroxisomal biogenesis factor 5-like	NM_173152	0,0103	<b>1,59</b>	0042391 // regulation of membrane potential
Tapbp	TAP binding protein	NM_033098	0,0268	<b>1,58</b>	0000281 // cytokinesis after mitosis
Jun	Jun oncogene	NM_021835	0,0155	<b>1,58</b>	0001525 // angiogenesis
Skap2	src family associated phosphoprotein 2	NM_130413	0,0100	<b>1,58</b>	0008285 // negative regulation of cell proliferation
Tnr	tenascin R	NM_013045	0,0003	<b>1,58</b>	0007155 // cell adhesion
Npas2	neuronal PAS domain protein 2 (predicted)	NM_001108214	0,0060	<b>1,58</b>	0042745 // circadian sleep/wake cycle
Gpm6a	glycoprotein m6a	NM_178105	0,0080	<b>1,58</b>	
Klhl13	kelch-like 13	XM_001061200	0,0025	<b>1,57</b>	
Soat1	sterol O-acyltransferase 1	NM_031118	0,0040	<b>1,57</b>	0006629 // lipid metabolic process
Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2	NM_198134	0,0142	<b>1,57</b>	0043123 // positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
Tgfb1	transforming growth factor, beta induced	XM_001067964	0,0119	<b>1,57</b>	0002062 // chondrocyte differentiation
Rpa1	Replication protein A1	NM_001047843	0,0117	<b>1,57</b>	0006260 // DNA replication
Zfp521	zinc finger protein 521 (predicted)	NM_001107403	0,0055	<b>1,57</b>	
Ppp4r2	protein phosphatase 4, regulatory subunit 2 (predicted)	NM_001106613	0,0024	<b>1,57</b>	
Lrrc23	leucine rich repeat containing 23	NM_001013165	0,0346	<b>1,57</b>	
Ppp2r2b	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, beta isoform	NM_022209	0,0403	<b>1,57</b>	0007165 // signal transduction
Evl	Ena-vasodilator stimulated phosphoprotein	NM_024147	0,0018	<b>1,57</b>	0006928 // cell motility
Pcbp3	poly(rC) binding protein 3	NM_001011945	0,0003	<b>1,56</b>	
Syne1	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	NM_001029909	0,0087	<b>1,55</b>	
Vipr2	vasoactive intestinal peptide receptor 2	NM_017238	0,0026	<b>1,55</b>	0007165 // signal transduction
Nosip	nitric oxide synthase interacting protein (predicted)	NM_001106260	0,0040	<b>1,55</b>	0016567 // protein ubiquitination
Six6	sine oculis-related homeobox 6 homolog (predicted)	NM_001108032	0,0240	<b>1,55</b>	0006355 // regulation of transcription, DNA-dependent

Fchsd2	FCH and double SH3 domains 2 (predicted)	NM_001107539	0,0197	<b>1,55</b>	
Kcnp4	Kv channel interacting protein 4	NM_181365	0,0367	<b>1,55</b>	0006810 // transport
Pir	pirin	NM_001009474	0,0012	<b>1,55</b>	
Xpa	xeroderma pigmentosum, complementation group A (predicted)	NM_001106656	0,0081	<b>1,54</b>	0006281 // DNA repair
Shank2	SH3/ankyrin domain gene 2	NM_001004133	0,0160	<b>1,54</b>	0007420 // brain development
Cdo1	cysteine dioxygenase 1, cytosolic	NM_052809	0,0055	<b>1,54</b>	0006534 // cysteine metabolic process
Rprm	reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate	NM_001044276	0,0250	<b>1,54</b>	0007050 // cell cycle arrest
Drd1ip	dopamine receptor D1 interacting protein	NM_138915	0,0119	<b>1,54</b>	0007212 // dopamine receptor signaling pathway
Ehd3	EH-domain containing 3	NM_138890	0,0378	<b>1,54</b>	
Ank2	ankyrin 2, neuronal	XM_001076082	0,0438	<b>1,54</b>	0007399 // nervous system development
Rrm1	ribonucleotide reductase M1	NM_001013236	0,0017	<b>1,53</b>	0006260 // DNA replication
Traf3ip2	Traf3 interacting protein 2	NM_001044248	0,0156	<b>1,53</b>	0001783 // B cell apoptosis
Raph1	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1 (predicted)	NM_001108798	0,0496	<b>1,53</b>	
Wfdc2	WAP four-disulfide core domain 2	NM_173109	0,0172	<b>1,53</b>	
Tcf20	transcription factor 20	XM_001077683	0,0398	<b>1,53</b>	
Tspan8	tetraspanin 8	NM_133526	0,0440	<b>1,53</b>	0030195 // negative regulation of blood coagulation
Pcdhb9	protocadherin beta 9	NM_001109390	0,0359	<b>1,53</b>	
Mina	Myc induced nuclear antigen	NM_153309	0,0029	<b>1,52</b>	0008283 // cell proliferation
Argbp2	Arg/Abl-interacting protein ArgBP2	NM_053770	0,0290	<b>1,52</b>	0007242 // intracellular signaling cascade
Rtp4	receptor transporter protein 4 (predicted)	NM_001108321	0,0462	<b>1,52</b>	0001580 // detection of chemical stimulus involved in sensory perception of bitter taste
Nfix	nuclear factor I/X	NM_030866	0,0110	<b>1,52</b>	0006260 // DNA replication
Cpne5	copine V (predicted)	NM_001107616	0,0274	<b>1,52</b>	
Tox3	TOX high mobility group box family member 3	NM_001106171	0,0100	<b>1,52</b>	0006355 // regulation of transcription, DNA-dependent
Zfx4	zinc finger homeodomain 4 (predicted)	XM_001058915	0,0268	<b>1,52</b>	
Galm	galactose mutarotase	NM_001007704	0,0029	<b>1,52</b>	0005975 // carbohydrate metabolic process

Rpa2	replication protein A2	NM_021582	0,0054	<b>1,52</b>	0006260 // DNA replication
Klc3	kinesin light chain 3	NM_138520	0,0076	<b>1,52</b>	
Slc12a5	solute carrier family 12, member 5	NM_134363	0,0019	<b>1,51</b>	0006810 // transport
Chchd6	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6 (predicted)	NM_001106608	0,0007	<b>1,51</b>	
Pex7	peroxisome biogenesis factor 7	NM_001034147	0,0120	<b>1,51</b>	0001764 // neuron migration
Als2cr13	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 13	NM_001108797	0,0092	<b>1,50</b>	
Agtrap	angiotensin II, type I receptor-associated protein	NM_001007654	0,0014	<b>1,50</b>	0008217 // regulation of blood pressure
Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	NM_138881	0,0458	<b>1,50</b>	0001503 // ossification
Tfpi	tissue factor pathway inhibitor	NM_017200	0,0002	<b>1,50</b>	0007596 // blood coagulation
Gle1l	GLE1 RNA export mediator-like (yeast)	NM_001025731	0,0039	<b>1,50</b>	0006810 // transport
Hey1	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	XM_001057389	0,0233	<b>1,50</b>	0001570 // vasculogenesis
Ppap2b	phosphatidic acid phosphatase type 2B	NM_138905	0,0112	<b>1,50</b>	0001568 // blood vessel development
Gpsm1	G-protein signalling modulator 1	NM_144745	0,0074	<b>1,50</b>	0007165 // signal transduction
Dpp6	dipeptidylpeptidase 6	NM_022850	0,0317	<b>1,50</b>	0006508 // proteolysis
Vangl1	vang-like 1 (van gogh, Drosophila)	NM_001109584	0,0023	<b>1,49</b>	0007275 // multicellular organismal development
Rab34	RAB34, member of RAS oncogene family	NM_001012140	0,0338	<b>1,49</b>	0006810 // transport
Crebl2	cAMP responsive element binding protein-like 2	NM_001015027	0,0376	<b>1,49</b>	0006350 // transcription
Spg3a	spastic paraplegia 3A homolog (human)	NM_001009831	0,0245	<b>1,49</b>	
H2afj	H2A histone family, member J	NM_001109610	0,0021	<b>1,49</b>	0006334 // nucleosome assembly
Capn1	calpain 1	NM_019152	0,0017	<b>1,49</b>	0006508 // proteolysis
Srbd1	S1 RNA binding domain 1	XM_001059624	0,0324	<b>1,49</b>	
Rfc4	replication factor C (activator 1) 4 (predicted)	NM_001105869	0,0226	<b>1,49</b>	0006260 // DNA replication
Bmp6	bone morphogenetic protein 6	NM_013107	0,0150	<b>1,49</b>	0001503 // ossification
Med30	mediator complex subunit 30 (predicted)	XM_001065742	0,0047	<b>1,48</b>	0006367 // transcription initiation from RNA polymerase II promoter
Tle4	transducin-like enhancer of split 4, homolog of Drosophila E(spl)	NM_019141	0,0266	<b>1,48</b>	0000122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter

Pcgf6	polycomb group ring finger 6	NM_001013154	0,0165	<b>1,48</b>	0006350 // transcription
Zfp36l2	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	NM_001036626	0,0280	<b>1,48</b>	0000288 // nuclear-transcribed mRNA catabolic process
Pigh	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class H	NM_001108714	0,0475	<b>1,48</b>	
Smpd3	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral	NM_053605	0,0212	<b>1,48</b>	0006684 // sphingomyelin metabolic process
Ngb	neuroglobin	NM_033359	0,0126	<b>1,48</b>	0006810 // transport
Apbb1	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1	NM_080478	0,0282	<b>1,48</b>	0001764 // neuron migration
Nrp1	Neuropilin 1	NM_145098	0,0496	<b>1,48</b>	0001525 // angiogenesis
Efcab4a	EF-hand calcium binding domain 4A	XM_001062704	0,0038	<b>1,47</b>	
Pbxip1	pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1	NM_001100976	0,0126	<b>1,47</b>	
Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	NM_031559	0,0042	<b>1,47</b>	0001676 // long-chain fatty acid metabolic process
Eef2k	eukaryotic elongation factor-2 kinase	NM_012947	0,0063	<b>1,47</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Ntan1	N-terminal asparagine amidase	NM_001025124	0,0106	<b>1,47</b>	0007613 // memory
Bat5	HLA-B associated transcript 5	NM_212531	0,0056	<b>1,47</b>	0001916 // positive regulation of T cell mediated cytotoxicity
Pde6d	phosphodiesterase 6D, cGMP-specific, rod, delta (predicted)	NM_001108806	0,0230	<b>1,47</b>	0007601 // visual perception
Cadm1	cell adhesion molecule 1	NM_001012201	0,0014	<b>1,47</b>	0001889 // liver development
Ift81	intraflagellar transport 81 homolog (Chlamydomonas)	NM_199120	0,0101	<b>1,47</b>	0007275 // multicellular organismal development
Rtn1	reticulon 1	NM_053865	0,0078	<b>1,47</b>	
Tradd	TNFRSF1A-associated via death domain	XM_001071920	0,0026	<b>1,47</b>	0006915 // apoptosis
Tmem106a	transmembrane protein 106A	NM_001024967	0,0230	<b>1,47</b>	
Bat4	HLA-B associated transcript 4	NM_001001969	0,0099	<b>1,46</b>	0000122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
Rab3c	RAB3C, member RAS oncogene family	NM_133536	0,0336	<b>1,46</b>	0006810 // transport
Slc43a2	solute carrier family 43, member 2 (predicted)	NM_001105812	0,0114	<b>1,46</b>	0015807 // L-amino acid transport
Cacng6	calcium channel, voltage-dependent,	NM_080694	0,0113	<b>1,46</b>	0006810 // transport

	gamma subunit 6				
Pcca	propionyl-coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide	NM_019330	0,0077	<b>1,46</b>	0008152 // metabolic process
Pcgf4	Polycomb group ring finger 4 (predicted)	NM_001107368	0,0004	<b>1,46</b>	0000122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
Rsb1	rosbin, round spermatid basic protein 1 (predicted)	XM_001065582	0,0106	<b>1,46</b>	
Blcap	bladder cancer associated protein homolog (human)	NM_133582	0,0184	<b>1,46</b>	
Ctsf	cathepsin F	NM_001034110	0,0390	<b>1,46</b>	0006508 // proteolysis
Krt19	keratin 19	NM_199498	0,0404	<b>1,46</b>	0043627 // response to estrogen stimulus
Ssh3	slingshot homolog 3	NM_001012217	0,0160	<b>1,45</b>	0006470 // protein amino acid dephosphorylation
Amigo2	adhesion molecule with Ig like domain 2	NM_182816	0,0261	<b>1,45</b>	0006916 // anti-apoptosis
Plekha5	Pleckstrin homology domain containing, family A member 5	XM_001073627	0,0340	<b>1,45</b>	
Pcmt2	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2	NM_001107810	0,0038	<b>1,45</b>	
Rgs10	regulator of G-protein signalling 10	NM_019337	0,0030	<b>1,45</b>	0008277 // regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway
Rbmx	RNA binding motif protein, X chromosome	NM_001025663	0,0205	<b>1,45</b>	
Ubx1	UBX domain containing 1	NM_001108812	0,0043	<b>1,45</b>	
Nsbp1	nucleosome binding protein 1 (predicted)	XM_001058107	0,0146	<b>1,45</b>	
Prkc	protein kinase C, zeta	NM_022507	0,0195	<b>1,45</b>	0000226 // microtubule cytoskeleton organization and biogenesis
Fam26b	family with sequence similarity 26, member B	NM_001008306	0,0042	<b>1,45</b>	
Baz2b	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B (predicted)	NM_001108260	0,0357	<b>1,45</b>	
Csf1r	colony stimulating factor 1 receptor	NM_001029901	0,0470	<b>1,45</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Gria2	glutamate receptor, ionotropic, AMPA2	NM_001083811	0,0401	<b>1,45</b>	0001919 // regulation of receptor recycling
Ccdc90b	coiled-coil domain containing 90B	NM_001024885	0,0106	<b>1,44</b>	
Apc2	adenomatous polyposis coli 2 (predicted)	NM_001106769	0,0140	<b>1,44</b>	



Dnajc12	DnaJ homolog subfamily C member 12	NM_001034032	0,0451	<b>1,44</b>	0006355 // regulation of transcription, DNA-dependent
Klc4	kinesin light chain 4	NM_001009601	0,0005	<b>1,44</b>	
Fcho2	FCH domain only 2 (predicted)	XM_219503	0,0348	<b>1,44</b>	
Aldh16a1	aldehyde dehydrogenase 16 family, member A1	NM_001033706	0,0008	<b>1,44</b>	0008152 // metabolic process
Cep27	centrosomal protein 27 (predicted)	XM_001076273	0,0318	<b>1,44</b>	
Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	XM_001059289	0,0013	<b>1,44</b>	0008285 // negative regulation of cell proliferation
Rsrc1	arginine/serine-rich coiled-coil 1	NM_001014172	0,0070	<b>1,44</b>	
Prkra	protein kinase, interferon inducible double stranded RNA dependent activator	NM_001024780	0,0292	<b>1,43</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Crocc	ciliary rootlet coiled-coil, rootletin (predicted)	NM_001107990	0,0190	<b>1,43</b>	0051297 // centrosome organization and biogenesis
As3mt	arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase	NM_080890	0,0323	<b>1,43</b>	0008152 // metabolic process
Syngn2	synaptogyrin 2	NM_053553	0,0022	<b>1,43</b>	0006605 // protein targeting
Trim24	tripartite motif-containing 24	NM_001044266	0,0077	<b>1,43</b>	0010628 // positive regulation of gene expression
Ncor1	Nuclear receptor co-repressor 1	XM_001077447	0,0222	<b>1,43</b>	0006350 // transcription
Zfp467	zinc finger protein 467	NM_001024327	0,0186	<b>1,43</b>	0006350 // transcription
Odf2l	outer dense fiber of sperm tails 2-like	XM_001063750	0,0192	<b>1,43</b>	
Ebna1bp2	EBNA1 binding protein 2	NM_001008721	0,0065	<b>1,43</b>	
Mettl7a	methyltransferase like 7A	NM_001037355	0,0001	<b>1,43</b>	0008152 // metabolic process
Cnnm3	cyclin M3 (predicted)	NM_001106901	0,0202	<b>1,43</b>	
Tspan33	tetraspanin 33	NM_001109227	0,0229	<b>1,43</b>	0006865 // amino acid transport
Tob1	transducer of ErbB-2.1	NM_133317	0,0399	<b>1,43</b>	0007184 // SMAD protein nuclear translocation
Ctnnbl1	catenin, beta like 1	NM_001024870	0,0019	<b>1,43</b>	0006915 // apoptosis
Cldn10	claudin 10 (predicted)	NM_001106058	0,0328	<b>1,43</b>	0006816 // calcium ion transport
Klc1	kinesin light chain 1	NM_001081972	0,0212	<b>1,43</b>	0008088 // axon cargo transport
Sucg2	succinate-Coenzyme A ligase, GDP-forming, beta subunit	XM_001064568	0,0004	<b>1,43</b>	0008152 // metabolic process

Elavl2	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B)	NM_173309	0,0471	<b>1,43</b>	
Cd151	CD151 antigen (Raph blood group)	NM_022523	0,0052	<b>1,43</b>	0031581 // hemidesmosome assembly
Nbn	nibrin	NM_138873	0,0125	<b>1,43</b>	0000075 // cell cycle checkpoint
Rev3l	REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta RAD54 like	NM_001083966	0,0279	<b>1,43</b>	0006139 // nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
Sh3bgrl3	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein-like 3 (predicted)	NM_001106688	0,0063	<b>1,43</b>	
Ltbp3	latent transforming growth factor beta binding protein 3	---	0,0044	<b>1,42</b>	0001501 // skeletal development
L1cam	L1 cell adhesion molecule	NM_017345	0,0041	<b>1,42</b>	0007155 // cell adhesion
Arse	arylsulfatase E (chondrodysplasia punctata 1)	NM_001047885	0,0091	<b>1,42</b>	0008152 // metabolic process
Rassf6	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 6	NM_001025671	0,0244	<b>1,42</b>	0007165 // signal transduction
B3galnt1	UDP-GalNAc:betaGlcNAc beta 1,3-galactosaminyltransferase, polypeptide 1	NM_001013158	0,0033	<b>1,42</b>	0006486 // protein amino acid glycosylation
Pkp4	plakophilin 4 (predicted)	NM_001106482	0,0146	<b>1,42</b>	
Ctbp2	C-terminal binding protein 2	NM_053335	0,0221	<b>1,42</b>	0008152 // metabolic process
Gpx4	glutathione peroxidase 4	NM_001039849	0,0142	<b>1,42</b>	0006325 // establishment and/or maintenance of chromatin architecture
Cab39l	calcium binding protein 39-like	NM_001011917	0,0478	<b>1,41</b>	
Slco3a1	Solute carrier organic anion transporter family, member 3a1	NM_177481	0,0086	<b>1,41</b>	0006810 // transport
Ms4a6b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B	NM_001006975	0,0158	<b>1,41</b>	0007165 // signal transduction
Actn1	actinin, alpha 1	NM_031005	0,0394	<b>1,41</b>	0048041 // focal adhesion formation
Exosc8	exosome component 8 (predicted)	NM_001106432	0,0338	<b>1,41</b>	0006396 // RNA processing
Bcap29	B-cell receptor-associated protein 29	NM_001006980	0,0186	<b>1,41</b>	0006886 // intracellular protein transport
Exoc2	exocyst complex component 2	NM_134414	0,0033	<b>1,41</b>	0006810 // transport
Camk2d	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	NM_012519	0,0155	<b>1,41</b>	0006816 // calcium ion transport
St6gal1	beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1	NM_001113344	0,0097	<b>1,41</b>	0006486 // protein amino acid glycosylation

Slc35a1	solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter), member 1 (predicted)	NM_001107924	0,0376	<b>1,41</b>	0015780 // nucleotide-sugar transport
Aarsd1	alanyl-tRNA synthetase domain containing 1	NM_001034109	0,0070	<b>1,41</b>	0006412 // translation
Nme4	expressed in non-metastatic cells 4	NM_001109478	0,0356	<b>1,41</b>	
Cacnb3	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit	NM_012828	0,0202	<b>1,41</b>	0006810 // transport
Lmo4	LIM domain only 4	NM_001009708	0,0416	<b>1,41</b>	0001843 // neural tube closure
Cadps	Ca <sup>2+</sup> -dependent secretion activator	NM_013219	0,0007	<b>1,41</b>	0006810 // transport
Als2	Amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) homolog (human)	NM_001013413	0,0493	<b>1,41</b>	0001701 // in utero embryonic development
Lman2l	Lectin, mannose-binding 2-like (predicted)	NM_001106900	0,0036	<b>1,41</b>	0015031 // protein transport
Pnpla2	patatin-like phospholipase domain containing 2 (predicted)	NM_001108509	0,0074	<b>1,41</b>	0006629 // lipid metabolic process
Cbr4	carbonyl reductase 4	NM_182672	0,0481	<b>1,41</b>	0008152 // metabolic process
Mtap7	microtubule-associated protein 7 (predicted)	NM_001106270	0,0378	<b>1,41</b>	0006970 // response to osmotic stress
Unc93b1	unc-93 homolog B1 (C. elegans)	NM_001108513	0,0402	<b>1,41</b>	0002224 // toll-like receptor signaling pathway
Lrg1	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	NM_001009717	0,0078	<b>1,41</b>	
Nrxn1	neurexin 1	NM_021767	0,0217	<b>1,41</b>	0007155 // cell adhesion
Zfp292	zinc finger protein 292	NM_001008879	0,0117	<b>1,40</b>	
Nfkbia	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NM_001105720	0,0364	<b>1,40</b>	0000060 // protein import into nucleus, translocation
Tmem141	transmembrane protein 141	NM_001109197	0,0287	<b>1,40</b>	
Sirt3	sirtuin 3	NM_001106313	0,0374	<b>1,40</b>	
Ublcp1	ubiquitin-like domain containing CTD phosphatase 1	NM_001014117	0,0365	<b>1,40</b>	0006464 // protein modification process
Mlh3	mutL homolog 3 (E. coli) (predicted)	NM_001108043	0,0041	<b>1,40</b>	
Accn1	amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal (degenerin)	NM_001034014	0,0414	<b>1,40</b>	0001101 // response to acid
Gstp1	glutathione-S-transferase, pi 1	NM_012577	0,0017	<b>1,40</b>	0006749 // glutathione metabolic process
Chrac1	chromatin accessibility complex 1 (predicted)	XM_001072895	0,0098	<b>1,39</b>	

Hopx	HOP homeobox	NM_133621	0,0167	<b>1,39</b>	000122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
Fancl	Fanconi anemia, complementation group L (predicted)	XM_001064256	0,0037	<b>1,39</b>	0007276 // gamete generation
Nudt14	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 14 (predicted)	NM_001106760	0,0221	<b>1,39</b>	
Gtpbp10	GTP-binding protein 10 (putative)	NM_001100815	0,0333	<b>1,39</b>	
Dlg3	discs, large homolog 3	NM_031639	0,0058	<b>1,39</b>	
Myt1l	myelin transcription factor 1-like	NM_053888	0,0158	<b>1,39</b>	0006350 // transcription
Grk6	G protein-coupled receptor kinase 6	NM_001112712	0,0017	<b>1,39</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Mdga2	MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 2	NM_199269	0,0026	<b>1,39</b>	0021522 // spinal cord motor neuron differentiation
Myd116	myeloid differentiation primary response gene 116	NM_133546	0,0317	<b>1,39</b>	0006417 // regulation of translation
Sec16a	SEC16 homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )	XM_001078406	0,0276	<b>1,39</b>	0006629 // lipid metabolic process
Fbf1	Fas (TNFRSF6) binding factor 1 (predicted)	NM_001105854	0,0428	<b>1,39</b>	
Acn9	ACN9 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	NM_001047914	0,0163	<b>1,39</b>	0006094 // gluconeogenesis
Inpp1	inositol polyphosphate-1-phosphatase	NM_001012131	0,0284	<b>1,39</b>	
Six1	sine oculis-related homeobox 1 homolog	XM_001080688	0,0031	<b>1,39</b>	0001657 // ureteric bud development
Hbxip	hepatitis B virus x interacting protein (predicted)	NM_001106462	0,0135	<b>1,38</b>	0006916 // anti-apoptosis
Snn	stannin	NM_001034083	0,0062	<b>1,38</b>	
Arsk	arylsulfatase K	NM_001047917	0,0274	<b>1,38</b>	0008152 // metabolic process
Pcmt2	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2	NM_001107810	0,0153	<b>1,38</b>	
Amigo1	adhesion molecule with Ig like domain 1	NM_206881	0,0094	<b>1,38</b>	0007155 // cell adhesion
Prr6	proline-rich polypeptide 6	XM_577104	0,0024	<b>1,38</b>	
Bbs1	Bardet-Biedl syndrome 1 homolog (human) (predicted)	NM_001107569	0,0371	<b>1,38</b>	0000226 // microtubule cytoskeleton organization and biogenesis
Hmgb3	high mobility group box 3	XM_001067329	0,0002	<b>1,38</b>	0006355 // regulation of transcription, DNA-dependent
Nubp1	nucleotide binding protein 1	NM_001009619	0,0006	<b>1,38</b>	
Lrsam1	leucine rich repeat and sterile alpha motif	NM_001107833	0,0097	<b>1,38</b>	

	containing 1				
Xrcc5	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5	NM_177419	0,0039	<b>1,38</b>	0006302 // double-strand break repair
Chd7	chromodomain helicase DNA binding protein 7 (predicted)	NM_001107906	0,0012	<b>1,38</b>	0001568 // blood vessel development
Ccdc124	coiled-coil domain containing 124	NM_001106071	0,0062	<b>1,37</b>	
Stk3	serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)	NM_031735	0,0111	<b>1,37</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Pcgf2	polycomb group ring finger 2 (predicted)	NM_001105836	0,0330	<b>1,37</b>	0009952 // anterior/posterior pattern formation
Lrrc20	leucine rich repeat containing 20	NM_001109171	0,0043	<b>1,37</b>	
Zfp90	zinc finger protein 90	NM_001025765	0,0385	<b>1,37</b>	0006350 // transcription
Plcl2	phospholipase C-like 2 (predicted)	NM_001106880	0,0325	<b>1,37</b>	
Dazap2	DAZ associated protein 2	NM_001013107	0,0002	<b>1,37</b>	
Hmg20b	high mobility group 20 B (predicted)	NM_001108731	0,0144	<b>1,37</b>	
Mrpl44	mitochondrial ribosomal protein L44	NM_001031650	0,0157	<b>1,37</b>	0006396 // RNA processing
Calm3	calmodulin 3	NM_012518	0,0010	<b>1,37</b>	0007049 // cell cycle
Nat14	N-acetyltransferase 14	NM_001108466	0,0006	<b>1,37</b>	0008152 // metabolic process
Mllt6	myeloid/lymphoid or mixed lineage-leukemia translocation to 6 homolog	XM_001081378	0,0051	<b>1,37</b>	
Dhx16	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16	NM_001008826	0,0009	<b>1,37</b>	0002474 // antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I
Zadh1	zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 1	NM_001015009	0,0011	<b>1,37</b>	0008152 // metabolic process
Aatk	apoptosis-associated tyrosine kinase	XM_001075880	0,0136	<b>1,37</b>	0006915 // apoptosis
Abcc3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	NM_080581	0,0066	<b>1,37</b>	0006810 // transport
Jmjd5	jumonji domain containing 5	NM_001037196	0,0155	<b>1,37</b>	
Ccdc52	coiled-coil domain containing 52	NM_001008285	0,0105	<b>1,37</b>	
Cast	calpastatin	NM_001033715	0,0258	<b>1,37</b>	0007520 // myoblast fusion
Lias	lipoic acid synthetase	NM_001012037	0,0335	<b>1,37</b>	0008152 // metabolic process
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	NM_031530	0,0411	<b>1,37</b>	0001938 // positive regulation of endothelial cell proliferation
Tubb3	tubulin, beta 3	NM_139254	0,0035	<b>1,37</b>	0007017 // microtubule-based process

Plscr3	phospholipid scramblase 3	NM_001012139	0,0096	<b>1,36</b>	0042593 // glucose homeostasis
Tchp	trichoplein, keratin filament binding (predicted)	XM_222232	0,0241	<b>1,36</b>	
Fuca2	fucosidase, alpha-L- 2, plasma	NM_001004218	0,0210	<b>1,36</b>	0005975 // carbohydrate metabolic process
Prkcq	protein kinase C, theta	XM_001064068	0,0215	<b>1,36</b>	0001666 // response to hypoxia
Slfn3	schlafen 3	NM_053687	0,0417	<b>1,36</b>	
Asz1	ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper domain containing 1	NM_001004102	0,0243	<b>1,36</b>	0000187 // activation of MAPK activity
Aradc2	arrestin domain containing 2	NM_001107303	0,0464	<b>1,36</b>	
Grik2	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2	NM_019309	0,0019	<b>1,36</b>	0006810 // transport
Aip	aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein	NM_172327	0,0011	<b>1,36</b>	0006457 // protein folding
Arhgef17	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 17 (predicted)	NM_001107538	0,0155	<b>1,36</b>	0030036 // actin cytoskeleton organization and biogenesis
Pdzd4	PDZ domain containing 4 (predicted)	XM_001057431	0,0042	<b>1,36</b>	
Rab711	RAB7, member RAS oncogene family-like 1	NM_133590	0,0018	<b>1,36</b>	0006810 // transport
Banf1	barrier to autointegration factor 1	NM_053631	0,0004	<b>1,36</b>	0015074 // DNA integration
Epc2	enhancer of polycomb homolog 2 (predicted)	NM_001108581	0,0116	<b>1,36</b>	
Atp6ap2	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal accessory protein 2	XM_001060853	0,0014	<b>1,36</b>	0002003 // angiotensin maturation
Nek7	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 7	NM_001108346	0,0247	<b>1,36</b>	
Tmem147	transmembrane protein 147	NM_001038494	0,0248	<b>1,35</b>	
Podxl2	podocalyxin-like 2 (predicted)	NM_001106607	0,0348	<b>1,35</b>	
Manbal	mannosidase, beta A, lysosomal-like	XM_001067976	0,0078	<b>1,35</b>	
Dlgh1	Discs, large homolog 1	NM_012788	0,0162	<b>1,35</b>	0001935 // endothelial cell proliferation
Atp6v1e1	VATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V1 subunit E1	NM_198745	0,0006	<b>1,35</b>	0006810 // transport
Muted	muted	NM_001107347	0,0180	<b>1,35</b>	0016192 // vesicle-mediated transport
Rab25	RAB25, member RAS oncogene family (predicted)	NM_001107687	0,0066	<b>1,35</b>	0006355 // regulation of transcription, DNA-dependent
Rasl12	RAS-like, family 12 (predicted)	NM_001108162	0,0091	<b>1,35</b>	

Zfp644	zinc finger protein 644 (predicted)	XM_001062824	0,0468	<b>1,35</b>	
Kctd13	potassium channel tetramerisation domain containing 13	NM_198736	0,0126	<b>1,35</b>	0006260 // DNA replication
Bex1	brain expressed gene 1	NM_001037365	0,0351	<b>1,35</b>	0002052 // positive regulation of neuroblast proliferation
Abca1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	NM_178095	0,0351	<b>1,35</b>	0002790 // peptide secretion
Qsox2	quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 2	NM_001109434	0,0031	<b>1,35</b>	
Ccdc126	coiled-coil domain containing 126	NM_001109232	0,0318	<b>1,35</b>	
Tysnd1	trypsin domain containing 1 (predicted)	NM_001108932	0,0092	<b>1,35</b>	0006508 // proteolysis
Mrpl54	mitochondrial ribosomal protein L54 (predicted)	NM_001106770	0,0007	<b>1,35</b>	
Reep6	receptor accessory protein 6	NM_001013218	0,0032	<b>1,34</b>	
Timp2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_021989	0,0067	<b>1,34</b>	0007283 // spermatogenesis
Igfbp1	immunoglobulin (CD79A) binding protein 1	NM_031624	0,0037	<b>1,34</b>	0009607 // response to biotic stimulus
Traf6	Tnf receptor-associated factor 6 (predicted)	NM_001107754	0,0097	<b>1,34</b>	0000209 // protein polyubiquitination
Pold4	polymerase (DNA-directed), delta 4	NM_001013195	0,0002	<b>1,34</b>	0001938 // positive regulation of endothelial cell proliferation
Bloc1s1	biogenesis of lysosome-related organelles complex-1, subunit 1 (predicted)	NM_001105941	0,0044	<b>1,34</b>	
Itgav	integrin alpha V (predicted)	NM_001106549	0,0175	<b>1,34</b>	0001525 // angiogenesis
Mcm7	minichromosome maintenance deficient 7	NM_001004203	0,0212	<b>1,34</b>	0006260 // DNA replication
Aplp2	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	XM_001055798	0,0077	<b>1,34</b>	0001967 // suckling behavior
Bdh1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1	NM_053995	0,0287	<b>1,34</b>	0008152 // metabolic process
Gmpr	guanosine monophosphate reductase	NM_057188	0,0427	<b>1,34</b>	0009117 // nucleotide metabolic process
Mrps18a	mitochondrial ribosomal protein S18A	NM_198756	0,0155	<b>1,34</b>	0006412 // translation
Gle1	GLE1 RNA export mediator	NM_001025731	0,0093	<b>1,34</b>	0006810 // transport
Ppa2	pyrophosphatase (inorganic) 2 (predicted)	XM_001075518	0,0391	<b>1,34</b>	0006796 // phosphate metabolic process
Clpb	ClpB caseinolytic peptidase B homolog	NM_022947	0,0178	<b>1,34</b>	
Stxbp1	syntaxin binding protein 1	NM_013038	0,0171	<b>1,34</b>	0006810 // transport
Tspan14	tetraspanin 14 (predicted)	XM_001067025	0,0220	<b>1,34</b>	

Hscb	HscB iron-sulfur cluster co-chaperone homolog	NM_001108340	0,0402	<b>1,34</b>	0006457 // protein folding
Hdac11	histone deacetylase 11 (predicted)	NM_001106610	0,0368	<b>1,34</b>	0016575 // histone deacetylation
Lactb2	lactamase, beta 2	NM_001024247	0,0206	<b>1,33</b>	
Pnpt1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	XM_001065076	0,0154	<b>1,33</b>	0005975 // carbohydrate metabolic process
P18srp	P18SRP protein	NM_001008373	0,0243	<b>1,33</b>	0006397 // mRNA processing
Negr1	neuronal growth regulator 1	NM_021682	0,0185	<b>1,33</b>	0007155 // cell adhesion
Tpp1	tripeptidyl peptidase I	NM_031357	0,0120	<b>1,33</b>	0006508 // proteolysis
Gstm1	glutathione S-transferase, mu 1	NM_017014	0,0175	<b>1,33</b>	0006749 // glutathione metabolic process
Fam116a	family with sequence similarity 116, member A	XM_001057380	0,0197	<b>1,33</b>	
Vtn	vitronectin	NM_019156	0,0207	<b>1,33</b>	0007160 // cell-matrix adhesion
H2afv	H2A histone family, member V (predicted)	NM_001106019	0,0043	<b>1,33</b>	
Ap3b1	adaptor-related protein complex 3, beta 1 subunit (predicted)	NM_001107646	0,0162	<b>1,33</b>	0006508 // proteolysis
Cdkn2c	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	NM_131902	0,0260	<b>1,33</b>	0000079 // regulation of cyclin-dependent protein kinase activity
Clns1a	chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A	NM_031719	0,0006	<b>1,33</b>	0006821 // chloride transport
Sqstm1	sequestosome 1	NM_175843	0,0272	<b>1,33</b>	0001934 // positive regulation of protein amino acid phosphorylation
Atrx	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked homolog	NM_001105757	0,0142	<b>1,33</b>	0006281 // DNA repair
Atp9b	ATPase, class II, type 9B	NM_001106130	0,0100	<b>1,33</b>	0006810 // transport
Sepp1	selenoprotein P, plasma, 1	NM_001083911	0,0034	<b>1,33</b>	0001887 // selenium metabolic process
Tmem192	transmembrane protein 192	NM_001014141	0,0236	<b>1,33</b>	
Polr2g	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G	NM_053948	0,0349	<b>1,33</b>	0006350 // transcription
Gtpbp3	GTP binding protein 3 (mitochondrial)	NM_001011919	0,0359	<b>1,33</b>	0006400 // tRNA modification
Tm7sf3	transmembrane 7 superfamily member 3	NM_001011970	0,0026	<b>1,33</b>	
Bsn	bassoon	NM_019146	0,0002	<b>1,33</b>	0007010 // cytoskeleton organization and biogenesis
Vrk1	vaccinia related kinase 1	NM_001012194	0,0098	<b>1,33</b>	0006468 // protein phosphorylation



Hsd17b12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	NM_032066	0,0070	<b>1,32</b>	0006694 // steroid biosynthetic process
Camk2n1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	NM_173337	0,0034	<b>1,32</b>	0007268 // synaptic transmission
Sema4a	sema domain, immunoglobulin domain (Ig)	NM_001012078	0,0343	<b>1,32</b>	0007275 // multicellular organismal development
Deaf1	deformed epidermal autoregulatory factor 1	NM_031801	0,0435	<b>1,32</b>	0006350 // transcription
Rnf44	Ring finger protein 44	NM_001024795	0,0022	<b>1,32</b>	
Gfm1	G elongation factor, mitochondrial 1	NM_053625	0,0008	<b>1,32</b>	0006412 // translation
Dctn6	dynactin 6 (predicted)	NM_001106085	0,0028	<b>1,32</b>	
Cenpq	centromere protein Q	NM_001014215	0,0100	<b>1,32</b>	
Chid1	chitinase domain containing 1	NM_001047854	0,0199	<b>1,32</b>	0005975 // carbohydrate metabolic process
Ankmy2	ankyrin repeat and MYND domain containing 2 (predicted)	NM_001108019	0,0419	<b>1,32</b>	
Tlk1	tousled-like kinase 1 (predicted)	NM_001107734	0,0449	<b>1,32</b>	0001672 // regulation of chromatin assembly or disassembly
Adh4	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	NM_001126120	0,0129	<b>1,32</b>	0001523 // retinoid metabolic process
Snx7	sorting nexin 7	NM_001012083	0,0462	<b>1,32</b>	0007154 // cell communication
Igfbp7	insulin-like growth factor binding protein 7	NM_001013048	0,0480	<b>1,32</b>	0001558 // regulation of cell growth
Bin3	bridging integrator 3	NM_001013186	0,0265	<b>1,32</b>	0000917 // barrier septum formation
Smyd4	SET and MYND domain containing 4 (predicted)	NM_001105810	0,0163	<b>1,32</b>	
Galk2	galactokinase 2	NM_001013919	0,0490	<b>1,32</b>	0006012 // galactose metabolic process
Cspg5	chondroitin sulfate proteoglycan 5	NM_019284	0,0333	<b>1,32</b>	0001558 // regulation of cell growth
Rabac1	Rab acceptor 1 (prenylated)	NM_031774	0,0382	<b>1,32</b>	0016192 // vesicle-mediated transport
Them2	thioesterase superfamily member 2 (predicted)	NM_001106111	0,0431	<b>1,32</b>	
Plekhg5	pleckstrin homology domain containing, family G member 5	NM_201272	0,0150	<b>1,32</b>	0035023 // regulation of Rho protein signal transduction
Pcna	proliferating cell nuclear antigen	NM_022381	0,0011	<b>1,32</b>	0006260 // DNA replication
Gltscr2	glioma tumor suppressor candidate region gene 2	NM_207591	0,0003	<b>1,32</b>	

Crbn	cereblon	NM_001015003	0,0061	<b>1,32</b>	0006510 // ATP-dependent proteolysis
Brd3	Bromodomain containing 3 (predicted)	NM_001108575	0,0386	<b>1,32</b>	
Mapkapk5	MAP kinase-activated protein kinase 5	NM_001025761	0,0063	<b>1,32</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Tmem59l	transmembrane protein 59-like	XM_001067996	0,0010	<b>1,32</b>	
Cnot8	CCR4-NOT transcription complex, subunit 8	NM_001008382	0,0266	<b>1,32</b>	
Commd7	COMM domain containing 7	NM_001030029	0,0491	<b>1,32</b>	0016481 // negative regulation of transcription
Cir	CBF1 interacting corepressor	NM_001007799	0,0453	<b>1,32</b>	0006350 // transcription
Cdk5rap2	CDK5 regulatory subunit associated protein 2	XM_001058949	0,0382	<b>1,31</b>	0007420 // brain development
Lxn	latexin	NM_031655	0,0243	<b>1,31</b>	0050965 // perception of pain, detection of temperature stimulus
Mex3b	mex3 homolog B (C. elegans)	XM_001068105	0,0246	<b>1,31</b>	
Pscd2	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 2	NM_053911	0,0051	<b>1,31</b>	0016358 // dendrite development
Tmpo	thymopoietin	NM_012887	0,0092	<b>1,31</b>	0031468 // nuclear envelope reassembly
Parp12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12 (predicted)	NM_001108623	0,0100	<b>1,31</b>	
Eif2b3	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 3	NM_133609	0,0033	<b>1,31</b>	0006412 // translation
Tcf19	transcription factor 19	NM_213561	0,0065	<b>1,31</b>	0000281 // cytokinesis after mitosis
C2	complement component 2	NM_172222	0,0477	<b>1,31</b>	0001916 // positive regulation of T cell mediated cytotoxicity
Znf213	zinc finger protein 213 (predicted)	NM_001105764	0,0209	<b>1,31</b>	
H3f3b	H3 histone, family 3B	NM_053985	0,0002	<b>1,31</b>	0006334 // nucleosome assembly
Tusc2	tumor suppressor candidate 2	NM_001109297	0,0209	<b>1,31</b>	
Zmynd11	zinc finger, MYND domain containing 11	NM_203366	0,0333	<b>1,31</b>	
Rnf208	ring finger protein 208	NM_001109195	0,0137	<b>1,31</b>	
Tspan6	tetraspanin 6	XM_001067945	0,0020	<b>1,31</b>	0043123 // positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal	NM_001034090	0,0029	<b>1,31</b>	0006805 // xenobiotic metabolic process
Sfxn4	sideroflexin 4 (predicted)	NM_001108527	0,0414	<b>1,31</b>	0006812 // cation transport
Zfp91	zinc finger protein 91	XM_001078426	0,0330	<b>1,31</b>	
Prdm2	PR domain containing 2, with ZNF	NM_001077648	0,0157	<b>1,31</b>	0006355 // regulation of transcription, DNA-

	domain				dependent
Alkbh2	alkB, alkylation repair homolog 2 (predicted)	NM_001126273	0,0008	<b>1,31</b>	
Sil1	endoplasmic reticulum chaperone SIL1 homolog	NM_199376	0,0091	<b>1,31</b>	0006810 // transport
Hpcal1	hippocalcin-like 1	NM_017356	0,0360	<b>1,31</b>	
Morn1	MORN repeat containing 1	NM_001005544	0,0033	<b>1,31</b>	
Spata6	spermatogenesis associated 6	NM_134392	0,0385	<b>1,31</b>	0007275 // multicellular organismal development
Stmn1	stathmin 1	NM_017166	0,0048	<b>1,31</b>	0007019 // microtubule depolymerization
Tnfsf12	tumor necrosis factor ligand superfamily member 12	NM_001001513	0,0092	<b>1,31</b>	0006955 // immune response
Abhd8	abhydrolase domain containing 8 (predicted)	NM_001107301	0,0014	<b>1,30</b>	
Ddx20	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20	XM_001066705	0,0060	<b>1,30</b>	0000122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
Par1	presenilin associated, rhomboid-like	NM_001035249	0,0111	<b>1,30</b>	
Decr2	2-4-dienoyl-Coenzyme A reductase 2, peroxisomal	NM_171996	0,0119	<b>1,30</b>	0006183 // GTP biosynthetic process
N6amt1	N-6 adenine-specific DNA methyltransferase 1 (putative)	XM_001070533	0,0418	<b>1,30</b>	0032259 // methylation
Evi2a	ecotropic viral integration site 2A	NM_001044287	0,0054	<b>1,30</b>	
Traf6	Tnf receptor-associated factor 6 (predicted)	NM_001107754	0,0362	<b>1,30</b>	0000209 // protein polyubiquitination
Chchd8	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 8	XM_001067013	0,0373	<b>1,30</b>	
Wars	tryptophanyl-tRNA synthetase	NM_001013170	0,0268	<b>1,30</b>	0006412 // translation
Sirt5	sirtuin 5	NM_001004256	0,0067	<b>1,30</b>	0006342 // chromatin silencing
Atp6v1g2	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V1 subunit G2	NM_001002822	0,0299	<b>1,30</b>	0000281 // cytokinesis after mitosis
Rpp40	ribonuclease P 40 subunit	NM_001013055	0,0331	<b>1,30</b>	
Rfx2	regulatory factor X, 2	NM_001106877	0,0278	<b>1,30</b>	
Slit2	slit homolog 2	XM_001057837	0,0160	<b>1,30</b>	0001656 // metanephros development
Ypel5	yippee-like 5	NM_001035221	0,0425	<b>1,30</b>	
Hn1	hematological and neurological expressed sequence 1	NM_001005876	0,0009	<b>1,30</b>	

Ccdc107	coiled-coil domain containing 107	NM_001107957	0,0076	<b>1,30</b>	0006826 // iron ion transport
Plod1	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	NM_053827	0,0324	<b>1,30</b>	0001666 // response to hypoxia
Mum111	melanoma associated antigen (mutated) 1-like 1	NM_001109321	0,0204	<b>1,30</b>	
<b>Down-regulated</b>					
Mybpc1	myosin binding protein C, slow type	XM_001076591	0,0003	<b>-7,42</b>	0006936 // muscle contraction
Hspb7	heat shock protein family, member 7 (cardiovascular)	NM_031607	0,0075	<b>-4,50</b>	0006950 // response to stress
Fgl2	fibrinogen-like 2	NM_053455	0,0012	<b>-4,04</b>	0007165 // signal transduction
Ecel1	endothelin converting enzyme-like 1	NM_021776	0,0191	<b>-3,15</b>	0006508 // proteolysis
Pycr1	pyrroline-5-carboxylate reductase 1 (predicted)	NM_001105857	0,0013	<b>-3,10</b>	
Enpep	glutamyl aminopeptidase	NM_022251	0,0246	<b>-2,97</b>	0006508 // proteolysis
Rbp4	retinol binding protein 4, plasma	NM_013162	0,0237	<b>-2,74</b>	0006810 // transport
Ptprz1	protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	NM_013080	0,0029	<b>-2,68</b>	0006470 // protein amino acid dephosphorylation
Clcnkb	chloride channel Kb	NM_173103	0,0039	<b>-2,60</b>	0006810 // transport
Gpc3	glypican 3	NM_012774	0,0012	<b>-2,60</b>	0001658 // ureteric bud branching
DIk1	delta-like 1 homolog (Drosophila)	NM_053744	0,0049	<b>-2,57</b>	0030154 // cell differentiation
Abcc8	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8	NM_013039	0,0017	<b>-2,40</b>	0006810 // transport
Es1	esterase 1	NM_017004	0,0353	<b>-2,35</b>	
Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	NM_012731	0,0003	<b>-2,35</b>	0007631 // feeding behavior
Nckap1l	NCK associated protein 1 like (predicted)	NM_001108119	0,0000	<b>-2,31</b>	
Ccnd2	cyclin D2	NM_022267	0,0192	<b>-2,28</b>	0000082 // G1/S transition of mitotic cell cycle
Fshb	follicle stimulating hormone beta	NM_001007597	0,0040	<b>-2,11</b>	0042699 // follicle-stimulating hormone signaling pathway
Ppm1j	protein phosphatase 1J	NM_001005540	0,0003	<b>-2,10</b>	0006470 // protein amino acid dephosphorylation
Rem2	rad and gem related GTP binding protein 2	NM_022685	0,0016	<b>-2,09</b>	0006355 // regulation of transcription, DNA-dependent
Slc16a1	solute carrier family 16 (monocarboxylic	NM_012716	0,0280	<b>-2,08</b>	0006810 // transport

	acid transporters), member 1				
Svil	supervillin (predicted)	NM_001108416	0,0181	<b>-2,06</b>	0007519 // skeletal muscle development
Rab3d	RAB3D, member RAS oncogene family	NM_080580	0,0000	<b>-2,05</b>	0006810 // transport
Gls2	glutaminase 2 (liver, mitochondrial)	NM_138904	0,0389	<b>-2,04</b>	0006541 // glutamine metabolic process
Amigo3	adhesion molecule with Ig like domain 3	NM_178144	0,0084	<b>-2,02</b>	0007155 // cell adhesion
Ndn	necdin	NM_001008558	0,0092	<b>-2,01</b>	0001764 // neuron migration
Vldlr	very low density lipoprotein receptor	NM_013155	0,0254	<b>-1,98</b>	0001666 // response to hypoxia
Fshb	follicle stimulating hormone beta	NM_001007597	0,0021	<b>-1,97</b>	0042699 // follicle-stimulating hormone signaling pathway
Btnl3	butyrophilin-like 3	NM_001002803	0,0002	<b>-1,96</b>	0002504 // antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen MHC class II
Litaf	LPS-induced TN factor	NM_001105735	0,0233	<b>-1,95</b>	0006350 // transcription
Aldh16a1	aldehyde dehydrogenase 16 family, member A1	NM_001008694	0,0048	<b>-1,94</b>	0008152 // metabolic process
Oaf	OAF homolog (Drosophila)	NM_001014090	0,0119	<b>-1,93</b>	
Tubb6	tubulin, beta 6	NM_001025675	0,0063	<b>-1,93</b>	0007017 // microtubule-based process
Ace	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	NM_012544	0,0034	<b>-1,91</b>	0001666 // response to hypoxia
Nab2	Ngfi-A binding protein 2	XM_001056620	0,0278	<b>-1,90</b>	0001958 // endochondral ossification
Scnn1g	sodium channel, nonvoltage-gated 1 gamma	NM_017046	0,0053	<b>-1,88</b>	0001666 // response to hypoxia
Spp1	secreted phosphoprotein 1	NM_012881	0,0122	<b>-1,87</b>	0001503 // ossification
Lhb	luteinizing hormone beta	NM_001033975	0,0036	<b>-1,87</b>	
Kcnj11	potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11	NM_031358	0,0094	<b>-1,87</b>	0006810 // transport
Cd74	CD74 antigen	NM_013069	0,0020	<b>-1,86</b>	0000187 // activation of MAPK activity
Elovl5	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (yeast)	NM_134382	0,0079	<b>-1,86</b>	0006633 // fatty acid biosynthetic process
Mapkapk3	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	NM_001012127	0,0021	<b>-1,85</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Sfxn1	sideroflexin 1	NM_001012213	0,0015	<b>-1,84</b>	0006810 // transport
Bcan	brevican	NM_001033665	0,0112	<b>-1,83</b>	0007155 // cell adhesion
Lamc2	laminin, gamma 2	XM_001071267	0,0206	<b>-1,83</b>	0007155 // cell adhesion
Syt14	synaptotagmin-like 4	NM_080410	0,0253	<b>-1,82</b>	0006810 // transport

Spata1	spermatogenesis associated 1	NM_001014177	0,0109	<b>-1,81</b>	
Lepre1	leprecan 1	NM_053667	0,0006	<b>-1,80</b>	0016049 // cell growth
Slc41a2	Solute carrier family 41, member 2 (predicted)	NM_001108742	0,0046	<b>-1,80</b>	
Pycs	pyrroline-5-carboxylate synthetase	NM_001108524	0,0072	<b>-1,79</b>	
Htati2	HIV-1 tat interactive protein 2, homolog (human) (predicted)	NM_001106263	0,0006	<b>-1,78</b>	0008152 // metabolic process
Grb10	growth factor receptor bound protein 10	NM_001109093	0,0148	<b>-1,77</b>	0007165 // signal transduction
Kcnj5	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5	NM_017297	0,0268	<b>-1,77</b>	0006810 // transport
Fxyd6	FXYD domain-containing ion transport regulator 6	NM_022005	0,0288	<b>-1,76</b>	0006810 // transport
Rnd3	Rho family GTPase 3	NM_001007641	0,0334	<b>-1,76</b>	0007264 // small GTPase mediated signal transduction
Usp13	Ubiquitin specific protease 13 (isopeptidase T-3) (predicted)	NM_001107665	0,0033	<b>-1,76</b>	
Fam114a1	family with sequence similarity 114, member A1	XM_001078310	0,0001	<b>-1,76</b>	
Ptpn3	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3	XM_001055737	0,0239	<b>-1,75</b>	0006470 // protein amino acid dephosphorylation
Adamtsl4	ADAMTS-like 4	NM_001034012	0,0128	<b>-1,75</b>	0006915 // apoptosis
Pcdh21	protocadherin 21	NM_053572	0,0201	<b>-1,75</b>	0007155 // cell adhesion
Ppap2c	phosphatidic acid phosphatase type 2c	NM_139252	0,0002	<b>-1,74</b>	
Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2	NM_134350	0,0000	<b>-1,73</b>	0009615 // response to virus
Rtn4r	reticulon 4 receptor	NM_053613	0,0033	<b>-1,72</b>	0007409 // axonogenesis
Lyz	lysozyme	NM_012771	0,0247	<b>-1,72</b>	0008152 // metabolic process
Camk1g	calcium/calmodulin-dependent protein kinase I gamma	NM_182842	0,0081	<b>-1,72</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Gmppb	GDP-mannose pyrophosphorylase B (predicted)	NM_001108781	0,0057	<b>-1,71</b>	0009058 // biosynthetic process
Crem	cAMP responsive element modulator	NM_001110860	0,0357	<b>-1,70</b>	0006006 // glucose metabolic process
Fit1	fat-inducing transcript 1	NM_001106037	0,0020	<b>-1,69</b>	
Epor	erythropoietin receptor	NM_017002	0,0045	<b>-1,69</b>	0007165 // signal transduction
Plat	plasminogen activator, tissue	NM_013151	0,0187	<b>-1,67</b>	0006508 // proteolysis
Chpt1	choline phosphotransferase 1	NM_001007750	0,0064	<b>-1,66</b>	0006663 // platelet activating factor biosynthetic

					process
Dsp	desmoplakin	XM_001058415	0,0133	<b>-1,66</b>	0018149 // peptide cross-linking
Dpp3	dipeptidylpeptidase 3	NM_053748	0,0014	<b>-1,66</b>	0006508 // proteolysis
Mphosph8	M-phase phosphoprotein 8	NM_001017375	0,0205	<b>-1,66</b>	0006333 // chromatin assembly or disassembly
Prickle2	prickle-like 2 (Drosophila) (predicted)	NM_001107876	0,0221	<b>-1,65</b>	0045197 // establishment and/or maintenance of epithelial cell polarity
Heatr5a	HEAT repeat containing 5A	XM_001075318	0,0029	<b>-1,65</b>	
Gga2	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2	XM_001072617	0,0046	<b>-1,64</b>	0006461 // protein complex assembly
Arhgap9	Rho GTPase activating protein 9	NM_001012198	0,0211	<b>-1,63</b>	0007165 // signal transduction
Pabpc4	poly A binding protein, cytoplasmic 4	XM_001054606	0,0001	<b>-1,63</b>	0016071 // mRNA metabolic process
Hrasls	HRAS-like suppressor (predicted)	NM_001105871	0,0160	<b>-1,63</b>	
Sertad4	SERTA domain containing 4	NM_001108351	0,0334	<b>-1,63</b>	
Gabre	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit epsilon	NM_023091	0,0210	<b>-1,63</b>	0006810 // transport
Srm	spermidine synthase	NM_053464	0,0095	<b>-1,61</b>	0008295 // spermidine biosynthetic process
Scly	selenocysteine lyase	NM_001007755	0,0205	<b>-1,61</b>	0008152 // metabolic process
Sec24d	SEC24 related gene family, member D (S. cerevisiae) (predicted)	NM_001107723	0,0049	<b>-1,60</b>	
Map2k3	mitogen activated protein kinase kinase 3	XM_001077724	0,0043	<b>-1,59</b>	0000165 // MAPKKK cascade
Gsdma1	gasdermin A1	NM_001108297	0,0139	<b>-1,59</b>	
Pelo	pelota homolog (Drosophila)	NM_001007634	0,0044	<b>-1,59</b>	0006412 // translation
Nab1	Ngfi-A binding protein 1	NM_022856	0,0022	<b>-1,58</b>	0001958 // endochondral ossification
Trim54	tripartite motif-containing 54	NM_001013217	0,0194	<b>-1,56</b>	0007026 // negative regulation of microtubule depolymerization
Gltpd1	glycolipid transfer protein domain containing 1	NM_001007703	0,0024	<b>-1,56</b>	0046836 // glycolipid transport
Fkbp11	FK506 binding protein 11	NM_001013105	0,0111	<b>-1,56</b>	0006457 // protein folding
Gas5	growth arrest specific 5	NR_002704	0,0246	<b>-1,55</b>	
Camk2b	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta	NM_001042354	0,0203	<b>-1,55</b>	0000082 // G1/S transition of mitotic cell cycle
Ifi44	interferon-induced protein 44	NM_001107729	0,0147	<b>-1,55</b>	
Slc7a1	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	NM_013111	0,0495	<b>-1,55</b>	0006810 // transport

Steap2	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2	NM_001107846	0,0121	<b>-1,54</b>	0006893 // Golgi to plasma membrane transport
Tmem165	transmembrane protein 165	NM_001024802	0,0180	<b>-1,54</b>	
Spire1	spire homolog 1 (Drosophila) (predicted)	NM_001107381	0,0061	<b>-1,54</b>	0048193 // Golgi vesicle transport
Samd4	Sterile alpha motif domain containing 4 (predicted)	NM_001107254	0,0015	<b>-1,54</b>	0045727 // positive regulation of translation
Sstr3	somatostatin receptor 3	NM_133522	0,0116	<b>-1,54</b>	0007165 // signal transduction
Itsn1	intersectin 1	XM_001059402	0,0004	<b>-1,54</b>	0006887 // exocytosis
Rcn1	reticulocalbin 1 (predicted)	NM_001108586	0,0024	<b>-1,54</b>	0001539 // ciliary or flagellar motility
Slc38a10	solute carrier family 38, member 10	XM_001081798	0,0231	<b>-1,53</b>	
Mtmr2	myotubularin related protein 2 (predicted)	NM_001108123	0,0078	<b>-1,53</b>	0016311 // dephosphorylation
Apaf1	apoptotic peptidase activating factor 1	NM_023979	0,0386	<b>-1,53</b>	0001843 // neural tube closure
Fbxo10	F-box protein 10	XM_001071167	0,0175	<b>-1,53</b>	
Bcmo1	beta-carotene 15,15'-monooxygenase	NM_053648	0,0362	<b>-1,53</b>	
Acs1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	NM_012820	0,0051	<b>-1,52</b>	0006629 // lipid metabolic process
Rps6ka1	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 1	NM_031107	0,0071	<b>-1,52</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Fkbp14	FK506 binding protein 14	NM_001013210	0,0130	<b>-1,52</b>	0006457 // protein folding
Golt1b	golgi transport 1 homolog B (S. cerevisiae) (predicted)	NM_001113783	0,0012	<b>-1,51</b>	0016192 // vesicle-mediated transport
St8sia3	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 3	NM_013029	0,0017	<b>-1,50</b>	0006486 // protein amino acid glycosylation
Pfkfb4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	NM_019333	0,0281	<b>-1,50</b>	0006003 // fructose 2,6-bisphosphate metabolic process
Slc45a1	solute carrier family 45, member 1	NM_144747	0,0477	<b>-1,50</b>	0006810 // transport
Ltbp4	latent transforming growth factor beta binding protein 4	XM_001077795	0,0260	<b>-1,50</b>	0007179 // transforming growth factor beta receptor signaling pathway
Ramp1	receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	NM_031645	0,0156	<b>-1,49</b>	0006810 // transport
Tmem150	transmembrane protein 150	NM_139107	0,0146	<b>-1,49</b>	0009056 // catabolic process
Iqsec3	IQ motif and Sec7 domain 3	NM_207617	0,0310	<b>-1,48</b>	0032012 // regulation of ARF protein signal transduction
Ednra	endothelin receptor type A	NM_012550	0,0354	<b>-1,48</b>	0001569 // patterning of blood vessels
Abcc5	ATP-binding cassette, sub-family C	NM_053924	0,0100	<b>-1,47</b>	0006810 // transport



	(CFTR/MRP), member 5				
Oasl1	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	NM_001009681	0,0080	<b>-1,47</b>	0006464 // protein modification process
Grb14	growth factor receptor bound protein 14	NM_031623	0,0092	<b>-1,47</b>	0007165 // signal transduction
Cnih	cornichon homolog (Drosophila) (predicted)	NM_001106029	0,0055	<b>-1,46</b>	0007242 // intracellular signaling cascade
Ptpk	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K, extracellular region	NM_001029902	0,0393	<b>-1,46</b>	0006470 // protein amino acid dephosphorylation
Ap2a2	adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit	NM_031008	0,0035	<b>-1,46</b>	0006461 // protein complex assembly
Hk2	Hexokinase 2	NM_012735	0,0255	<b>-1,46</b>	0006006 // glucose metabolic process
Hr	hairless	NM_024364	0,0038	<b>-1,46</b>	0006350 // transcription
Copz2	coatamer protein complex, subunit zeta 2 (predicted)	NM_001108294	0,0480	<b>-1,46</b>	
Degs1	degenerative spermatocyte homolog 1 (Drosophila)	NM_053323	0,0045	<b>-1,46</b>	0006629 // lipid metabolic process
Syn1	synapsin I	NM_001110782	0,0304	<b>-1,46</b>	0007269 // neurotransmitter secretion
Gcs1	glucosidase 1	NM_031749	0,0038	<b>-1,46</b>	0008152 // metabolic process
Plxna3	plexin A3	NM_001107581	0,0178	<b>-1,46</b>	0007411 // axon guidance
Nr3c2	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2	NM_013131	0,0312	<b>-1,45</b>	0006350 // transcription
Ppp2r1b	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), beta isoform	NM_001025418	0,0482	<b>-1,45</b>	
Nrsn1	neurensin 1	NM_001106109	0,0120	<b>-1,45</b>	0007399 // nervous system development
Ivns1abp	influenza virus NS1A binding protein (predicted)	NM_001047085	0,0154	<b>-1,44</b>	
Slc35e1	solute carrier family 35, member E1	NM_001109107	0,0251	<b>-1,44</b>	0006810 // transport
Homer2	homer homolog 2 (Drosophila)	NM_053309	0,0160	<b>-1,44</b>	
Invs	inversin	NM_001107932	0,0466	<b>-1,44</b>	
Iars	isoleucine-tRNA synthetase (predicted)	XM_001055989	0,0062	<b>-1,44</b>	0006412 // translation
Igsf1	immunoglobulin superfamily, member 1	NM_175763	0,0020	<b>-1,43</b>	0007165 // signal transduction
Chka	choline kinase alpha	NM_017127	0,0250	<b>-1,43</b>	0006656 // phosphatidylcholine biosynthetic process
Csgalnact2	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2	NM_001106616	0,0211	<b>-1,43</b>	

Cad	carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase	NM_001105710	0,0120	<b>-1,43</b>	0006207 // 'de novo' pyrimidine base biosynthetic process
Col2a1	collagen, type II, alpha 1	NM_012929	0,0173	<b>-1,43</b>	0001502 // cartilage condensation
Pdxk	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	NM_031769	0,0131	<b>-1,43</b>	0008615 // pyridoxine biosynthetic process
Lama3	laminin, alpha 3	NM_173306	0,0482	<b>-1,43</b>	0007155 // cell adhesion
Doc2b	double C2, beta	NM_031142	0,0099	<b>-1,43</b>	0006810 // transport
Frmpd1	FERM and PDZ domain containing 1	NM_001107937	0,0351	<b>-1,43</b>	
Gpr180	G protein-coupled receptor 180	NM_001006994	0,0273	<b>-1,43</b>	(vasculogenesis KB)
Copb2	coatamer protein complex, subunit beta 2 (beta prime)	NM_021765	0,0007	<b>-1,42</b>	0006461 // protein complex assembly
Rab2b	RAB2B, member RAS oncogene family	NM_001037645	0,0132	<b>-1,42</b>	0006355 // regulation of transcription, DNA-dependent
Tmem39a	transmembrane protein 39a	NM_001013865	0,0091	<b>-1,42</b>	
Dnajb5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5 (predicted)	NM_001108004	0,0016	<b>-1,42</b>	0006986 // response to unfolded protein
Col1a1	collagen, type I, alpha 1	NM_053304	0,0318	<b>-1,42</b>	0001503 // ossification
Dmn	desmuslin	XM_001055657	0,0051	<b>-1,42</b>	
Hdlbp	high density lipoprotein binding protein	NM_172039	0,0094	<b>-1,42</b>	0006629 // lipid metabolic process
Ppfibp1	PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1) (predicted)	NM_001107896	0,0156	<b>-1,42</b>	
Pdyn	prodynorphin	NM_019374	0,0092	<b>-1,41</b>	0007218 // neuropeptide signaling pathway
Ddx25	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 25	NM_031630	0,0016	<b>-1,41</b>	0006406 // mRNA export from nucleus
Serpinh1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1	NM_017173	0,0380	<b>-1,41</b>	0006810 // transport
Srp72	signal recognition particle 72	XM_001066751	0,0120	<b>-1,41</b>	0006614 // SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane
Sez6l2	seizure related 6 homolog like 2	NM_001107550	0,0210	<b>-1,41</b>	
Fndc3b	fibronectin type III domain containing 3B (predicted)	XM_001057133	0,0029	<b>-1,41</b>	0045600 // positive regulation of fat cell differentiation
Slc2a4	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	NM_012751	0,0146	<b>-1,41</b>	0006810 // transport
Dgkg	diacylglycerol kinase, gamma	NM_013126	0,0301	<b>-1,41</b>	0007205 // activation of protein kinase C activity
Rag1ap1	recombination activating gene 1	NM_001106445	0,0291	<b>-1,41</b>	0045815 // positive regulation of gene

	activating protein 1 (predicted)				expression, epigenetic
Cog6	component of oligomeric golgi complex 6	NM_001004262	0,0223	<b>-1,40</b>	0006810 // transport
Ube1dc1	ubiquitin-activating enzyme E1-domain containing 1	NM_001009669	0,0029	<b>-1,40</b>	0006512 // ubiquitin cycle
Golga3	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 3 (predicted)	NM_001107847	0,0137	<b>-1,40</b>	
Slc35e3	solute carrier family 35, member E3	XM_001080983	0,0213	<b>-1,40</b>	
Marveld1	MARVEL domain containing 1	NM_001107590	0,0056	<b>-1,40</b>	
Cobl	cordon-bleu (predicted)	NM_001107236	0,0039	<b>-1,40</b>	0001843 // neural tube closure
Txndc11	thioredoxin domain containing 11 (predicted)	XM_220122	0,0130	<b>-1,40</b>	
Ralgps2	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2	NM_001100680	0,0167	<b>-1,40</b>	0007264 // small GTPase mediated signal transduction
Syncrip	Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	NM_001047916	0,0042	<b>-1,40</b>	0006397 // mRNA processing
Qser1	Glutamine and serine rich 1 (predicted)	XM_001079597	0,0467	<b>-1,40</b>	
B4galnt1	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1	NM_022860	0,0207	<b>-1,40</b>	0001574 // ganglioside biosynthetic process
Fam98a	family with sequence similarity 98, member A	NM_001014073	0,0044	<b>-1,39</b>	
Mark1	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1	NM_053947	0,0075	<b>-1,39</b>	0000226 // microtubule cytoskeleton organization and biogenesis
Ppapdc1b	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1B	NM_001109411	0,0106	<b>-1,39</b>	
Dc2	DC2 protein	NM_001108566	0,0058	<b>-1,39</b>	
Gramd1b	GRAM domain containing 1B (predicted)	XM_001059472	0,0458	<b>-1,39</b>	
Icam5	intercellular adhesion molecule 5, telencephalin (predicted)	XM_001077293	0,0199	<b>-1,39</b>	0006909 // phagocytosis
Nlgn3	Neuroigin 3	NM_134336	0,0004	<b>-1,38</b>	0002087 // neurological control of breathing
Col8a1	procollagen, type VIII, alpha 1 (predicted)	NM_001107100	0,0466	<b>-1,38</b>	0006817 // phosphate transport
Klhdc8b	kelch domain containing 8B	NM_001007685	0,0244	<b>-1,38</b>	
Adamtsl2	ADAMTS-like 2	XM_001078833	0,0002	<b>-1,38</b>	
Cnih2	cornichon homolog 2 (Drosophila)	NM_001025132	0,0039	<b>-1,38</b>	0007242 // intracellular signaling cascade
Pcp4	Purkinje cell protein 4	NM_013002	0,0089	<b>-1,38</b>	
Sts-1	Cbl-interacting protein Sts-1	XM_001065047	0,0307	<b>-1,38</b>	

Bzw1	basic leucine zipper and W2 domains 1	NM_198789	0,0123	<b>-1,38</b>	0006350 // transcription
Pnma3	paraneoplastic antigen MA3 (predicted)	NM_001106342	0,0014	<b>-1,38</b>	
Cables1	Cdk5 and Abl enzyme substrate 1 (predicted)	NM_001107404	0,0262	<b>-1,37</b>	0007399 // nervous system development
Ttyh3	tweety homolog 3 (Drosophila) (predicted)	NM_001107124	0,0014	<b>-1,37</b>	
Man1b1	mannosidase, alpha, class 1B, member 1	XM_001077558	0,0297	<b>-1,37</b>	0030433 // ER-associated protein catabolic process
Glb1l2	galactosidase, beta 1-like 2	XM_001053731	0,0015	<b>-1,37</b>	
Fam98a	family with sequence similarity 98, member A	NM_001014073	0,0049	<b>-1,37</b>	
Dgkz	diacylglycerol kinase zeta	NM_031143	0,0006	<b>-1,36</b>	0007205 // activation of protein kinase C activity
Lemd2	LEM domain containing 2	NM_001039032	0,0326	<b>-1,36</b>	
Lrrc59	leucine rich repeat containing 59	NM_001008280	0,0408	<b>-1,36</b>	
Wwc2	WW, C2 and coiled-coil domain containing 2	NM_001109111	0,0472	<b>-1,36</b>	
Grik4	glutamate receptor, ionotropic, kainate 4	NM_012572	0,0392	<b>-1,36</b>	0006810 // transport
Ddx39	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39	NM_053563	0,0145	<b>-1,35</b>	0000398 // nuclear mRNA splicing, via spliceosome
Alox15	arachidonate 15-lipoxygenase	NM_031010	0,0384	<b>-1,35</b>	0006691 // leukotriene metabolic process
Ppargc1b	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta	NM_176075	0,0292	<b>-1,35</b>	0006350 // transcription
Zfp536	zinc finger protein 536	XM_001077206	0,0310	<b>-1,35</b>	
Atg9a	autophagy-related 9A (yeast)	NM_001014218	0,0304	<b>-1,35</b>	0000045 // autophagic vacuole formation
Ank	progressive ankylosis	NM_053714	0,0144	<b>-1,35</b>	0006810 // transport
Epas1	endothelial PAS domain protein 1	NM_023090	0,0060	<b>-1,35</b>	0000160 // two-component signal transduction system
Eprs	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	NM_001024238	0,0007	<b>-1,35</b>	0006412 // translation
Ap3m1	adaptor-related protein complex 3, mu 1 subunit	NM_133593	0,0148	<b>-1,35</b>	0006461 // protein complex assembly
Zyx	zyxin	XM_001072096	0,0204	<b>-1,35</b>	0050727 // regulation of inflammatory response
Ube1l	ubiquitin-activating enzyme E1-like (predicted)	NM_001106856	0,0475	<b>-1,35</b>	0006464 // protein modification process
Fhdc1	FH2 domain containing 1	NM_001106437	0,0047	<b>-1,35</b>	
MyI9	myosin, light chain 9, regulatory	NM_001100885	0,0347	<b>-1,35</b>	

Rab27a	RAB27A, member RAS oncogene family	NM_017317	0,0271	<b>-1,34</b>	0006605 // protein targeting
Ints6	integrator complex subunit 6	NM_001047904	0,0225	<b>-1,34</b>	0016180 // snRNA processing
Hyou1	hypoxia up-regulated 1	NM_001034028	0,0167	<b>-1,34</b>	0001666 // response to hypoxia
Atf5	activating transcription factor 5	NM_172336	0,0134	<b>-1,34</b>	0006350 // transcription
Tram1	translocating chain-associating membrane protein 1	NM_001007701	0,0102	<b>-1,34</b>	0006810 // transport
Lnx2	ligand of numb-protein X 2 (predicted)	NM_001108329	0,0214	<b>-1,34</b>	0051260 // protein homooligomerization
Nos1ap	nitric oxide synthase 1 (neuronal) adaptor protein	NM_138922	0,0061	<b>-1,34</b>	0007269 // neurotransmitter secretion
Umps	uridine monophosphate synthetase	NM_001025402	0,0231	<b>-1,34</b>	0006207 // 'de novo' pyrimidine base biosynthetic process
Fbxo34	F-box protein 34	NM_001107257	0,0160	<b>-1,34</b>	
Dgka	diacylglycerol kinase, alpha	NM_080787	0,0344	<b>-1,34</b>	0007205 // activation of protein kinase C activity
Bhlhb8	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 8	NM_012863	0,0397	<b>-1,34</b>	0006350 // transcription
Arfgap1	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 1	NM_145090	0,0050	<b>-1,33</b>	0006810 // transport
Trabd	TraB domain containing	NM_001106788	0,0066	<b>-1,33</b>	
Nek3	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 3 (predicted)	XM_001065115	0,0395	<b>-1,33</b>	
Prdx4	peroxiredoxin 4	NM_053512	0,0478	<b>-1,33</b>	
Fig4	FIG4 homolog (S. cerevisiae)	NM_001047096	0,0091	<b>-1,33</b>	
Lama5	laminin, alpha 5	XM_001060527	0,0342	<b>-1,33</b>	0001658 // ureteric bud branching
Ipo4	importin 4 (predicted)	NM_001106038	0,0054	<b>-1,33</b>	0000059 // protein import into nucleus, docking
Ddx19	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 19	NM_001005381	0,0236	<b>-1,32</b>	0006917 // induction of apoptosis
Psm5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5 (predicted)	NM_001106569	0,0047	<b>-1,32</b>	
Mxra8	matrix-remodelling associated 8	NM_001007002	0,0009	<b>-1,32</b>	
Mier2	mesoderm induction early response 1, family member 2	NM_001108737	0,0240	<b>-1,32</b>	
Alpk2	alpha-kinase 2	XM_574162	0,0258	<b>-1,32</b>	
Trio	triple functional domain (PTPRF interacting)	NM_001107658	0,0429	<b>-1,32</b>	
Lce1c	late cornified envelope 1F (predicted)	NM_001109188	0,0394	<b>-1,32</b>	0006508 // proteolysis

Slc20a2	solute carrier family 20, member 2	NM_017223	0,0067	<b>-1,32</b>	0006817 // phosphate transport
Tmem57	transmembrane protein 57	NM_001025699	0,0209	<b>-1,31</b>	
Pdp2	pyruvate dehydrogenase phosphatase isoenzyme 2	NM_145091	0,0382	<b>-1,31</b>	0006470 // protein amino acid dephosphorylation
Fam101b	family with sequence similarity 101, member B	NM_001007611	0,0387	<b>-1,31</b>	
Eno2	enolase 2, gamma, neuronal	NM_139325	0,0292	<b>-1,31</b>	0006096 // glycolysis
Galnt1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	NM_024373	0,0410	<b>-1,31</b>	0006493 // protein amino acid O-linked glycosylation
Ctdspl	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase	NM_001106865	0,0352	<b>-1,31</b>	
Adk	adenosine kinase	NM_012895	0,0237	<b>-1,31</b>	0006166 // purine ribonucleoside salvage
Usp28	ubiquitin specific peptidase 28	NM_001108144	0,0247	<b>-1,31</b>	
Tmem164	transmembrane protein 164	NM_001109014	0,0174	<b>-1,31</b>	
Dopey2	dopey family member 2 (predicted)	XM_001055500	0,0080	<b>-1,30</b>	
Jdp1	Jun dimerization protein 1	NM_021865	0,0325	<b>-1,30</b>	0006355 // regulation of transcription, DNA-dependent
Agpat6	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6	NM_001047849	0,0220	<b>-1,30</b>	0002071 // glandular epithelial cell maturation
Dad1	defender against cell death 1	NM_138910	0,0193	<b>-1,30</b>	0006915 // apoptosis
Diap1	Diaphanous homolog 1 (Drosophila) (predicted)	NM_001107393	0,0204	<b>-1,30</b>	0030041 // actin filament polymerization
Fam20c	family with sequence similarity 20, member C	NM_001012238	0,0242	<b>-1,30</b>	
Alg11	asparagine-linked glycosylation 11 homolog	NM_001108401	0,0305	<b>-1,30</b>	0009058 // biosynthetic process

**Supplemental Table 3 : List of genes regulated by aging, classified by biological functions****A- Anterior pituitary**

<b>Category</b>	<b>P value</b>	<b>Genes</b>
Cell Death	3, 51E-04-4, 86E-02	IER3, GSTM5, PPP2R1B, ASCL1, SORBS2, PTPRK, GULP1, PRKCZ, TRADD, NFKBIA, BCAP29, ACE, CAMK1G, CDHR1, IGF2, PPP1R15A, C DKN1C, ADAMTSL4, CAV1, ITSN1, PLSCR3, APBB1, JUND, DEGS1, NOL3, SPP1, ALOX15, SOAT1, PCSK2, ATRX, EXOC2, APAF1, CHKA, RTN1, ADK, CADM1, LGALS3BP, RGS5, ZYX, INPP1, FGL2, KRT19, CSF1R, STMN1, GPC3, PLAT, S1PR1, SH3BGRL3, L1CAM, STXBP1, ALPK2, CREM, HSPB1, NEK3, GRIK2, EPHX1, IGFBP7, PPP2R2B, TNFSF12, XRCC5, CDKN2C, VTN, F2R, ABCC3, TPP1, PTGDS, EPOR, CAMK2B, GFRA3, PLK2, GSDMA, GSTP1, ITGAV, SNN, PRDM2, ATP6AP2, JUN, DDX19A, GRIA4, CTBP2, CDCP1, CAPN1, AP2A2, DDX41, SIRT3, PRKRA, GPX2, PDYN, SEPT4, REG3G, SH3KBP1, KITLG, TUBB3, LGALS1, UBA7, TRAF3IP2, SSTR3, ACCN1, CCND2, PNPT1, KLK1, CABLES1, HTATIP2, CAST, SIX1, PCGF2, GLRX, FOS, PCNA, KRT18, PRKCQ, CEBPD, CADPS2, LAMA3, DDX20, VEGFA, HSPB8, CCL13, MAP2K6, LAMA5, DGKB, LYZ, C1QA, MLLT3, GPX4, NEK7, NDN, TENC1, SOX4, ALS2, AATK, APOE, BANF1, HK2, TGFBI, CAMK2N1, IGFBP3, ZFP36L2, RPA1, IVNS1ABP, RAB25, MX1, CAMK2D, RPS6KA1, RASD1, BMP6, VIPR2, DSP, AGTR1B, ST6GAL1, TMEM57, DGKA, BAG1, MAP2K3, GALNT1, ZMYND11, NBN, PTGR1, B4GALNT1, ABCC5, EPAS1, PTPRZ1, RND3, NRP1, STK3, CD74, XPA, HYOU1, KLF11, NGB, DLK1, COL2A1, ECEL1, HBXIP, HDAC5, REV3L, AMIGO2, TIMP2, RGS10, SNCB, GRIA2, NTRK2, ATF5, HEY1, CREBL2
Cell Movement	5, 66E-04-4, 85E-02	KITLG, LGALS1, PRKCZ, TNF, IGF2, FOS, WARS, CD151, BCAN, CAV1, FCGR2A, PTP4A3, VEGFA, SPP1, IGBP1, CCL13, LAMA5, NDN, CADM1, PLEKHG5, APOE, NFIX, ZYX, IGFBP3, KRT19, STMN1, CSF1R, MX1, PLAT, FSHB, S1PR1, APLP2, COL1A1, L1CAM, BMP6, NAB2, ROBO2, GUCY1A3, MAP2K3, BAG1, TNFSF12, VTN, F2R, PTPRZ1, RND3, NRP1, SLIT2, EPOR, GFRA3, LAMC2, ITGAV, JUN, CAPN1, TIMP2, NTRK2, HEY1
Gene Expression	9, 96E-04-3, 6E-02	TRADD, JUND, NFKBIA, TRHR, VEGFA, FOS, JUN, BAG1, MAP2K6, PRKCQ, CDKN2C, HEY1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	1, 31E-03-3, 6E-02	SERPING1, CSF1R, KITLG, GPC3, S1PR1, L1CAM, MOGS, STXBP1, PRKCZ, TNF, GRIK2, ACE, ST6GAL1, IGF2, GABRA1, BCAN, CAV1, FCGR2A, PTP4A3, VTN, LAMA3, F2R, VEGFA, NRP1, PLCB1, SLIT2, GPHN, SPP1, ALOX15, ABCA1, SYN1, LAMA5, SYN2, DLG1, ITGAV, APOE, LGALS3BP, TFPI, VANGL1, GRIA2, RAMP1, IGFBP3
Cell Development	2, 03E-03-4, 85E-02	IER3, OLFM3, KITLG, LGALS1, ASCL1, PNPT1, CAST, NFKBIA, FOS, IGF2, PPP1R15A, CD151, CDKN1C, CEBPD, CAV1, CADPS2, PTP4A3, JUND, VEGFA, DEGS1, SPP1, HSPB8, MAP2K6, CCL13, LAMA5, CHKA, NDN, RGS5, IGFBP3, IVNS1ABP, STMN1, CSF1R, S1PR1, COL1A1, BMP6, NAB2, HRASLS, DGKA, MAP2K3, VTN, F2R, PTPRZ1, FAM20C, NRP1, EPOR, SLIT2, PTGDS,

		SMYD4, PTGR2, MLLT6, NAB1, ITGAV, DLK1, JUN, STEAP2, HDAC5, NR3C2, TIMP2, RGS10, NTRK2, HEY1
Cell Signaling	2, 37E-03-4, 62E-02	RAB3C, GUCY1A3, RAB27A, STEAP2, APOE, CADPS, RASD1, RAB3D, PEX5L
Cell Function and Maintenance	2, 37E-03-3, 6E-02	RAB3C, LAMC2, ABCC8, PRKCZ, FOS, RAB27A, STEAP2, JUN, CADPS, SEMA4A, GRIA4, GRIA2, RAB3D, CAV1, PEX5L, LAMA3
Molecular Transport	2, 37E-03-3, 6E-02	PDYN, GULP1, STXBP1, CREM, AGTR1B, FOS, NRXN1, SCNN1G, CADPS, CAV1, AGTRAP, PEX5L, B4GALNT1, ABCC5, RAB3C, SOAT1, ABCA1, SYN1, SYN2, SLC16A1, ITGAV, APAF1, RAB27A, STEAP2, APOE, NR3C2, GRIA4, GRIA2, NTRK2, RAB3D, IGFBP3
Cell Growth and Proliferation	4, 09E-03-4, 85E-02	IER3, RBBP9, KITLG, LGALS1, REM2, ASCL1, TUSC2, PNPT1, CABLES1, CAST, PCGF2, NFKBIA, IGF2, FOS, PPP1R15A, CDKN1C, CAV1, CEBPD, PTP4A3, JUND, VEGFA, DEGS1, SPP1, HSPB8, ALOX15, CCL13, MAP2K6, LAMA5, DLG1, NUBP1, MLLT3, CHKA, TENC1, NDN, APOE, RGS5, GRB10, NFIX, CAMK2N1, IGFBP3, IVNS1ABP, STMN1, CSF1R, GPC3, PLAT, S1PR1, COL1A1, RPS6KA1, RASD1, CREM, BMP6, MYL9 (includes EG:10398), GUCY1A3, HRASLS, MAP2K3, BAG1, EEF2K, IGFBP7, TNFSF12, XRCC5, ABCC5, F2R, NRP1, EPOR, SMYD4, MLLT6, VLDLR, GSTP1, ITGAV, POLD4, STEAP2, JUN, HDAC5, TFPI, CDCP1, TIMP2, ATF5, NTRK2, HEY1
Amino Acid Metabolism	4, 1E-03-4, 17E-02	ALDH18A1, CDO1, PAH, PYCR1
Carbohydrate Metabolism	4, 1E-03-4, 62E-02	VEGFA, ABCA1, SLC2A4, CHPT1, HTATIP2, APAF1, GPX4, CPT1A, IGF2, CAV1, CSGALNACT2, VTN, ABCC5, B4GALNT1
Cell Cycle	4, 1E-03-4, 86E-02	RPA1, KRT19, KITLG, PPAP2C, LGALS1, REM2, TUSC2, CCND2, COL1A1, PNPT1, CREM, PCGF2, NFKBIA, IGF2, FOS, MAP2K3, TMPO, IGFBP7, CDKN1C, NBN, CEBPD, DGKZ, CAV1, CDKN2C, DEGS1, EPOR, RPRM, ALOX15, MAP2K6, ITGAV, NEK7, CHKA, JUN, TIMP2, AP2A2, ATF5, CAMK2N1
Cell Assembly and Organization	4, 1E-03-4, 95E-02	KITLG, CAST, PRKCZ, CADPS, KRT18, CAV1, PTP4A3, LAMA3, VEGFA, NOL3, GPHN, SPP1, SYN2, DLG1, EXOC2, NDN, ARFGAP1, RTN4R, SERPINH1, ALS2, APOE, TRIO, NFIX, IGFBP3, CSF1R, STMN1, S1PR1, L1CAM, KLC1, DSP, NBN, VTN, F2R, RAB3C, RND3, NRP1, SLIT2, SYN1, ABCA1, GOLGA3, LAMC2, DIAPH1, ABCC8, RAB34, RAB27A, JUN, PLXNA3, NR3C2, GRIA4, GRIA2, AP2A2, ATG9A, RAB3D, NTRK2, LRRC4C, BHLHA15
Small Molecule Biochemistry	4, 1E-03-4, 62E-02	ALDH18A1, RPA1, PDYN, MX1, FSHB, GULP1, RASD1, STXBP1, BMP6, CREM, HTATIP2, CPT1A, PRKCZ, NFKBIA, AGTR1B, IGF2, GUCY1A3, FOS, CDO1, NRXN1, PCNA, TNFSF12, AGTRAP, CAV1, VTN, B4GALNT1, F2R, RAB3C, HOMER2, VEGFA, PLCB1, ABCA1, SYN1, SOAT1, ALOX15, LHB, SYN2, SLC2A4, CHPT1, GPX4, APAF1, PNPLA2, APOE, ACSL1, PAH, NTRK2, CSGALNACT2, PYCR1
Antigen Presentation	5, 81E-03-2, 25E-02	SPP1, CD74, CCL13, C4A, CFB, HLA-DRA, C1QA, ITGAV, HLA-DRB1, APOE, C2, UNC93B1, HLA-



		DQA1, VTN
Drug Metabolism	7, 53E-03-3, 6E-02	AGTR1B, FOS, FSHB, LHB, TNFSF12, AGTRAP, BMP6
DNA Replication, Recombination, and Repair	8, 15E-03-3, 6E-02	RPA1, FOS, JUN, MCM7, XPA, GOLGA3, NBN, RPA2
Post-Translational Modification	9, 95E-03-4, 59E-02	VEGFA, KITLG, SYN1, CCL13, APLP2, SIRT5, HDAC11, HOPX, PRKCZ, APAF1, IGF2, SIRT3, GRK6, IGFBP3
Cell Morphology	1, 18E-02-4, 95E-02	KITLG, PLAT, S1PR1, ACCN1, COL1A1, L1CAM, NAB2, GABRA1, MAP2K3, TNFSF12, CAV1, VTN, PTPRZ1, VEGFA, NRP1, SLIT2, SPP1, SYN1, CCL13, ITGAV, DLK1, KCNJ11, JUN, PLXNA3, PLEKHG5, APOE, NR3C2, NTRK2, NFIX, IGFBP3
Cell Compromise	1, 18E-02-3, 99E-02	STMN1, JUN, APOE, BST2, PLAT, XPA, ACSL1, B4GALNT1, SIX1
Lipid Metabolism	1, 18E-02-4, 62E-02	MX1, FSHB, GULP1, BMP6, CREM, CPT1A, PRKCZ, NFKBIA, TNFSF12, CAV1, B4GALNT1, F2R, HOMER2, VEGFA, PLCB1, ABCA1, ALOX15, SOAT1, LHB, CHPT1, APAF1, GPX4, PNPLA2, APOE, ACSL1
Protein Folding	1, 18E-02-1, 18E-02	PRKCZ, VEGFA
Vitamin and Mineral Metabolism	3, 55E-02-3, 6E-02	FSHB, LHB, TNFSF12, BMP6
Nucleic Acid Metabolism	3, 6E-02-3, 6E-02	RPA1, PCNA
Protein Trafficking	3, 6E-02-3, 6E-02	IGFBP3, ITGAV

## B- Hypothalamus

Category	P value	Genes
Cell Death	1, 19E-03-4, 35E-02	F2R, CALCB (includes EG:797), GJA1, CD53, ICAM1, TXNIP, HCK, HSPB1, PTPN6, CASP4, GAL, EDNRB, SLC1A2, RRAS2, STAT1, NPTX1, CD4, FCGR2A, PYCARD
Cell Signaling	1, 41E-03-4, 03E-02	F2R, CALCB (includes EG:797), GAL, FZD2, ITGB2, EDNRB, GHRH, ICAM1, SST, HCRTR1, HTR1A, CD38
Small Molecule Biochemistry	1, 41E-03-4, 45E-02	CALCB (includes EG:797), KITLG, MLLT4, GLDC, PTPRC, AADAT, CD38, SLC7A10, NTS, PTPN6, SLC1A2, EDNRB, CAMK1G, SST, UGT8, SCD, HMGCR, TTPA, GJA1, CYP51A1, GHRH, ICAM1, FADS2, PNLIP, GLS, HTR1A, CYP27A1, PHKG1, FZD2, GAL, ITGB2, FADS1, GAMT, SV2B, AQP9, WNK1
Cell Cycle	1, 77E-03-3, 54E-02	CALCB (includes EG:797), GJA1, GAL, AIF1
Lipid Metabolism	1, 82E-03-3, 54E-02	CYP27A1, GAL, CYP51A1, GHRH, FADS1, FADS2, UGT8, SCD, HMGCR, TTPA, PNLIP

Molecular Transport	3, 06E-03-4, 45E-02	F2R, GJA1, CALCB (includes EG:797), AQP1, GHRH, KITLG, ICAM1, HTR1A, TAP2, CD38, SLC7A10, NTS, FZD2, GAL, EDNRB, SLC1A2, SV2B, CP, SST, SLC40A1, AQP9
Vitamin and Mineral Metabolism	3, 06E-03-3, 54E-02	F2R, CYP27A1, FZD2, CYP51A1, GHRH, ICAM1, SST, HMGCR, PNLIP, TTPA, HTR1A, CD38
Cell Growth and Proliferation	3, 71E-03-3, 54E-02	F2R, CALCB (includes EG:797), GJA1, KITLG, CSF1R, ALDH1L1, TXNIP, CCND2, HTR1A, GAL, EDNRB, STAT1, FCGR3A, AIF1, IGFBP3
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	4, 11E-03-4, 45E-02	F2R, CALCB (includes EG:797), GJA1, KITLG, ITGB2, ICAM1, CD4, NPTX1, FCGR2A, HTR1A, IGFBP3
Nucleic Acid Metabolism	5, 96E-03-4, 03E-02	GAL, CALCB (includes EG:797), GJA1, GHRH, MLLT4, ICAM1, SST, HTR1A, AQP9
Cell Movement	6, 28E-03-3, 54E-02	KITLG, ITGB2, EDNRB, ICAM1, SST, FCGR2A, DCX
Antigen Presentation	1, 05E-02-1, 05E-02	C3, C4A
Carbohydrate Metabolism	1, 6E-02-3, 54E-02	PHKG1, GAL, PYGL, ICAM1, SCD, AQP9
Amino Acid Metabolism	1, 79E-02-4, 45E-02	PTPN6, PHKG1, EDNRB, SLC1A2, CAMK1G, GAMT, GLDC, PTPRC, AADAT, GLS, WNK1, SLC7A10
Cell Morphology	1, 79E-02-3, 54E-02	F2R, GJA1, CALCB (includes EG:797), AQP1, KITLG, SEPT11, DCX
Cell Assembly and Organization	1, 79E-02-3, 54E-02	F2R, CALCB (includes EG:797), ICAM1, IGFBP3
Cell Compromise	1, 79E-02-1, 79E-02	AQP1, ICAM1
Cell Development	1, 79E-02-3, 54E-02	CALCB (includes EG:797), KITLG, EDNRB, IGFBP3, AIF1
Cell Function and Maintenance	1, 79E-02-3, 54E-02	CALCB (includes EG:797), FCGR2A
Drug Metabolism	1, 79E-02-3, 54E-02	NTS, GHRH, GSTA1
Gene Expression	1, 79E-02-3, 54E-02	THRSP, HTR1A
Post-Translational Modification	3, 54E-02-4, 18E-02	PTPN6, PHKG1, CAMK1G, GLDC, PTPRC, WNK1

**Supplemental Table 4: List of genes regulated by aging in the hypothalamus ( $P < 0.05$  ;  $FC \geq 1.3$ )**

Gene Symbol	Gene Title	RefSeq Transcript ID	P value	Fold Change	Gene Ontology Biological Process
<b>Up-regulated</b>					
C3	complement component 3	NM_016994	0,0023	<b>5,39</b>	0001798 // positive regulation of type IIa hypersensitivity
C4-2	complement component 4, gene 2	NM_001002805	0,0005	<b>3,58</b>	0001569 // patterning of blood vessels
Ifi2712b	interferon, alpha-inducible protein 27 like 2B	NM_206846	0,0262	<b>3,07</b>	
Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	NM_001017496	0,0484	<b>2,80</b>	0006955 // immune response
Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8	NM_080767	0,0085	<b>2,54</b>	0006511 // ubiquitin-dependent protein catabolic process
Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb	NM_133298	0,0016	<b>2,52</b>	0001649 // osteoblast differentiation
Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	NM_175756	0,0001	<b>2,50</b>	0001811 // negative regulation of type I hypersensitivity
Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2	NM_198134	0,0114	<b>2,37</b>	0043123 // positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
Ctgf	connective tissue growth factor	NM_022266	0,0447	<b>2,28</b>	0001502 // cartilage condensation
Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	NM_138881	0,0219	<b>2,12</b>	0001503 // ossification
Btnl3	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B	NM_001002803	0,0008	<b>2,11</b>	0002504 // antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II
Fcgr3a	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor	NM_207603	0,0064	<b>2,00</b>	0001866 // NK T cell proliferation
Cp	ceruloplasmin	NM_012532	0,0224	<b>1,96</b>	0006810 // transport
Lgals3bp	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	NM_139096	0,0153	<b>1,95</b>	
Emr1	EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1	NM_001007557	0,0386	<b>1,95</b>	0007165 // signal transduction
Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3	NM_012588	0,0052	<b>1,90</b>	0001558 // regulation of cell growth

Icam1	intercellular adhesion molecule 1	NM_012967	0,0166	<b>1,89</b>	0007155 // cell adhesion
Anxa4	annexin A4	NM_024155	0,0395	<b>1,86</b>	0006887 // exocytosis
Hspb1	heat shock protein 1	NM_031970	0,0009	<b>1,85</b>	0006916 // anti-apoptosis
C1qa	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	NM_001008515	0,0034	<b>1,84</b>	0006817 // phosphate transport
Lcp1	lymphocyte cytosolic protein 1	NM_001012044	0,0014	<b>1,82</b>	0051017 // actin filament bundle formation
Gbp2	guanylate nucleotide binding protein 2	NM_133624	0,0468	<b>1,77</b>	0006955 // immune response
Pqlc3	PQ loop repeat containing 3	NM_001034952	0,0044	<b>1,76</b>	
Aif1	allograft inflammatory factor 1	NM_017196	0,0153	<b>1,76</b>	0000281 // cytokinesis after mitosis
Cd4	CD4 antigen	NM_012705	0,0099	<b>1,71</b>	0000747 // conjugation with cellular fusion
Asah3l	N-acylsphingosine amidohydrolase 3-like (predicted)	NM_001107943	0,0068	<b>1,70</b>	
Cyp27a1	cytochrome P450, family 27, subfamily a, polypeptide 1	NM_178847	0,0012	<b>1,68</b>	0006706 // steroid catabolic process
Crym	crystallin, mu	NM_053955	0,0094	<b>1,68</b>	0008152 // metabolic process
C2	complement component 2	NM_172222	0,0010	<b>1,67</b>	0001916 // positive regulation of T cell mediated cytotoxicity
Cenpj	centromere protein J (predicted)	NM_001107265	0,0228	<b>1,66</b>	0006281 // DNA repair
Cml3	camello-like 3	XM_001074100	0,0010	<b>1,64</b>	0001702 // gastrulation with mouth forming second
Ms4a6b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B	NM_001006975	0,0375	<b>1,63</b>	0007165 // signal transduction
Tyropb	Tyro protein tyrosine kinase binding protein	NM_212525	0,0017	<b>1,63</b>	0007242 // intracellular signaling cascade
Ctsz	cathepsin Z	NM_183330	0,0181	<b>1,63</b>	0006508 // proteolysis
Cfh	complement component factor H	NM_130409	0,0241	<b>1,62</b>	0006956 // complement activation
Plek	pleckstrin	NM_001025750	0,0046	<b>1,62</b>	0007242 // intracellular signaling cascade
Rtp4	receptor transporter protein 4 (predicted)	NM_001108321	0,0334	<b>1,61</b>	0001580 // detection of chemical stimulus involved in sensory perception of bitter taste
Rab27a	RAB27A, member RAS oncogene family	NM_017317	0,0097	<b>1,61</b>	0006605 // protein targeting
Smagp	small cell adhesion glycoprotein	NM_182817	0,0054	<b>1,61</b>	
C1qc	complement component 1, q subcomponent, C chain	NM_001008524	0,0027	<b>1,59</b>	0006817 // phosphate transport
Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2	NM_134350	0,0413	<b>1,59</b>	0009615 // response to virus

Pycard	PYD and CARD domain containing	NM_172322	0,0035	<b>1,58</b>	0006508 // proteolysis
Pcdhb9	protocadherin beta 9	NM_001109390	0,0393	<b>1,56</b>	
Pbld	phenazine biosynthesis-like protein domain containing	NM_138530	0,0071	<b>1,54</b>	0009058 // biosynthetic process
Irf8	Interferon regulatory factor 8	NM_001008722	0,0095	<b>1,53</b>	0006350 // transcription
Tspo	translocator protein	NM_012515	0,0093	<b>1,53</b>	0006811 // ion transport
Txnip	thioredoxin interacting protein	NM_001008767	0,0114	<b>1,52</b>	0006350 // transcription
Stat1	signal transducer and activator of transcription 1	NM_001034164	0,0420	<b>1,52</b>	0006350 // transcription
Matn2	matrilin 2 (predicted)	XM_001058523	0,0124	<b>1,52</b>	
M6prbp1	mannose-6-phosphate receptor binding protein 1	XM_001061015	0,0479	<b>1,51</b>	
Tmem176a	transmembrane protein 176A	NM_001039008	0,0100	<b>1,51</b>	
Adpgk	ADP-dependent glucokinase	XM_001072870	0,0127	<b>1,50</b>	0005975 // carbohydrate metabolic process
Aadat	aminoadipate aminotransferase	NM_017193	0,0091	<b>1,49</b>	0009058 // biosynthetic process
Gpr84	G protein-coupled receptor 84	NM_001109509	0,0497	<b>1,49</b>	
Cd53	CD53 antigen	NM_012523	0,0040	<b>1,48</b>	0040008 // regulation of growth
Ube1l	ubiquitin-activating enzyme E1-like (predicted)	NM_001106856	0,0005	<b>1,48</b>	0006464 // protein modification process
Anxa3	Annexin A3	NM_012823	0,0001	<b>1,47</b>	
Clec7a	C-type lectin domain family 7, member a	XM_001067977	0,0073	<b>1,47</b>	0001878 // response to yeast
Card11	caspase recruitment domain family, member 11 (predicted)	XM_001073551	0,0192	<b>1,47</b>	
C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	NM_019262	0,0092	<b>1,47</b>	0006817 // phosphate transport
Pbx3	pre B-cell leukemia transcription factor 3 (predicted)	NM_001107834	0,0223	<b>1,45</b>	0006355 // regulation of transcription, DNA-dependent
Itgam	integrin alpha M	NM_012711	0,0264	<b>1,45</b>	0007155 // cell adhesion
Blnk	B-cell linker	NM_001025767	0,0236	<b>1,44</b>	0007242 // intracellular signaling cascade
Sla	Src-like adaptor	NM_178097	0,0388	<b>1,44</b>	
Ptpn6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	NM_053908	0,0015	<b>1,44</b>	0006470 // protein amino acid dephosphorylation
Rac2	RAS-related C3 botulinum substrate 2	NM_001008384	0,0028	<b>1,44</b>	0006935 // chemotaxis
Irf9	interferon regulatory factor 9	NM_001012041	0,0079	<b>1,43</b>	0006350 // transcription

Ly86	lymphocyte antigen 86 (predicted)	NM_001106128	0,0493	<b>1,42</b>	
Npc2	Niemann Pick type C2	NM_173118	0,0003	<b>1,42</b>	0032367 // intracellular cholesterol transport
Stat2	signal transducer and activator of transcription 2	NM_001011905	0,0304	<b>1,42</b>	0006355 // regulation of transcription, DNA-dependent
Calca	calcitonin	NM_001033955	0,0129	<b>1,41</b>	0001935 // endothelial cell proliferation
Rnaset2	ribonuclease T2 (predicted)	NM_001106210	0,0007	<b>1,41</b>	
Dsp	desmoplakin	XM_001058415	0,0076	<b>1,41</b>	0018149 // peptide cross-linking
Hes1	hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	NM_024360	0,0279	<b>1,40</b>	0000122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
Csf1r	colony stimulating factor 1 receptor	NM_001029901	0,0110	<b>1,40</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Btnl3	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR	NM_001002803	0,0022	<b>1,40</b>	0002504 // antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen MHC class II
Tnfaip8l2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 2	NM_001014039	0,0127	<b>1,40</b>	
Cd68	CD68 antigen	NM_001031638	0,0417	<b>1,39</b>	
Laptm5	lysosomal-associated protein transmembrane 5	NM_053538	0,0012	<b>1,39</b>	
Tmem140	transmembrane protein 140	NM_001009709	0,0469	<b>1,39</b>	
Casp4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	NM_053736	0,0088	<b>1,39</b>	0006508 // proteolysis
S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	NM_053587	0,0133	<b>1,38</b>	0030595 // leukocyte chemotaxis
Parp12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12 (predicted)	NM_001108623	0,0255	<b>1,38</b>	
Cidea	cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A	XM_214551	0,0138	<b>1,37</b>	0001659 // temperature homeostasis
Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal	NM_001034090	0,0436	<b>1,37</b>	0006805 // xenobiotic metabolic process
Ptpcr	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	NM_001109887	0,0001	<b>1,37</b>	0001915 // negative regulation of T cell mediated cytotoxicity
Gldc	glycine decarboxylase (predicted)	NM_001107583	0,0280	<b>1,37</b>	0019464 // glycine decarboxylation via glycine cleavage system
Anxa11	annexin A11	NM_001011918	0,0014	<b>1,36</b>	
Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity III	NM_053843	0,0179	<b>1,36</b>	0001788//antibody-dependent cellular cytotox

Hck	hemopoietic cell kinase	NM_013185	0,0175	<b>1,36</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Unc93b1	unc-93 homolog B1 (C. elegans)	NM_001108513	0,0058	<b>1,36</b>	0002224 // toll-like receptor signaling pathway
Gadd45b	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	NM_001008321	0,0027	<b>1,36</b>	0000186 // activation of MAPKK activity
Cd37	CD37 antigen	NM_017124	0,0215	<b>1,36</b>	
P2ry6	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	NM_057124	0,0471	<b>1,36</b>	0007165 // signal transduction
Ctse	cathepsin E	NM_012938	0,0067	<b>1,35</b>	0006508 // proteolysis
Emcn	endomucin	NM_001004228	0,0294	<b>1,35</b>	0001525 // angiogenesis
Cyb5r2	cytochrome b5 reductase 2	NM_001014244	0,0005	<b>1,35</b>	0006694 // steroid biosynthetic process
Pygl	liver glycogen phosphorylase	NM_022268	0,0304	<b>1,35</b>	0005975 // carbohydrate metabolic process
Aqp1	aquaporin 1	NM_012778	0,0170	<b>1,35</b>	0006810 // transport
Gsta3	glutathione S-transferase A3	NM_031509	0,0083	<b>1,35</b>	0006749 // glutathione metabolic process
Zfp36	zinc finger protein 36	NM_133290	0,0286	<b>1,35</b>	0000288 // nuclear-transcribed mRNA catabolic process
B2m	beta-2 microglobulin	NM_012512	0,0021	<b>1,35</b>	0002474 // antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I
Six4	sine oculis-related homeobox 4 homolog (Drosophila) (predicted)	NM_001106739	0,0021	<b>1,35</b>	0007519 // skeletal muscle development
Tifab	TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain, family member B	NM_001025029	0,0498	<b>1,34</b>	
Slfn8	schlafen 8	NM_001013970	0,0126	<b>1,34</b>	
Pls1	plastin 1 (I isoform) (predicted)	NM_001108178	0,0061	<b>1,34</b>	
Itgb2	integrin beta 2	NM_001037780	0,0189	<b>1,34</b>	0002523 // leukocyte migration during inflammatory response
Trim6	tripartite motif-containing 6	XM_001073689	0,0270	<b>1,33</b>	
Cdh23	cadherin 23 (otocadherin)	NM_053644	0,0099	<b>1,33</b>	0007155 // cell adhesion
Cox6a2	cytochrome c oxidase, subunit VIa, polypeptide 2	NM_001109994	0,0297	<b>1,33</b>	
Gls	glutaminase	NM_001109968	0,0303	<b>1,33</b>	0002087 // neurological control of breathing
Fcna	ficolin A	NM_031348	0,0109	<b>1,33</b>	0006817 // phosphate transport
Ctss	cathepsin S	NM_017320	0,0071	<b>1,33</b>	0006508 // proteolysis
Kitl	kit ligand	NM_021843	0,0476	<b>1,33</b>	0001541 // ovarian follicle development

Sash3	SAM and SH3 domain containing 3	XM_001059303	0,0012	<b>1,32</b>	
Abca8a	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8a (predicted)	XM_001081603	0,0140	<b>1,32</b>	
Dctd	dCMP deaminase	NM_001013882	0,0164	<b>1,32</b>	0009165 // nucleotide biosynthetic process
Sp110	SP110 nuclear body protein	NM_001034137	0,0052	<b>1,32</b>	0006350 // transcription
DIK1	delta-like 1 homolog (Drosophila)	NM_053744	0,0082	<b>1,32</b>	0030154 // cell differentiation
Abcg311	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 3-like 1	NM_001004076	0,0094	<b>1,32</b>	0006810 // transport
Cmtm7	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7	NM_001109300	0,0191	<b>1,31</b>	
Arhgdib	Rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	NM_001009600	0,0069	<b>1,31</b>	
Wnk1	WNK lysine deficient protein kinase 1	NM_053794	0,0067	<b>1,30</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Ifi30	interferon gamma inducible protein 30	NM_001030026	0,0231	<b>1,30</b>	
Klhl6	kelch-like 6 (Drosophila) (predicted)	NM_001105867	0,0051	<b>1,30</b>	
<b>Downregulated</b>					
Ghrh	growth hormone releasing hormone	NM_031577	0,0120	<b>-1,99</b>	0007188 // G-protein signaling, coupled to cAMP nucleotide second messenger
S100g	S100 calcium binding protein G	NM_012521	0,0061	<b>-1,82</b>	
Nts	neurotensin	NM_001102381	0,0085	<b>-1,76</b>	0050880 // regulation of blood vessel size
Ccnd2	cyclin D2	NM_022267	0,0411	<b>-1,72</b>	0000082 // G1/S transition of mitotic cell cycle
Pnlip	pancreatic lipase	NM_013161	0,0039	<b>-1,63</b>	0006629 // lipid metabolic process
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	NM_139192	0,0106	<b>-1,57</b>	0006629 // lipid metabolic process
Wnt4	wingless-related MMTV integration site 4	NM_053402	0,0149	<b>-1,55</b>	0001838 // embryonic epithelial tube formation
Col1a1	collagen, type I, alpha 1	NM_053304	0,0322	<b>-1,52</b>	0001503 // ossification
Tlcd1	TLC domain containing 1	NM_001013858	0,0003	<b>-1,51</b>	
Tmem58	transmembrane protein 58 (predicted)	NM_001077826	0,0037	<b>-1,48</b>	
Col5a2	procollagen, type V, alpha 2	XM_001061982	0,0067	<b>-1,47</b>	0001503 // ossification
Cd38	CD38 antigen	NM_013127	0,0001	<b>-1,47</b>	0008152 // metabolic process
Gal	galanin	NM_033237	0,0129	<b>-1,46</b>	0006950 // response to stress
Tm7sf2	transmembrane 7 superfamily member 2	NM_001013071	0,0018	<b>-1,45</b>	



Slc7a10	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 10	NM_053726	0,0016	<b>-1,45</b>	0006810 // transport
Nrep	Neuronal regeneration related protein	NM_178096	0,0001	<b>-1,45</b>	0017015 // regulation of TGF-beta receptor signaling pathway
Fzd2	frizzled homolog 2 (Drosophila)	NM_172035	0,0007	<b>-1,44</b>	0007165 // signal transduction
Aqp9	aquaporin 9	NM_022960	0,0279	<b>-1,43</b>	0006810 // transport
Thrsp	thyroid hormone responsive protein	NM_012703	0,0344	<b>-1,42</b>	
Tmem100	transmembrane protein 100	NM_001017479	0,0201	<b>-1,41</b>	
Hhatl	hedgehog acyltransferase-like	NM_001106868	0,0078	<b>-1,41</b>	
Pop5	Processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP family (S. cerevisiae) (predicted)	NM_001105752	0,0032	<b>-1,41</b>	0008033 // tRNA processing
Nptx2	neuronal pentraxin 2	NM_001034199	0,0002	<b>-1,41</b>	
Nptx1	neuronal pentraxin 1	NM_153735	0,0033	<b>-1,40</b>	
Bdh1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1	NM_053995	0,0016	<b>-1,40</b>	0008152 // metabolic process
Fads2	fatty acid desaturase 2	NM_031344	0,0163	<b>-1,39</b>	0006629 // lipid metabolic process
Sept11	septin 11	NM_001107208	0,0001	<b>-1,39</b>	0051291 // protein heterooligomerization
Ndph	Norrie disease homolog	NM_001108814	0,0009	<b>-1,38</b>	0001890 // placenta development
Slc40a1	solute carrier family 39 (iron-regulated transporter), member 1	NM_133315	0,0122	<b>-1,38</b>	0006810 // transport
Hcrtr1	hypocretin (orexin) receptor 1	NM_013064	0,0127	<b>-1,38</b>	0007165 // signal transduction
Rras2	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	NM_001013434	0,0016	<b>-1,38</b>	0007264 // small GTPase mediated signal transduction
Scrg1	scrapie responsive gene 1	NM_033499	0,0247	<b>-1,37</b>	
Phkg1	phosphorylase kinase gamma 1	NM_031573	0,0183	<b>-1,37</b>	0005975 // carbohydrate metabolic process
Klhl26	kelch-like 26 (Drosophila) (predicted)	NM_001106075	0,0271	<b>-1,37</b>	
Syt6	synaptotagmin VI	NM_022191	0,0070	<b>-1,36</b>	0006810 // transport
Col4a5	collagen, type IV, alpha 5	XM_001055156	0,0286	<b>-1,36</b>	
YdjC	YdjC homolog (bacterial)	NM_001013863	0,0327	<b>-1,36</b>	
Tbl1xr1	transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1 (predicted)	NM_001108941	0,0370	<b>-1,36</b>	
Bbox1	butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase 1	NM_022629	0,0144	<b>-1,36</b>	0045329 // carnitine biosynthetic process
Cyp51	cytochrome P450, subfamily 51	NM_012941	0,0015	<b>-1,35</b>	0006694 // steroid biosynthetic process

Ttpa	tocopherol (alpha) transfer protein	NM_013048	0,0027	<b>-1,35</b>	0006810 // transport
Sv2b	synaptic vesicle glycoprotein 2b	NM_057207	0,0004	<b>-1,35</b>	0001504 // neurotransmitter uptake
Fxyd7	FXDYD domain-containing ion transport regulator 7	NM_022008	0,0028	<b>-1,35</b>	0006810 // transport
Slc1a2	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	NM_001035233	0,0096	<b>-1,34</b>	0006810 // transport
Rnf182	ring finger protein 182	NM_001109117	0,0111	<b>-1,34</b>	
Tmeff1	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1	NM_023020	0,0003	<b>-1,34</b>	0007275 // multicellular organismal development
Ednrb	endothelin receptor type B	NM_017333	0,0021	<b>-1,34</b>	0001755 // neural crest cell migration
Vangl2	vang-like 2 (van gogh, Drosophila) (predicted)	NM_001105969	0,0076	<b>-1,34</b>	0001736 // establishment of planar polarity
Ugt8a	UDP galactosyltransferase 8A	NM_019276	0,0214	<b>-1,34</b>	0006688 // glycosphingolipid biosynthetic process
Sox11	SRY-box containing gene 11	NM_053349	0,0223	<b>-1,33</b>	0001822 // kidney development
Timp4	tissue inhibitor of metalloproteinase 4	NM_001109393	0,0031	<b>-1,33</b>	
Slc1a6	solute carrier family 1 (high affinity aspartate/glutamate transporter), member	NM_032065	0,0126	<b>-1,33</b>	0006810 // transport
Gamt	guanidinoacetate methyltransferase	NM_012793	0,0122	<b>-1,33</b>	0006601 // creatine biosynthetic process
Nrarp	Notch-regulated ankyrin repeat protein	XM_575080	0,0095	<b>-1,33</b>	
Sst (SRIF)	somatostatin	NM_012659	0,0119	<b>-1,33</b>	0030334 // regulation of cell migration
Slc13a5	solute carrier family 13 (sodium-dependent citrate transporter), member 5	NM_170668	0,0271	<b>-1,32</b>	0006810 // transport
Nkain4	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting ATPase interacting 4	NM_001106550	0,0101	<b>-1,32</b>	
F2r	coagulation factor II (thrombin) receptor	NM_012950	0,0150	<b>-1,32</b>	0000186 // activation of MAPKK activity
Epm2aip1	EPM2A (laforin) interacting protein 1 (predicted)	XM_001076356	0,0355	<b>-1,32</b>	
Pdyn	prodynorphin	NM_019374	0,0110	<b>-1,32</b>	0007218 // neuropeptide signaling pathway
Zfp68	zinc finger protein 68 (predicted)	NM_001107128	0,0263	<b>-1,32</b>	
Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	NM_013134	0,0130	<b>-1,32</b>	0006694 // steroid biosynthetic process
Camk1g	calcium/calmodulin-dependent protein kinase I gamma	NM_182842	0,0275	<b>-1,31</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Aldh1l1	aldehyde dehydrogenase 1 family,	NM_022547	0,0246	<b>-1,31</b>	0006730 // one-carbon compound metabolic

	member L1				process
Metrn	meteorin, glial cell differentiation regulator	NM_001009962	0,0408	<b>-1,31</b>	0007275 // multicellular organismal development
Cyp4f17	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 17 (predicted)	XM_576190	0,0326	<b>-1,31</b>	
Cldn11	claudin 11	NM_053457	0,0499	<b>-1,31</b>	0007155 // cell adhesion
Drg1	developmentally regulated GTP binding protein 1	NM_001009685	0,0271	<b>-1,31</b>	
Mllt4	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); tran	NM_013217	0,0116	<b>-1,31</b>	0007155 // cell adhesion
Ephb2	Eph receptor B2 (predicted)	XM_001069612	0,0242	<b>-1,31</b>	0007169 // transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway
Acss2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2 (predicted)	NM_001107793	0,0291	<b>-1,31</b>	0006085 // acetyl-CoA biosynthetic process
Fads1	fatty acid desaturase 1	NM_053445	0,0167	<b>-1,30</b>	0006629 // lipid metabolic process
Cyp2d4v1	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 4	NM_138515	0,0001	<b>-1,30</b>	0010033 // response to organic substance
Sox4	SRY-box containing gene 4 (predicted)	XM_001068302	0,0079	<b>-1,30</b>	0001666 // response to hypoxia
Gja1	gap junction protein, alpha 1	NM_012567	0,0007	<b>-1,30</b>	0001701 // in utero embryonic development
Csrp2	cysteine and glycine-rich protein 2	NM_177425	0,0350	<b>-1,30</b>	
Plagl1	pleiomorphic adenoma gene-like 1	NM_012760	0,0045	<b>-1,30</b>	
Dcx	doublecortin	NM_053379	0,0161	<b>-1,30</b>	
Htr1a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A	NM_012585	0,0077	<b>-1,30</b>	

**Supplemental Table 5: List of genes regulated by LTMCR in the anterior pituitary (P < 0.05 ; FC ≥ 1.3)**

Gene Symbol	Gene Title	RefSeq Transcript ID	P value	Fold change	Gene Ontology Biological Process
<b>Up-regulated</b>					
Sncg	synuclein, gamma	NM_031688	0,0390	<b>3,11</b>	0007422 // peripheral nervous system development
Cnr1	cannabinoid receptor 1 (brain)	NM_012784	0,0478	<b>2,12</b>	0007165 // signal transduction
Per2	period homolog 2 (Drosophila)	NM_031678	0,0009	<b>2,07</b>	0006350 // transcription
Morc4	microrchidia 4	XM_001053814	0,0393	<b>2,03</b>	
Sult1a1	sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1	NM_031834	0,0252	<b>2,01</b>	0006629 // lipid metabolic process
Svil	supervillin (predicted)	NM_001108416	0,0206	<b>1,89</b>	0007519 // skeletal muscle development
Hspa1a	heat shock 70kD protein 1A	NM_031971	0,0423	<b>1,79</b>	0000723 // telomere maintenance
Ghrhr	growth hormone releasing hormone receptor	NM_012850	0,0387	<b>1,77</b>	0007165 // signal transduction
Dnajb1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1 (predicted)	NM_001108441	0,0223	<b>1,67</b>	0006457 // protein folding
Chordc1	cysteine and histidine-rich domain (CHORD)-containing, zinc-binding protein 1	NM_001108128	0,0022	<b>1,67</b>	
Fkbp5	FK506 binding protein 5	NM_001012174	0,0448	<b>1,66</b>	0006457 // protein folding
Adamtsl4	ADAMTS-like 4	NM_001034012	0,0229	<b>1,61</b>	0006915 // apoptosis
Gsta3	glutathione-S-transferase, alpha type 3	NM_031509	0,0358	<b>1,61</b>	0006749 // glutathione metabolic process
Lrrn3	leucine rich repeat protein 3, neuronal	NM_030856	0,0234	<b>1,58</b>	0000187 // activation of MAPK activity
Paip1	Polyadenylate binding protein-interacting protein 1 (predicted)	NM_001108937	0,0118	<b>1,50</b>	
Palmd	palmdelphin	NM_001025688	0,0396	<b>1,47</b>	0008360 // regulation of cell shape
Dnase1	deoxyribonuclease I	NM_013097	0,0360	<b>1,45</b>	0006308 // DNA catabolic process
Spata7	spermatogenesis associated 7	NM_138862	0,0372	<b>1,44</b>	0007283 // spermatogenesis
Nr1d2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2	NM_147210	0,0403	<b>1,44</b>	0006350 // transcription

Fkbp14	FK506 binding protein 14	NM_001013210	0,0285	<b>1,42</b>	0006457 // protein folding
Sfpq	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein ass	NM_001025271	0,0382	<b>1,42</b>	
Birc2	baculoviral IAP repeat-containing 2	NM_021752	0,0169	<b>1,42</b>	0001666 // response to hypoxia
Tef	thyrotroph embryonic factor	NM_019194	0,0117	<b>1,41</b>	0006350 // transcription
Rbm3	RNA binding motif protein 3	XM_001063211	0,0043	<b>1,39</b>	0006183 // GTP biosynthetic process
Bhlhb3	basic helix-loop-helix domain containing, class B3	NM_133303	0,0345	<b>1,37</b>	0006350 // transcription
Dnaja1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	NM_022934	0,0353	<b>1,35</b>	0006457 // protein folding
Dhx16	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16	NM_001008826	0,0132	<b>1,35</b>	0002474 // antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I
Myh6	myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha	NM_017239	0,0195	<b>1,35</b>	0000302 // response to reactive oxygen species
Syncrip	Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	NM_001047916	0,0066	<b>1,34</b>	0006397 // mRNA processing
Klf6	Kruppel-like factor 6	NM_031642	0,0345	<b>1,34</b>	0006350 // transcription
Cacybp	calcyclin binding protein	NM_001004208	0,0150	<b>1,34</b>	0006512 // ubiquitin cycle
Avil	advillin	NM_024401	0,0433	<b>1,34</b>	0007010 // cytoskeleton organization and biogenesis
Wee1	wee 1 homolog (S. pombe)	NM_001012742	0,0042	<b>1,34</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Sfpq	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein ass	NM_001025271	0,0376	<b>1,33</b>	
Birc3	baculoviral IAP repeat-containing 3	NM_023987	0,0090	<b>1,33</b>	0006916 // anti-apoptosis
Gpr176	G protein-coupled receptor 176	XM_001080723	0,0127	<b>1,33</b>	0007165 // signal transduction
Mettl7a	methyltransferase like 7A	NM_001037355	0,0061	<b>1,32</b>	0008152 // metabolic process
P4ha1	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha	NM_172062	0,0395	<b>1,32</b>	0018401 // peptidyl-proline hydroxylation to 4-hydroxy-L-proline
Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	NM_012731	0,0377	<b>1,31</b>	0007631 // feeding behavior
Cry2	cryptochrome 2 (photolyase-like)	NM_133405	0,0041	<b>1,30</b>	0006281 // DNA repair
Bnip2	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 2	NM_001106835	0,0355	<b>1,30</b>	0006915 // apoptosis
Jph3	junctionophilin 3 (predicted)	NM_001107437	0,0289	<b>1,30</b>	0040011 // locomotion

<b>Down-regulated</b>					
Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3	NM_012588	0,0037	<b>-2,33</b>	0001558 // regulation of cell growth
Robo2	Roundabout homolog 2 (Drosophila)	XM_001064680	0,0391	<b>-1,88</b>	0007411// axon guidance
Serping1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	NM_199093	0,0105	<b>-1,76</b>	0006955 // immune response
F2r	coagulation factor II (thrombin) receptor	NM_012950	0,0221	<b>-1,76</b>	0007596 // blood coagulation
Ptp4a3	protein tyrosine phosphatase 4a3 (predicted)	NM_001114405	0,0012	<b>-1,74</b>	0006470 // protein amino acid dephosphorylation
Vegfa	vascular endothelial growth factor A	NM_001110333	0,0398	<b>-1,74</b>	0001525 // angiogenesis
Cmb1	carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas)	NM_001008770	0,0369	<b>-1,74</b>	
Syn2	synapsin II	NM_001034020	0,0398	<b>-1,73</b>	0007269 // neurotransmitter secretion
Aqp4	aquaporin 4	NM_012825	0,0489	<b>-1,65</b>	0006810 // transport
Arsb	arylsulfatase B	NM_033443	0,0172	<b>-1,64</b>	0006914 // autophagy
Npas2	neuronal PAS domain protein 2 (predicted)	NM_001108214	0,0201	<b>-1,59</b>	0042745 // circadian sleep/wake cycle
Pah	phenylalanine hydroxylase	NM_012619	0,0293	<b>-1,58</b>	0006558 // L-phenylalanine metabolic process
Dusp6	Dual specificity phosphatase 6	NM_053883	0,0287	<b>-1,53</b>	0000188 // inactivation of MAPK activity
Arntl	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	NM_024362	0,0259	<b>-1,51</b>	0000060 // protein import into nucleus, translocation
Slc43a2	solute carrier family 43, member 2 (predicted)	NM_001105812	0,0238	<b>-1,47</b>	0015807 // L-amino acid transport
Carhsp1	calcium regulated heat stable protein 1	NM_152790	0,0253	<b>-1,47</b>	0006355 // regulation of transcription, DNA-dependent
H2afj	H2A histone family, member J	NM_001109610	0,0026	<b>-1,46</b>	0006334 // nucleosome assembly
Pvr12	poliovirus receptor-related 2	NM_001012064	0,0257	<b>-1,44</b>	0007156 // homophilic cell adhesion
Lym1	LYR motif containing 1	NM_001108918	0,0418	<b>-1,44</b>	
Slco3a1	Solute carrier organic anion transporter family, member 3a1	NM_177481	0,0254	<b>-1,44</b>	0006810 // transport
Emcn	endomucin	NM_001004228	0,0208	<b>-1,43</b>	0001525 // angiogenesis
Flnb	filamin, beta (predicted)	NM_001107288	0,0026	<b>-1,43</b>	0007519 // skeletal muscle development
Igfbp7	insulin-like growth factor binding protein 7	NM_001013048	0,0493	<b>-1,42</b>	0001558 // regulation of cell growth

Edg1	endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1	NM_017301	0,0424	<b>-1,42</b>	0001525 // angiogenesis
Glr1	glutaredoxin 1 (thioltransferase)	NM_022278	0,0171	<b>-1,42</b>	0006810 // transport
Pdzd11	PDZ domain containing 11 (predicted)	NM_001106945	0,0295	<b>-1,40</b>	0006265 // DNA topological change
Gja1	gap junction protein, alpha 1	NM_012567	0,0441	<b>-1,40</b>	0001701 // in utero embryonic development
Myh14	myosin, heavy polypeptide 14	NM_001100690	0,0371	<b>-1,39</b>	0030048 // actin filament-based movement
Tfpi	tissue factor pathway inhibitor	NM_017200	0,0006	<b>-1,38</b>	0007596 // blood coagulation
Slc20a2	solute carrier family 20, member 2	NM_017223	0,0241	<b>-1,38</b>	0006817 // phosphate transport
Klc1	kinesin light chain 1	NM_001081972	0,0336	<b>-1,37</b>	0008088 // axon cargo transport
Glr5	glutaredoxin 5 homolog (S. cerevisiae) (predicted)	NM_001108722	0,0053	<b>-1,37</b>	0045454 // cell redox homeostasis
Shank2	SH3/ankyrin domain gene 2	NM_001004133	0,0455	<b>-1,36</b>	0007420 // brain development
Peci	peroxisomal delta3, delta2-enoyl-Coenzyme A isomerase	NM_001006966	0,0437	<b>-1,36</b>	0008152 // metabolic process
Tgfbi	transforming growth factor, beta induced	XM_001067964	0,0422	<b>-1,36</b>	0002062 // chondrocyte differentiation
Nfs1	nitrogen fixation gene 1 (S. cerevisiae)	NM_053462	0,0006	<b>-1,35</b>	0006534 // cysteine metabolic process
Cenpb	centromere protein B	XM_001081194	0,0095	<b>-1,35</b>	
Chchd6	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6 (predicted)	NM_001106608	0,0011	<b>-1,35</b>	
Rrm1	ribonucleotide reductase M1	NM_001013236	0,0100	<b>-1,35</b>	0006260 // DNA replication
Coro1a	coronin, actin binding protein 1A	NM_130411	0,0286	<b>-1,34</b>	0008064 // regulation of actin polymerization and/or depolymerization
Apln	apelin, AGTRL1 ligand	NM_031612	0,0463	<b>-1,34</b>	0002026 // regulation of the force of heart contraction
Pigy	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Y	NM_001024370	0,0215	<b>-1,33</b>	0006506 // GPI anchor biosynthetic process
Pfkip	phosphofructokinase, platelet	NM_206847	0,0340	<b>-1,33</b>	0006096 // glycolysis
Cip98	CASK-interacting protein CIP98	NM_181088	0,0129	<b>-1,33</b>	0007268 // synaptic transmission
Galm	galactose mutarotase	NM_001007704	0,0088	<b>-1,33</b>	0005975 // carbohydrate metabolic process
Bat3	HLA-B-associated transcript 3	NM_001033968	0,0041	<b>-1,33</b>	0006464 // protein modification process
Prr13	proline rich 13	NM_001008379	0,0304	<b>-1,33</b>	

Aloxe3	arachidonate lipoxygenase 3 (predicted)	NM_001105793	0,0111	<b>-1,33</b>	
Mrpl21	mitochondrial ribosomal protein L21 (predicted)	NM_001107567	0,0041	<b>-1,32</b>	0006412 // translation
Adck5	aarF domain containing kinase 5	XM_001075206	0,0020	<b>-1,32</b>	
Trim24	tripartite motif-containing 24	NM_001044266	0,0203	<b>-1,32</b>	0010628 // positive regulation of gene expression
Mrps18a	mitochondrial ribosomal protein S18A	NM_198756	0,0011	<b>-1,32</b>	0006412 // translation
Lgals3bp	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	NM_139096	0,0377	<b>-1,32</b>	
Lrrc48	leucine rich repeat containing 48	NM_001013857	0,0434	<b>-1,32</b>	
Bat5	HLA-B associated transcript 5	NM_212531	0,0229	<b>-1,32</b>	0001916 // positive regulation of T cell mediated cytotoxicity
Aig1	androgen-induced 1	XM_001071113	0,0275	<b>-1,32</b>	
Elmo2	engulfment and cell motility 2, ced-12 homolog (C. elegans)	XM_001072606	0,0149	<b>-1,32</b>	0006909 // phagocytosis
Cd151	CD151 antigen (Raph blood group)	NM_022523	0,0113	<b>-1,32</b>	0031581 // hemidesmosome assembly
Pde9a	phosphodiesterase 9A	NM_138543	0,0371	<b>-1,32</b>	0007165 // signal transduction
Ppp1r10	protein phosphatase 1, regulatory subunit 10	NM_022951	0,0365	<b>-1,31</b>	0006350 // transcription
Camk2d	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	NM_012519	0,0326	<b>-1,31</b>	0006816 // calcium ion transport
Bola3	bolA homolog 3 (E. coli)	NM_001106601	0,0356	<b>-1,31</b>	
Atp5s	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit s	NM_001007749	0,0437	<b>-1,31</b>	0006810 // transport
Map4k2	mitogen activated protein kinase kinase kinase 2 (predicted)	NM_001106329	0,0356	<b>-1,31</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Mgea5	meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	NM_131904	0,0323	<b>-1,31</b>	0008152 // metabolic process
Shbg	sex hormone binding globulin	NM_012650	0,0128	<b>-1,31</b>	0007285 // primary spermatocyte growth
Gmpr	guanosine monophosphate reductase	NM_057188	0,0241	<b>-1,30</b>	0009117 // nucleotide metabolic process
Laptm4b	lysosomal-associated protein transmembrane 4B	NM_001013174	0,0016	<b>-1,30</b>	0006810 // transport
Vrk1	vaccinia related kinase 1	NM_001012194	0,0182	<b>-1,30</b>	0006468 // protein phosphorylation



**Supplemental Table 6: List of genes regulated by LTMCR, classified by biological functions .****A- Anterior pituitary**

<b>Category</b>	<b>P value</b>	<b>Molecules</b>
Cell Growth and Proliferation	9,91E-04-3,77E-02	GJA1, VEGFA, AQP4, NTRK2, IGFBP3
Cell Morphology	3,86E-03-2,84E-02	F2R, GJA1, ROBO2, VEGFA, AQP4, NTRK2
Protein Synthesis	4,46E-03-4,68E-02	GJA1, MGEA5, BIRC3, BIRC2, AQP4, PFKP, IGFBP3
Cell Signaling	5,59E-03-4,68E-02	VEGFA, GHRHR, S1PR1, CNR1
Molecular Transport	6,57E-03-3,77E-02	SLCO3A1, GJA1, VEGFA, SYN2, NTRK2, CNR1
Small Molecule Biochemistry	6,57E-03-4,68E-02	P4HA1, SULT1A1, SLCO3A1, GJA1, VEGFA, MGEA5, IGFBP7, SYN2, NTRK2, CNR1, IGFBP3
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	7,62E-03-4,68E-02	F2R, APLN, GJA1, SYN2, CNR1, IGFBP3
Amino Acid Metabolism	9,55E-03-4,68E-02	P4HA1, IGFBP3
Cell Cycle	9,55E-03-1,9E-02	GJA1, VEGFA
Cell Death	9,55E-03-3,77E-02	F2R, HSPA1A, VEGFA, NTRK2, CNR1
Cell Assembly and Organization	9,55E-03-4,68E-02	F2R, S1PR1, CAMK2D, SYN2, NTRK2, IGFBP3
Cell Compromise	9,55E-03-4,68E-02	HSPA1A, AQP4, NTRK2
Cell Function and Maintenance	9,55E-03-3,77E-02	HSPA1A, VEGFA, CAMK2D, SYN2
Post-Translational Modification	9,55E-03-9,55E-03	P4HA1
Protein Trafficking	9,55E-03-9,55E-03	MGEA5
Cell Movement	1,9E-02-4,68E-02	SERPING1, VEGFA, S1PR1
Drug Metabolism	1,9E-02-3,77E-02	IGFBP7, GSTA1, CNR1
Energy Production	1,9E-02-1,9E-02	GJA1
Gene Expression	1,9E-02-1,9E-02	VEGFA
Lipid Metabolism	1,9E-02-4,68E-02	SULT1A1, SLCO3A1, IGFBP7, CNR1
Nucleic Acid Metabolism	1,9E-02-4,68E-02	GJA1, GHRHR
RNA Damage and Repair	1,9E-02-1,9E-02	VEGFA
RNA Post-Transcriptional Modification	1,9E-02-1,9E-02	VEGFA
Carbohydrate Metabolism	2,84E-02-2,84E-02	MGEA5
DNA Replication, Recombination, and Repair	4,68E-02-4,68E-02	DNAJA1
Vitamin and Mineral Metabolism	4,68E-02-4,68E-02	SULT1A1

**B- Hypothalamus**

<b>Category</b>	<b>P value</b>	<b>Genes</b>
Cell Death	3,41E-03-2,17E-02	HSPA1A, IRF2, CASP8, TGM2, ITGAV
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	3,41E-03-3,36E-02	CALCRL, MMP14, CARTPT, ITGAV
Cell Assembly and Organization	3,41E-03-4,02E-02	MMP14, ITGAV
Cell Compromise	3,41E-03-1,36E-02	HSPA1A, MMP14
Cell Growth and Proliferation	3,41E-03-6,81E-03	ITGAV
Cell Movement	3,41E-03-3,69E-02	CALCRL, MMP14, ITGAV
DNA Replication, Recombination, and Repair	3,41E-03-1,69E-02	GPD1, TGM2
Gene Expression	3,41E-03-3,41E-03	YY1
Nucleic Acid Metabolism	3,41E-03-1,69E-02	GPD1, TGM2
Small Molecule Biochemistry	3,41E-03-5E-02	PRLH, GPD1, TGM2, CARTPT
Lipid Metabolism	5,92E-03-3,69E-02	PRLH, CARTPT
Molecular Transport	5,92E-03-5E-02	PRLH, CARTPT
Carbohydrate Metabolism	6,81E-03-5E-02	GPD1, CARTPT
Cell Function and Maintenance	6,81E-03-4,02E-02	HSPA1A, ITGAV
Antigen Presentation	1,36E-02-1,36E-02	LYZ
Cell Signaling	1,55E-02-3,36E-02	TGM2, ITGAV
Drug Metabolism	2,36E-02-2,36E-02	PRLH
Cell Morphology	4,02E-02-4,02E-02	ITGAV
Protein Synthesis	4,46E-02-4,46E-02	CASP8, TGM2

**Supplemental Table 7: List of genes regulated by LTMCR in the hypothalamus ( $P < 0.05$  ;  $FC \geq 1.3$ )**

Gene Symbol	Gene Title	RefSeq Transcript ID	P value	Fold change	Gene Ontology Biological Process
<b>Up-regulated</b>					
Dhx16	RT1 class Ib gene, H2-TL-like, grc region (N1) /// RT1 class Ib gene, H2-TL-like	NM_001008826	0,0015	<b>2,18</b>	0002474 // antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class 1
Gpd1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	NM_022215	0,0205	<b>1,76</b>	0005975 // carbohydrate metabolic process
Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	NM_017352	0,0161	<b>1,69</b>	0001707 // mesoderm formation
Aqr	aquarius (predicted)	NM_001100987	0,0076	<b>1,62</b>	
Hspa1a	heat shock 70kD protein 1A	NM_031971	0,0093	<b>1,56</b>	0000723 // telomere maintenance
Hspa1b	heat shock 70kD protein 1B (mapped)	NM_212504	0,0047	<b>1,56</b>	0000723 // telomere maintenance
Fkbp5	FK506 binding protein 5	NM_001012174	0,0263	<b>1,49</b>	0006457 // protein folding
Tpr	translocated promoter region	NM_001107185	0,0035	<b>1,48</b>	0006355 // regulation of transcription
RT1-149	RT1-149 protein	NM_001008826	0,0341	<b>1,43</b>	0002474 // antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class 1
Per2	period homolog 2 (Drosophila)	NM_031678	0,0167	<b>1,43</b>	0006350 // transcription
Rbm3	RNA binding motif protein 3	XM_001063211	0,0432	<b>1,41</b>	0006183 // GTP biosynthetic process
rCG_34031	similar to kynurenine formamidase	NM_001111366	0,0076	<b>1,40</b>	
Cry1	cryptochrome 1 (photolyase-like)	NM_198750	0,0232	<b>1,40</b>	0006281 // DNA repair
Lyst	lysosomal trafficking regulator	NM_053518	0,0101	<b>1,39</b>	0007040 // lysosome organization and biogenesis
Gpatch4	G patch domain containing 4	NM_001024979	0,0005	<b>1,38</b>	
Ppp1r15b	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15b (predicted)	NM_001107175	0,0142	<b>1,36</b>	0006950 // response to stress
Egr2	early growth response 2	NM_053633	0,0123	<b>1,35</b>	0006350 // transcription
Pdlim5	PDZ and LIM domain 5	NM_053326	0,0459	<b>1,35</b>	0007507 // heart development
Casp8	caspase 8	NM_022277	0,0268	<b>1,35</b>	0001525 // angiogenesis
Tmem144	transmembrane protein 144	NM_001108551	0,0345	<b>1,34</b>	
Tle1	transducin-like enhancer of split 1, homolog of Drosophila E(spl) (predicted)	XM_001066887	0,0212	<b>1,34</b>	0000122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter

Otud7b	OTU domain containing 7B	NM_001107697	0,0282	<b>1,34</b>	0016579 // protein deubiquitination
Calcr1	calcitonin receptor-like	NM_012717	0,0220	<b>1,34</b>	0006937 // regulation of muscle contraction
Nhlrc3	NHL repeat containing 3	XM_001054658	0,0071	<b>1,33</b>	
Syt6	synaptotagmin VI	NM_022191	0,0324	<b>1,32</b>	0006810 // transport
Pla2g3	phospholipase A2, group III (predicted)	NM_001106015	0,0047	<b>1,32</b>	
Camk1g	calcium/calmodulin-dependent protein kinase I gamma	NM_182842	0,0060	<b>1,31</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Itgav	integrin alpha V (predicted)	NM_001106549	0,0035	<b>1,31</b>	0001525 // angiogenesis
Wfdc6a	WAP four-disulfide core domain 6A	XM_001062561	0,0040	<b>1,31</b>	
Tctn3	tectonic family member 3	XM_001053561	0,0357	<b>1,31</b>	
Yy1	YY1 transcription factor	NM_173290	0,0032	<b>1,31</b>	0006355 // regulation of transcription
Prpf38b	PRP38 pre-mRNA processing factor 38 (yeast) domain containing B	NM_001024305	0,0016	<b>1,30</b>	0006397 // mRNA processing
Orai1	ORAI calcium release-activated calcium modulator 1	NM_001013982	0,0348	<b>1,30</b>	0006810 // transport
Ankrd54	ankyrin repeat domain 54	NM_001025285	0,0349	<b>1,30</b>	
<b>Down-regulated</b>					
Vof16	ischemia related factor vof-16	NM_147207	0,0266	<b>-2,25</b>	
Matn2	matrilin 2 (predicted)	XM_001058523	0,0027	<b>-1,62</b>	
Mmp14	matrix metalloproteinase 14	NM_031056	0,0370	<b>-1,61</b>	0001503 // ossification
Lyz	lysozyme	NM_012771	0,0358	<b>-1,51</b>	0008152 // metabolic process
Tmem10	transmembrane protein 10	NM_001017386	0,0223	<b>-1,41</b>	
Nr1d1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	NM_001113422	0,0015	<b>-1,38</b>	0006350 // transcription
Lmf1	lipase maturation factor 1	XM_001060521	0,0037	<b>-1,35</b>	0009306 // protein secretion
Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	NM_019386	0,0039	<b>-1,33</b>	0001974 // blood vessel remodeling
Cart	cocaine and amphetamine regulated transcript	NM_017110	0,0012	<b>-1,33</b>	0000186 // activation of MAPKK activity
Ddx42	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 42 (predicted)	NM_001107059	0,0377	<b>-1,32</b>	
Prlh	prolactin releasing hormone	NM_022222	0,0418	<b>-1,30</b>	0007186 // GPCR protein signaling pathway
Irf2	interferon regulatory factor 2 (predicted)	NM_001047086	0,0166	<b>-1,30</b>	0006355 // regulation of transcription

**Supplemental Table 8: List of genes regulated by dietary soy (P < 0.05 ; FC ≥ 1.3)****A- Anterior pituitary**

Gene Symbol	Gene Title	RefSeq Transcript ID	P value	Fold Change	Gene Ontology Biological Process
<b>Up-regulated</b>					
Dusp26	dual specificity phosphatase 26 (putative)	NM_001012352	0,0028	<b>2,61</b>	0006470 // protein amino acid dephosphorylation
Mlana	melan-A (predicted)	NM_001106348	0,0290	<b>1,71</b>	
Bhlhb8 *	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 8	NM_012863	0,0474	<b>1,42</b>	0006350 // transcription
Ncoa5	nuclear receptor coactivator 5 (predicted)	NM_001106543	0,0372	<b>1,38</b>	0006412 // translation
Camk2g	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma	NM_133605	0,0500	<b>1,34</b>	0000082 // G1/S transition of mitotic cell cycle
Sorbs3	sorbin and SH3 domain containing 3	NM_001005762	0,0409	<b>1,34</b>	0000122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
Slc16a13	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 13	NM_001005530	0,0353	<b>1,34</b>	0006810 // transport
Dhx16	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16	NM_001008826	0,0201	<b>1,33</b>	0002474 // antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class 1
Nckap1l *	NCK associated protein 1 like (predicted)	NM_001108119	0,0274	<b>1,32</b>	
Dnmt3a	DNA methyltransferase 3A	NM_001003957	0,0047	<b>1,31</b>	0000122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
Sox30	SRY (sex determining region Y)-box 30	XM_001069002	0,0180	<b>1,30</b>	0006508 // proteolysis
Alpl	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	NM_013059	0,0478	<b>1,30</b>	0008152 // metabolic process

<b>Down-regulated</b>					
Robo2 * <sup>†</sup>	Roundabout homolog 2 (Drosophila)	XM_001064680	0,0160	<b>-2,20</b>	0001656 // metanephros development
Igfbp3 * <sup>†</sup>	insulin-like growth factor binding protein 3	NM_012588	0,0168	<b>-2,11</b>	0001558 // regulation of cell growth
Vegfa * <sup>†</sup>	vascular endothelial growth factor A	NM_001110333	0,0127	<b>-2,08</b>	0001525 // angiogenesis
Fam122b	family with sequence similarity 122B	XM_001054191	0,0159	<b>-2,07</b>	
Lum	lumican	NM_031050	0,0086	<b>-2,06</b>	
Nqo2	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	NM_001004214	0,0137	<b>-1,99</b>	
F2r * <sup>†</sup>	coagulation factor II (thrombin) receptor	NM_012950	0,0206	<b>-1,71</b>	0000186 // activation of MAPKK activity
Cmb1 <sup>†</sup>	carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas)	NM_001008770	0,0462	<b>-1,66</b>	
Pip5k1b	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1, beta	NM_001012743	0,0436	<b>-1,63</b>	0046488 // phosphatidylinositol metabolic process
Spon1	spondin 1	NM_172067	0,0294	<b>-1,59</b>	0007155 // cell adhesion
Raph1 *	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1 (predicted)	NM_001108798	0,0377	<b>-1,58</b>	
Sec61a2	Sec61, alpha subunit 2 (S. cerevisiae) (predicted)	XM_001065523	0,0013	<b>-1,57</b>	
Arhgap18	Rho GTPase activating protein 18 (predicted)	NM_001106354	0,0286	<b>-1,55</b>	
Ehd3 *	EH-domain containing 3	NM_138890	0,0371	<b>-1,54</b>	
Pde10a	phosphodiesterase 10A	NM_022236	0,0181	<b>-1,54</b>	0007165 // signal transduction
Appl2	adaptor protein, phosphotyrosine interaction	NM_001108741	0,0447	<b>-1,53</b>	0008283 // cell proliferation
Clec16a	C-type lectin domain family 16, member A	XM_213209	0,0107	<b>-1,51</b>	
Arsb * <sup>†</sup>	arylsulfatase B	NM_033443	0,0368	<b>-1,48</b>	0006914 // autophagy
Timp3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	NM_012886	0,0255	<b>-1,46</b>	0006917 // induction of apoptosis
Slc41a3	solute carrier family 41, member 3	NM_001037492	0,0237	<b>-1,45</b>	0006812 // cation transport
Npepl1	aminopeptidase-like 1 (predicted)	NM_001107806	0,0423	<b>-1,45</b>	0006508 // proteolysis
Dab2	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	NM_024159	0,0479	<b>-1,45</b>	0000904 // cellular morphogenesis during differentiation
Reck	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs (predicted)	NM_001107954	0,0078	<b>-1,43</b>	0001955 // blood vessel maturation
H2afj * <sup>†</sup>	H2A histone family, member J	NM_001109610	0,0107	<b>-1,42</b>	0006334 // nucleosome assembly

Aco1	aconitase 1	NM_017321	0,0108	<b>-1,42</b>	0006099 // tricarboxylic acid cycle
Cdc2a *	cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)	NM_019296	0,0430	<b>-1,41</b>	0000080 // G1 phase of mitotic cell cycle
Cdca3 *	cell division cycle associated 3	NM_001007648	0,0381	<b>-1,41</b>	0006512 // ubiquitin cycle // inferred from electronic annotation /// 0007049 //
Cks2 *	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	NM_001126083	0,0138	<b>-1,40</b>	0007049 // cell cycle
Ttc19	tetratricopeptide repeat domain 19	NM_001109644	0,0100	<b>-1,40</b>	
Rps6ka4 *	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 4	NM_001108517	0,0479	<b>-1,39</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Ganab	alpha glucosidase 2 alpha neutral subunit (predicted)	NM_001106334	0,0091	<b>-1,39</b>	0005975 // carbohydrate metabolic process
Hsd3b7	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7	NM_139329	0,0192	<b>-1,38</b>	0001558 // regulation of cell growth
Ctps	cytidine 5'-triphosphate synthase (predicted)	XM_001053648	0,0398	<b>-1,38</b>	0006241 // CTP biosynthetic process
Map4k2 †	mitogen activated protein kinase kinase kinase 2 (predicted)	NM_001106329	0,0176	<b>-1,38</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Rbm13	RNA binding motif protein 13	NM_001014002	0,0491	<b>-1,37</b>	
Faah	fatty acid amide hydrolase	NM_024132	0,0212	<b>-1,37</b>	0006631 // fatty acid metabolic process
Syngn2 *	synaptogyrin 2	NM_053553	0,0066	<b>-1,37</b>	0006605 // protein targeting
Apln †	apelin, AGTRL1 ligand	NM_031612	0,0476	<b>-1,37</b>	0002026 // regulation of the force of heart contraction
Wars *	tryptophanyl-tRNA synthetase	NM_001013170	0,0383	<b>-1,36</b>	0006412 // translation
Atp2b2	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2	NM_012508	0,0292	<b>-1,36</b>	0000902 // cell morphogenesis
Cbfb	core binding factor beta	NM_001013191	0,0408	<b>-1,36</b>	0001503 // ossification
Gfm1 *	G elongation factor, mitochondrial 1	NM_053625	0,0004	<b>-1,36</b>	0006412 // translation
Kctd13 *	potassium channel tetramerisation domain containing 13	NM_198736	0,0176	<b>-1,36</b>	0006260 // DNA replication
Lsm12	LSM12 homolog (S. cerevisiae)	NM_001105843	0,0058	<b>-1,36</b>	
Mvp	major vault protein	NM_022715	0,0387	<b>-1,36</b>	
Igfbp7 * †	insulin-like growth factor binding protein 7	NM_001013048	0,0408	<b>-1,35</b>	0001558 // regulation of cell growth
Klc1 * †	kinesin light chain 1	NM_001081972	0,0011	<b>-1,35</b>	0008088 // axon cargo transport
Zfyve27	zinc finger, FYVE domain containing 27	NM_199104	0,0345	<b>-1,35</b>	
Dpp3 *	dipeptidylpeptidase 3	NM_053748	0,0157	<b>-1,35</b>	0006508 // proteolysis
Snx7 *	sorting nexin 7	NM_001012083	0,0170	<b>-1,35</b>	0007154 // cell communication

Trib2	tribbles homolog 2 (Drosophila)	NM_001108015	0,0337	<b>-1,34</b>	0006468 // protein amino acid phosphorylation
Mkks	McKusick-Kaufman syndrome protein	NM_001008353	0,0487	<b>-1,34</b>	0006457 // protein folding
Rab3a	RAB3A, member RAS oncogene family	NM_013018	0,0287	<b>-1,34</b>	0003016 // respiratory system process
Wdr36	WD repeat domain 36 (predicted)	XM_001060069	0,0215	<b>-1,34</b>	0006364 // rRNA processing
Pex7 *	peroxisome biogenesis factor 7	NM_001034147	0,0299	<b>-1,33</b>	0001764 // neuron migration
Rrm1 *†	ribonucleotide reductase M1	NM_001013236	0,0317	<b>-1,33</b>	0006260 // DNA replication
Slc10a3	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 3	NM_001024368	0,0346	<b>-1,33</b>	0006814 // sodium ion transport
Atp1a2	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 2 polypeptide	NM_012505	0,0364	<b>-1,32</b>	0001504 // neurotransmitter uptake
Pcbp3 *	poly(rC) binding protein 3	NM_001011945	0,0321	<b>-1,32</b>	
Elmo2 †	engulfment and cell motility 2, ced-12 homolog (C. elegans)	XM_001072606	0,0447	<b>-1,32</b>	0006909 // phagocytosis
Mtus1	mitochondrial tumor suppressor 1	NM_178093	0,0359	<b>-1,32</b>	0007049 // cell cycle
Cd151 *†	CD151 antigen (Raph blood group)	NM_022523	0,0103	<b>-1,32</b>	
Plcl1	phospholipase C-like 1	NM_053456	0,0499	<b>-1,31</b>	0006629 // lipid metabolic process
Cs	citrate synthase	NM_130755	0,0182	<b>-1,31</b>	0005975 // carbohydrate metabolic process
Rhbdd2	rhomboid domain containing 2	XM_001077358	0,0428	<b>-1,31</b>	
Vdac1	voltage-dependent anion channel 1	NM_031353	0,0280	<b>-1,31</b>	0001662 // behavioral fear response
Myo1e	myosin IE	NM_173101	0,0325	<b>-1,31</b>	
Mthfd1	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> dependent)	NM_022508	0,0046	<b>-1,30</b>	0000105 // histidine biosynthetic process
Racgap1	Rac GTPase-activating protein 1 (predicted)	NM_001108112	0,0182	<b>-1,30</b>	0000910 // cytokinesis
Mcart1	mitochondrial carrier triple repeat 1	NM_001024785	0,0103	<b>-1,30</b>	0006810 // transport
Rbm18	RNA binding motif protein 18 (predicted)	NM_001107838	0,0324	<b>-1,30</b>	
Mrps18a *†	mitochondrial ribosomal protein S18A	NM_198756	0,0026	<b>-1,30</b>	0006412 // translation
Znrf1	zinc and ring finger 1 (predicted)	NM_001108628	0,0434	<b>-1,30</b>	0006281 // DNA repair
Fcmd	Fukuyama type congenital muscular dystrophy homolog (human) (predicted)	NM_001108667	0,0061	<b>-1,30</b>	

\* Genes commonly regulated by age and soy.

† Genes similarly regulated by soy and LTMCR.



**B- Hypothalamus**

Gene Symbol	Gene Title	RefSeq Transcript ID	P value	Fold Change	Gene Ontology Biological Process
<b>Up-regulated</b>					
Tspyl4	TSPY-like 4	NM_001012075	0,0186	<b>1,42</b>	0006334 // nucleosome assembly
Tmem144 †	transmembrane protein 144	NM_001108551	0,0099	<b>1,37</b>	
Cit	Citron	NM_001029911	0,0006	<b>1,35</b>	0000070 // mitotic sister chromatid segregation
Pdyn *	prodynorphin	NM_019374	0,0415	<b>1,34</b>	0007218 // neuropeptide signaling pathway
Pop5 *	Processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP family ( <i>S. cerevisiae</i> ) (predicted)	NM_001105752	0,0066	<b>1,33</b>	0008033 // tRNA processing
Nf1	neurofibromatosis 1	NM_012609	0,0475	<b>1,31</b>	0000165 // MAPKKK cascade
Sema3b	sema domain, immunoglobulin domain (Ig)	NM_001079942	0,0284	<b>1,31</b>	
Susd2	sushi domain containing 2 (predicted)	NM_001106381	0,0122	<b>1,30</b>	
Nptx2 *	neuronal pentraxin 2	NM_001034199	0,0449	<b>1,30</b>	0005509 // calcium ion binding
<b>Down-regulated</b>					
Jund	Jun D proto-oncogene	NM_138875	0,0301	<b>-1,65</b>	0002076 // osteoblast development
Art3	ADP-ribosyltransferase 3	NM_001012034	0,0373	<b>-1,52</b>	0006471 // protein amino acid ADP-ribosylation
Cd7_predicted	CD7 antigen (predicted)	NM_001107074	0,0177	<b>-1,42</b>	
Tnnc2	troponin C2, fast	NM_001037351	0,0234	<b>-1,41</b>	0003009 // skeletal muscle contraction
Arhgap15	Rho GTPase activating protein 15	NM_001013917	0,0485	<b>-1,30</b>	0007165 // signal transduction

\* Genes commonly regulated by age and soy.

† Genes similarly regulated by soy and LTMCR.

**Supplemental Table 9 : List of genes regulated by dietary soy, classified by biological functions in the rat anterior pituitary .**

<b>Category</b>	<b>P value</b>	<b>Genes</b>
Cell Assembly and Organization	1,87E-05-3,26E-02	CBFB, F2R, PIP5K1B, VEGFA, GFM1, RAB3A, RECK, CDK1, VDAC1, MKKS, ROBO2, SORBS3, LUM, DAB2, ATP2B2, BHLHA15, ARSB, IGFBP3
Cell Movement	1,78E-04-3,26E-02	F2R, CBFB, APLN, TIMP3, VEGFA, RACGAP1, RECK, CDK1, ADAM19, ROBO2, WARS, CD151, LUM, DAB2, PEX7, IGFBP3
Lipid Metabolism	1,78E-04-3,26E-02	F2R, PIP5K1B, VEGFA, MLANA, FAAH, CS, PEX7
Small Molecule Biochemistry	1,78E-04-3,26E-02	F2R, ACO1, APLN, PIP5K1B, VEGFA, FAAH, ATP1A2, MVP, MTHFD1, CTPS, VDAC1, MLANA, WARS, CS, PEX7, PDE10A, ATP2B2, ARSB, IGFBP3
Cell Growth and Proliferation	2,28E-04-3,26E-02	CBFB, F2R, APLN, TIMP3, VEGFA, HLA-E, GFM1, RECK, CDK1, VDAC1, CD151, IGFBP7, DAB2, LUM, IGFBP3
Cell Death	4,79E-04-3,26E-02	VEGFA, CAMK2G, MLANA, DPP3, IGFBP7, DAB2, MVP, CDK1, ATP2B2, IGFBP3, VDAC1
Cell Development	6,16E-04-3,26E-02	TIMP3, ROBO2, VEGFA, GFM1, CD151, LUM, IGFBP3
Carbohydrate Metabolism	8,19E-04-3,26E-02	F2R, PIP5K1B, APLN, ACO1, FAAH, MLANA, MVP, ATP2B2, ARSB
Nucleic Acid Metabolism	1,31E-03-3,26E-02	F2R, CS, CTPS, PDE10A, ATP2B2, VDAC1
Cell Signaling	1,45E-03-2,72E-02	VEGFA, CAMK2G, RAB3A, BHLHA15, ATP2B2, IGFBP3, VDAC1
Molecular Transport	1,45E-03-2,72E-02	F2R, CAMK2G, FAAH, ATP1A2, RAB3A, MVP, VDAC1, MLANA, ATP2B2, BHLHA15, PDE10A, ARSB, IGFBP3
Vitamin and Mineral Metabolism	1,45E-03-3,26E-02	VEGFA, CAMK2G, FAAH, MTHFD1, BHLHA15, ATP2B2, VDAC1
Cell Morphology	2,24E-03-3,26E-02	CBFB, F2R, TIMP3, VEGFA, RACGAP1, RECK, ROBO2, CD151, IGFBP7, SORBS3, LUM, DAB2, ATP2B2, IGFBP3
Cell Cycle	5,51E-03-3,26E-02	CKS2, VEGFA, RACGAP1, IGFBP7, CDK1, IGFBP3
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	5,51E-03-3,26E-02	F2R, APLN, TIMP3, VEGFA, MLANA, CD151, RAB3A, IGFBP7, DAB2, IGFBP3, VDAC1
Cell Compromise	5,51E-03-3,26E-02	TIMP3, VEGFA, FAAH, CDK1, KLC1, ADAM19
Cell Function and Maintenance	5,51E-03-3,26E-02	F2R, VEGFA, HLA-E, RAB3A, CDK1, VDAC1
Drug Metabolism	5,51E-03-3,26E-02	VEGFA, MVP, MTHFD1
Gene Expression	5,51E-03-3,09E-02	CBFB, DNMT3A, SORBS3, DAB2, CDK1, DUSP26, IGFBP3
Protein Synthesis	5,51E-03-3,26E-02	TIMP3, VEGFA, WARS, IGFBP3, ADAM19
DNA Replication and Repair	1,64E-02-2,18E-02	VEGFA, DNMT3A
Post-Translational Modification	1,64E-02-2,75E-02	TIMP3, VEGFA, ADAM19
Amino Acid Metabolism	2,18E-02-3,26E-02	MTHFD1, IGFBP3
Protein Degradation	2,75E-02-2,75E-02	TIMP3, ADAM19

**MANUSCRIT 3.3**

**Titre du manuscrit:** **Age-related effects of *in vivo* gluco- and lipotoxicity on the rat somatotroph axis**

**Auteurs:** **Karine Bédard**, Catherine Lagacé, Ghislaine Fontés, Bader Zarrouki, Derek K Hagman, Thierry Alquier, Vincent Poitout, Pierrette Gaudreau

**Statut:** Soumis, le 24 novembre 2011 dans *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*

**Contribution :**

Les mises au point et la validation du modèle de rat infusé ainsi que le suivi des rats infusés auxquels l'équipe du professeur Gaudreau a eu accès, ont été réalisées par le professeur Vincent Poitout et les membres de son équipe, Ghislaine Fontés, Bader Zarrouki et Derek K. Hagman. Les dosages de glucose, d'acides gras libres et d'insuline circulants ont été effectués par Ghislaine Fontés. Les analyses statistiques de ces dosages et des caractéristiques des rats utilisés ont été effectués par Karine Bédard. L'ensemble des expériences d'extraction d'ARN et de RT-PCR en temps réel, de même que l'analyse des résultats ont été effectuées par Karine Bédard avec l'aide de Catherine Lagacé, stagiaire de niveau collégial. Les dosages du contenu hypophysaire en GH, des niveaux plasmatiques d'IGF-1, d'IGFbp3 et de corticostérone ont été effectués par Karine Bédard. Les résultats des niveaux d'ARNm du GHRH hypothalamique chez les rats infusés de 6 mois proviennent d'une étude de régulation génique réalisée par le professeur Thierry Alquier. L'analyse et l'interprétation des résultats ont été réalisées par Karine Bédard. L'étude a été supervisée par Pierrette Gaudreau. Le manuscrit a été rédigé par Karine Bédard et révisé par Pierrette Gaudreau et Vincent Poitout.

**Age-related effects of *in vivo* gluco- and lipotoxicity on the rat somatotroph axis**

Karine Bédard <sup>1, 5</sup>, Catherine Lagacé <sup>1</sup>, Ghislaine Fontés <sup>2</sup>, Bader Zarrouki <sup>2</sup>, Derek K. Hagman <sup>2</sup>, Thierry Alquier <sup>2,4</sup>, Vincent Poitout <sup>2,3,4,5</sup> and Pierrette Gaudreau <sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup> Laboratory of Neuroendocrinology of Aging and <sup>2</sup> Montreal Diabetes Research Center, *Centre hospitalier de l'Université de Montréal* Research Center (CRCHUM), and Departments of <sup>3</sup>Nutrition, <sup>4</sup>Medicine, and <sup>5</sup>Biochemistry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Correspondence and reprint requests should be addressed to:

Dr Pierrette Gaudreau, Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, CRCHUM, Technopôle Angus, Room 311, 2901 Rachel Street East, Montreal, Quebec, Canada H1W 4A4

Running title: *In vivo* gluco- and lipotoxicity on the somatotroph axis

**ABSTRACT**

Chronic diseases such as diabetes affect the regulation of the somatotroph axis. In diabetic rats, a reduction of circulating growth hormone (GH) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) is associated with a decrease of hypothalamic growth hormone-releasing hormone (GHRH) and somatotroph sensitivity to GHRH. Exposure of rat anterior pituitary cells to high concentrations of glucose (GLU) or free fatty acids (FFA) suggested deleterious gluco- or lipotoxic effects on GHRH-R and somatotroph functionality. In aged rats, increased serum levels of GLU and FFA could contribute to somatotroph alterations. Impacts of a sustained GLU and/or Intralipid (IL) infusion on the GH axis have not been investigated *in vivo*. In the present study, 2- and 6-month-old rats were infused with GLU and/or IL or saline for 72 h to mimic gluco- and lipotoxic environments found in diabetic or aged rats. In both age groups, up-regulation of anterior pituitary GHRH-R and ghrelin receptor mRNA levels was induced by GLU. No change in hypothalamic GHRH or somatostatin mRNA levels was observed in 2-month-old rats. Elevation of GH mRNA levels was only observed in 2-month-old GLU+IL rats indicating that the capacity to counteract glucotoxic stress and maintain somatotroph function is reduced in older rats. In contrast, combined effect of GLU+IL was required to induce significant diminution of total circulating IGF-1 and IGFBP-3 levels. Altogether these results indicate that sustained high levels of circulating GLU can induce an age-dependent somatotroph dysfunction while elevated GLU and FFA are necessary to dysregulate the GH/IGF-1 axis.

**Key words:** Glucotoxicity, Lipotoxicity, Growth hormone-releasing hormone receptor, Growth hormone, Age.

## INTRODUCTION

In the anterior pituitary, growth hormone (GH) synthesis and pulsatile release are mainly controlled by the opposite actions of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and somatostatin (SRIF) (3, 8, 44) through their cognate G-protein coupled receptors (GPCR) (24, 49). In addition, circulating ghrelin (GHS) contributes to the stimulation of pituitary GH and hypothalamic GHRH secretion *via* ghrelin receptor-1-a (GHS-R-1a) (25, 46). GH secretion leads to the production of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the liver, which mediates cell proliferation in several tissues (11). The majority of circulating IGF-1 is bound to the IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), increasing its half-life (11). In young healthy rats, a number of feedback mechanisms within the hypothalamo-pituitary-liver axis regulate GH (43, 50), GHRH-R (19, 40), GHRH (6, 37, 22) and SRIF (6, 31) synthesis and secretion.

Regulation of the somatotroph axis becomes more complex in chronic disease such as diabetes where abnormal and/or additional hormones and metabolic factors play a role. In young streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats, a model of rapid induction of hypoinsulinemia leading to hyperglycemia, GH and IGF-1 circulating levels are decreased (20, 30), and anterior pituitary GHRH-R and GHS-R mRNA levels decline 21 days post-STZ (20). In addition, changes in levels of pituitary GHRH-R 2.5-kb mRNA transcript were associated with a decreased level of functional receptors (4). In Zucker diabetic fatty rats (ZDF), a model of type 2 diabetes exhibiting hyperinsulinemia, hyperglycemia and high level of circulating free fatty acid (FFA), GH secretion is reduced (45) while circulating levels of IGF-1 are normal or slightly higher than in lean Zucker rats (29).

Exposure to high concentrations of glucose also affects the somatotroph axis. A 5-h glucose infusion was shown to increase hypothalamic SRIF and GHRH mRNA levels and decrease GH secretion in young healthy rats (28). Moreover, *in vitro* exposure (24-72 h) of 2-month-old rat anterior pituitary cells to high concentrations of glucose decreases GHRH-R mRNA levels (4), GHRH-R functionality (4) and GHRH-induced GH secretion (36).

Intravenous administration of Intralipid (IL) to young rats suggests that supraphysiological levels of circulating FFA may suppress *in vivo* GHRH-induced GH response (2, 17). A 72-h perfusion of rat anterior pituitary cells to high levels of caprylic acid was reported to inhibit basal and GHRH-induced GH secretion and slightly reduced GHRH(1-29)NH<sub>2</sub> affinity to GHRH-R (35). In addition, a 24-h exposure of baboon pituitary cultured cells to oleic or linoleic acid was shown to reduce GH, GHRH-R and GHS-R mRNA levels (23).

In old rats, the somatotroph responsiveness to GHRH is decreased leading to a decline of GH and IGF-1 circulating levels (12, 38). Reduction of functional GHRH-R levels has been proposed to represent an important factor in this process (1, 15). Of interest, elevated levels of circulating glucose (10-12 mM) and FFA (0.46-0.52 mM) have been observed in 12- and 18-month-old rats (5) and could participate in somatopause.

The chronic elevation of circulating glucose and FFA, known to cause numerous cellular deleterious effects, has been termed gluco- and lipotoxicity. They have mainly been studied in the context of type 2 diabetes pancreatic  $\beta$ -cells failure (34). Here, gluco- and lipotoxicity refer to the overall effects of high glucose and/or FFA inducing somatotroph

dysfunctions. Previously, we have shown *in vitro* that the glucose-induced effects were not the result of cell death (4). *In vivo* effects of gluco- and lipotoxic environments, mimicking those found either in diabetic or aged rats, have not been investigated yet and may represent a novel attractive strategy to assess the impact of metabolic disturbances on somatotroph axis. In the present study, 2- and 6-month-old healthy male rats were infused 72 h with glucose (GLU) and/or Intralipid (a soybean oil emulsion generating a mixture of predominantly unsaturated fatty acids) (39), to identify their age-related individual and combined effects on somatotroph axis regulation.

## **MATERIALS AND METHODS**

*Animals and infusions.* Two- and 6-month-old male Wistar rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada) were housed in temperature- and humidity-controlled rooms, under a 12-h light-dark cycle (lights on at 07:00 h). They had free access to chow (2018-Teklad, Harlan laboratories, Indianapolis, IN) and water. Infusions were performed through a catheter inserted in the jugular vein and controlled by infusion pumps (Havard Pump 33; Havard Apparatus Canada, Saint-Laurent, QC, Canada) as previously described (14).

Two-month-old rats were randomly assigned to groups receiving either 0.9% (wt./vol.) saline (SAL) (Baxter, Mississauga, ON, Canada) or 70% (wt./vol.) GLU (McKesson, Montreal, QC, Canada) combined with 20% (vol./vol.) IL (20% soybean oil (main components: linoleic (44-62%), oleic (19-30%), palmitic (7-14%), linolenic (4-11%) and stearic (1.4-5.5%) fatty acids), 1.2% egg yolk phospholipids, 2.25% glycerine and water) (Frenesius Kabi, Uppsala, Sweden) with 20 U/ml heparin (Sandoz, Boucherville, QC, Canada).



Six-month-old rats were randomly divided into SAL, GLU, IL or GLU+IL groups. Infusions were given continuously for 72 h. In both, 2 and 6-month-old rats, GLU infusion rates were adjusted to maintain blood glucose levels ranging from 13.8 to 16.7 mM while IL infusion rates remained unchanged for 72 h (1.7 ml/kg/h) (14). This protocol was approved by the Animal Care Committee of the CRCHUM, in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

*Tissue handling.* At the end of infusion, the animals were anesthetized by intraperitoneal injection of 100 mg/ml ketamine hydrochloride (Bimeda-MTC Animal Health Inc., Cambridge, ON, Canada)/20 mg/ml xylazine (Bayer Inc., Toronto, ON, Canada) and euthanized for tissue harvesting between 09:00 and 11:30 am. Anterior pituitaries and whole hypothalami were rapidly dissected out, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. Plasma samples also were kept at -80°C for metabolic and hormone measurements.

*Biochemical and hormonal parameters.* Plasma glucose and FFA levels were quantified with colorimetric assay kits (Wako Chemicals, Osaka, Japan). FFA assay sensitivity was 0.0014 mEq/L. Intra-assay coefficients of variation (CV) were  $\leq 5\%$ . Plasma insulin levels were analyzed by radioimmunoassay (Linco Research, St-Charles, MO) (14). Assay sensitivity was 0.02 ng/ml and intra-assay CV was  $\leq 5.8\%$ . Plasma corticosterone levels were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Alpco Diagnostic, Salem, NH). Assay sensitivity was 4.1 ng/ml and intra-assay CV was  $\leq 8.4\%$ .

*Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).* Total RNA from rat anterior pituitaries and hypothalami from each group of rats was isolated with TRIzol (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and washed with 75% ethanol (4). The concentration and integrity of each RNA sample were assessed by spectrophotometry and 2100 Bioanalyser with RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada). The RNA integrity number was  $\geq 8.4$  and 9.2, for pituitaries and hypothalami, respectively. Reverse transcription of 2  $\mu\text{g}$  RNA samples was performed with the Superscript II RT kit and oligo(dT)<sub>12-18</sub> primers, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The specific primers used for real-time RT-PCR mRNA measurements are listed in Table 1. Specificity of the RT-PCR products was verified by melting curve analysis and electrophoresis on 2% agarose gel. Real-time RT-PCR was undertaken at 95°C for 15 min and then repeated for 40 cycles at 94°C for 15 s, 56 - 60°C (Table 1) for 35 s and 72°C for 30 s with a final melting step from 72 to 99°C. Relative pituitary and hypothalamic mRNA levels were quantified in infused rats by comparing them to those in control SAL rats, according to the Pfaffl equation (33) with GAPDH as reference gene. Intra-assay CV was  $\leq 2.5\%$  in all experiments.

*Anterior pituitary GH content.* Rat anterior pituitaries were homogenized in 600  $\mu\text{l}$  of ice-cold 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 10% glycerol (Gibco, Invitrogen), 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma-Aldrich), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich) and 1x of a protease inhibitor cocktail containing 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride, E-64, bestatin, leupeptin, aprotinin, and sodium EDTA (Sigma-Aldrich). GH content in pituitary homogenates was measured by rat/mouse

growth hormone ELISA kit (Millipore, Billerica, MA) following the manufacturer's protocol. All samples were analyzed in duplicate in a single assay. Assay sensitivity was 0.07 ng/ml and intra-assay CV was  $\leq 8.8\%$ . The results were expressed as  $\mu\text{g}$  GH per anterior pituitary.

*Plasma IGF-1 and IGFBP3 immunoassays.* Total plasma IGF-1 levels were measured by commercial rat ELISA kit (Diagnostic System Laboratory, Webster, TX). Samples were extracted with ethanol-HCl solution prior to the assay, according to the manufacturer's protocol. Assay sensitivity was 2 ng/ml and intra-assay CV was  $\leq 3.9\%$ . Plasma IGFBP-3 concentrations were analyzed by mouse/rat IGFBP-3 ELISA kit (Alpco Diagnostic, Salem, NH). Assay sensitivity was 0.078 ng/ml and intra-assay CV was  $\leq 6.1\%$ . Samples were analyzed in duplicate in a single assay for each dosage.

*Statistical analysis.* The results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data on 2-month-old rats were compared by unpaired Student's *t*-test and those on 6-month-old rats were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test.  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

*Characteristics of rats.* In 2-month-old rats infused with GLU+IL, the body weight (BW) at sacrifice was slightly lower (1.1-fold) than that of SAL infused rats ( $P < 0.05$ ; Table 2). Mean daily food intake was significantly lower in rats infused with GLU+IL than in SAL rats ( $P < 0.001$ ). In these animals, total energy intake per day was not decreased when taking into account calories from both infusion and food intake. Plasma glucose and FFA plasma

levels were 2.3-fold higher in GLU+IL than in SAL rats ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively). Insulin concentrations were 9.7-fold higher in 2-month-old rats infused with GLU+IL compared to SAL rats ( $P < 0.05$ ). In 6-month-old rats, the BW was similar between all groups (Table 2). Mean daily food intake was significantly lower in rats infused with IL (1.4-fold), GLU (4.2 -fold) or GLU+IL (4.9-fold) than in SAL rats ( $P < 0.001$ ), but no energy deficiency was observed. It was also significantly different between the IL and GLU ( $P < 0.001$ ) or GLU+IL groups ( $P < 0.001$ ). Plasma glucose levels were 1.7-2.0-fold higher in GLU and GLU+IL-infused rats than in IL-infused rats ( $P < 0.001$ ) and SAL controls ( $P < 0.001$ ). FFA concentrations were significantly increased in IL-infused rats compared to GLU-(14.9-fold,  $P < 0.001$ ) and SAL-infused rats (3.0-fold,  $P < 0.001$ ). They were also higher in GLU+IL than in GLU groups (8.8-fold,  $P < 0.001$ ). Insulin levels were significantly higher in GLU (34-41-fold,  $P < 0.001$ ) and GLU+IL (29-34-fold,  $P < 0.01$ ) compared to SAL and IL groups. Finally, corticosterone levels were significantly increased in 2-month-old GLU+IL infused rats (4.0-fold,  $P < 0.001$ ) compared to SAL, while no difference was observed in 6-month-old rats.

*Effects of in vivo gluco- and lipotoxicity on the expression of genes related to the somatotroph axis.* Anterior pituitary GHRH-R and GHS-R mRNA levels of 2-month-old rats, infused for 72 h with GLU+IL, were elevated by 1.9- ( $P < 0.01$ ) and 2.9-fold ( $P < 0.001$ ), respectively, compared to rats infused with SAL (Fig. 1A and 1B), with no change in SRIF receptor-2 gene (SSTR-2) expression (Fig. 1C). These changes were associated with 1.6-fold increase of GH mRNA levels ( $P < 0.05$ ) in the GLU+IL versus the SAL group (Fig. 1D). Hypothalamic GHRH and SRIF mRNA levels were not affected by 72-h infusion of GLU+IL (Fig. S1).

In 6-month-old rats, pituitary GHRH-R mRNA levels were increased 1.7- and 1.6-fold in GLU ( $P < 0.01$ ) and GLU+IL ( $P < 0.05$ ) groups, respectively, compared to the SAL group (Fig. 2A). A similar results was observed for GHS-R mRNA levels which were elevated 2.0-fold in GLU ( $P < 0.01$ ) and 2.6-fold in GLU+IL-infused rats ( $P < 0.001$ ) versus the SAL controls (Fig. 2B). IL infusion had no effect on GHRH-R and GHS-R genes. As in 2-month-old rats, no change was seen in SSTR-2 mRNA levels (Fig. 2C). Interestingly at this age, infusion of GLU, IL or both combined did not regulate GH mRNA levels (Fig. 2D). Moreover, anterior pituitary GH content was not different between groups of 6-month-old rats (SAL:  $1033 \pm 189$ , GLU:  $1178 \pm 102$ , IL:  $1081 \pm 136$  and GLU+IL:  $1136 \pm 109$  ug/pituitary).

*Effects of in vivo gluco- and lipotoxicity on immunoreactive total plasma IGF-1 and IGFBP-3 levels.* Total plasma IGF-1 concentration in 2-month-old GLU+IL-infused rats was decreased by 4.9-fold compared to SAL-infused rats (Fig. 3A;  $P < 0.001$ ), along with a 2.0-fold diminution of plasma IGFBP3 levels (Fig. 3B;  $P < 0.001$ ). In 6-month-old rats, infused with GLU+IL, plasma IGF-1 levels were 2.0-, 1.9- and 1.6-fold lower than in the SAL, GLU and IL groups, respectively (Fig. 3C:  $P < 0.01$ -0.001). Plasma IGFBP-3 levels were also significantly decreased (1.6-1.8 -fold,  $P < 0.01$ -0.001) in GLU+IL infused rats compared to the other groups (Fig. 3D).

## DISCUSSION

The present study examined the effects of *in vivo* gluco- and lipotoxicity on the somatotroph axis of 2- and 6-month-old rats, infused intravenously with GLU and/or IL for 72 h, as a novel model to mimic diabetes- or age-induced somatotroph dysfunction. We

found that a sustained elevation of GLU or GLU+IL impaired the somatotroph in an aged-related manner.

In 2- and 6-month-old rats, GLU+IL infusion up-regulated the expression of pituitary GHRH-R and GHS-R. Dissection of individual effects of GLU versus IL was performed in the oldest group of rats and revealed that mRNA levels of both GPCR were only increased by GLU. These results resemble those of Kim et al. (20) showing that pituitary GHRH-R and GHS-R mRNA levels are up-regulated in rats, 21 days post-administration of STZ. We have reported that the level of 2.5 kb GHRH-R mRNA transcript is augmented in 2-month-old rats, 2 and 21 days following STZ injection, leading to a subsequent decline of functional GHRH-R levels (4). The similarity of effects observed on GHRH-R mRNA levels, in both rat models of hypo- and hyperinsulinemia strongly suggests that insulin is not involved in the regulation of pituitary GHRH-R mRNA. We have previously shown that a 24-h exposure of 2-month-old rat anterior pituitary cultured cells to 1.0 or 5.0 nM of insulin compared to 0 or 0.3 nM (1.7 ng/mL) had no effect on GH and GHRH-R mRNA levels (5).

This glucotoxic effect on GHRH-R did not appear to be mediated by hypothalamic changes in GHRH or SRIF in 2-month-old rats, as no regulation of their mRNA levels was observed. However, DNA microarray analysis of 6-month-old rat mediobasal hypothalami showed a decrease (~1.3-fold,  $P < 0.05$ ) of GHRH mRNA levels in GLU and GLU+IL-infused rats compared to SAL group (personal communication from Dr Thierry Alquier). These results suggest that hypothalamic effects of a sustained hyperglycemia may possibly contribute in older rats, to the regulation of pituitary GHRH-R. Moreover, the changes

observed in GHRH-R levels cannot be attributed to a negative feedback of high circulating GH and IGF-1 levels, since a decrease of GHRH-R mRNA levels would be expected (19). Our results may also indicate that certain GPCRs of the B family are more sensitive to hyperglycemia than others since SSTR-2, one of the two major forms of pituitary SRIF receptors (32), was not affected by GLU or IL. Although the mechanism underlying the effect of glucotoxicity on GHRH-R and GHS-R is currently unknown, it may implicate circulating glucocorticoids since they are known to up-regulate GHRH-R and GHS-R gene expression (27, 42). Interestingly, in hyperglycemic type 2 diabetic patients, serum cortisol levels are elevated (21) and in ZDF rats, serum corticosterone levels are increased (16). The increased levels of circulating corticosterone observed in 2-month-old GLU+IL-infused rats could participate in the up-regulation of GHRH-R and GHS-R gene expression. However, in 6-month-old rats, other metabolic/hormonal factors regulate GHRH-R and GHS-R gene expression.

Whether or not the increases of GHRH-R mRNA levels observed in the present study lead to an augmentation of functional receptors and represent an adaptive mechanism allowing maintenance of somatotroph function remains to be established. This could be the case in 2-month-old rats, since pituitary GH mRNA levels are elevated but not in 6-month-old rats where pituitary GH contents remained unchanged. These results are different from those in STZ rats where pituitary GH mRNA levels are decreased, 21 (20) and 60 days after the STZ administration (10), and associated with reduced GH circulating levels (20). This could be related to longer exposures of somatotrophs to a glucotoxic environment compared to the present model. Altogether, they suggest that regulation of GH mRNA and

protein levels depend on the capacity of somatotrophs to counteract deleterious glucotoxic stress of various durations as a function of age.

Unexpectedly, glucolipotoxicity was required to induce significant diminutions of total circulating IGF-1 and IGFBP-3 levels in 2- and 6-month-old rats. These results are different from those obtained in STZ-diabetic rats where a high concentration of glucose (>27 mM compared to  $\approx$  15 mM in the present study) was sufficient to induce a decrease of serum IGF-1 (4, 20). In poorly-controlled type 2 diabetic patients, IGF-1 levels are also decreased (18). The present diminution of circulating levels of IGF-1 in a glucolipotoxic environment could be attributed to a reduced synthesis by the liver or an enhanced clearance (20). The low IGF-1 levels could reflect a decreased liver sensitivity to GH action. In STZ-diabetic rats, a decrease of liver GH receptor (GH-R) and binding protein mRNA levels was observed with diminutions of liver IGF-1 mRNA and circulating levels (26).

Circulating IGF-1 levels could also be modulated by other factors. In primary rat hepatocytes, insulin was found to increase IGF-1 mRNA levels (7). In our model, decreased IGF-1 levels were only seen in GLU+IL-infused rats and high concentrations of circulating insulin were present in both GLU and GLU+IL conditions, indicating that insulin is not a key regulator of circulating IGF-1. In STZ-rats, administration of corticosterone (50 mg/kg BW) was shown to reduce IGF-1 circulating levels (48). The increased levels of corticosterone found in 2 month-old GLU+IL-infused rats could therefore be involved in IGF-1 down-regulation. A 18-h infusion of TNF- $\alpha$  has been shown to significantly decrease IGF-1 plasma levels and liver and pituitary IGF-1 mRNA levels in young rats (13). In all



our 2- and 6-month-old groups, plasma levels of immunoreactive TNF- $\alpha$  were below the detection limit of 4.1 ng/mL (unpublished observation). Finally, reduction of plasma IGFBP-3 levels by GLU+IL infusion in 2- and 6-month-old rats may also support that IGF-1 clearance is increased in this condition.

Since the nutritional status is an important regulator of IGF-1 expression, we cannot exclude that part of the phenomenon could result from dietary protein deprivation. Infused rats ate 10-20% of the amount of chow ingested by SAL controls. A one-week protein restriction is known to decrease IGF-1 and IGFBPs levels in young rats (41, 47). It has also been shown that a 72-h complete dietary protein deprivation causes a drastic reduction of hypothalamic GHRH mRNA levels (9). This was not the case in the present study suggesting that a 80-90% protein reduction for 72 h, without total energy intake deficiency, may have less impact on GHRH-producing hypothalamic structures.

In conclusion, this is the first study reporting that a sustained high glucose and/or Intralipid infusion promote somatotroph dysfunction and GH/IGF-1 axis dysregulation in young rats. This very promising animal model should help identifying cellular and molecular mechanisms by which high circulating glucose influence somatotroph functionality in old and/or diabetic rats.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research. KB was the recipient of a doctoral studentship from Fonds de la recherche en santé du Québec and a studentship from the Faculty of Graduate Studies of the University of Montreal.

Derek K. Hagman current address is: Cancer Prevention Program, Division of Public Health Sciences, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Mail stop M4-B402, 1100 Fairview Avenue North, Seattle, WA 98109, USA.

**Disclosure statement**

None of the authors has actual or potential conflicts of interest.

**REFERENCES**

1. **Abribat T, Deslauriers N, Brazeau P, Gaudreau P.** Alterations of pituitary growth hormone-releasing factor binding sites in aging rats. *Endocrinology* 128: 633-635, 1991.
2. **Alvarez CV, Mallo F, Burguera B, Cacicedo L, Dieguez C, Casanueva FF.** Evidence for a direct pituitary inhibition by free fatty acids of in vivo growth hormone responses to growth hormone-releasing hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 53: 185-189, 1991.
3. **Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale WW, Rosenfeld MG, Evans RM.** Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314: 279-281, 1985.
4. **Bédard K, Strecko J, Thériault K, Bédard J, Veyrat-Durebex C, Gaudreau P.** Effects of a high-glucose environment on the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor: type 1 diabetes compared with in vitro glucotoxicity. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 294: E740-E751, 2008.
5. **Bédard K, Robinette K, Ferland G, Gaudreau P.** Effects of long-term dietary interventions on pituitary growth hormone-releasing hormone receptor in aging rats and potential mechanisms of action. *Mech Aging Dev* 131: 169-178, 2010.
6. **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* 212: 1279-1281, 1981.
7. **Böni-Schnetzler M, Schmid C, Meier PJ, Froesch ER.** Insulin regulates insulin-like growth factor I mRNA in rat hepatocytes. *Am J Physiol* 260: E846-851, 1991.

8. **Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R.** Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-79, 1973.
9. **Bruno JF, Song J, Xu Y, Berelowitz M.** Regulation of hypothalamic preprogrowth hormone-releasing factor messenger ribonucleic acid expression in food-deprived rats: a role for histaminergic neurotransmission. *Endocrinology* 133: 1377-1381, 1993.
10. **Busiguina S, Argente J, Garcia-Segura LM, Chowen JA.** Anatomically specific changes in the expression of somatostatin, growth hormone-releasing hormone and growth hormone receptor mRNA in diabetic rats. *J Neuroendocrinol* 12: 29-39, 2000.
11. **Butler AA and Le Roith D.** Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu Rev Physiol* 63: 141-164, 2001.
12. **Deslauriers N, Gaudreau P, Abribat T, Renier G, Petitclerc D, Brazeau P.** Dynamics of growth hormone responsiveness to growth hormone releasing factor in aging rats: peripheral and central influences. *Neuroendocrinology* 53: 439-446, 1991.
13. **Fan J, Char D, Bagby GJ, Gelato MC, Lang CH.** Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by tumor necrosis factor. *Am J Physiol* 269: R1204-12, 1995.
14. **Fontes G, Zarrouki B, Hagman DK, Latour MG, Semache M, Roskens V, Moore PC, Prentki M, Rhodes CJ, Jetton TL, Poitout V.** Glucolipotoxicity age-dependently impairs beta cell function in rats despite a marked increase in beta cell mass. *Diabetologia* 2010;53(11):2369-79.

15. **Girard N, Boulanger L, Denis S, Gaudreau P.** Differential in vivo regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor by GHRH in young and aged rats. *Endocrinology* 140: 2836-2842, 1999.
16. **Hwang IK, Yi SS, Yoo KY, Park OK, Yan B, Song W, Won MH, Yoon YS, Seong JK.** Effect of treadmill exercise on blood glucose, serum corticosterone levels and glucocorticoid receptor immunoreactivity in the hippocampus in chronic diabetic rats. *Neurochem Res* 36: 281-287, 2011.
17. **Imaki T, Shibasaki T, Masuda A, Hotta M, Yamauchi N, Demura H, Shizume K, Wakabayashi I, Ling N.** The effect of glucose and free fatty-acids on growth-hormone (GH) releasing factor-mediated GH secretion in rats. *Endocrinology* 118: 2390-2394, 1986.
18. **Janssen JA and Lamberts SW.** The role of IGF-I in the development of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: is prevention possible? *Eur J Endocrinol* 146: 467-477, 2002.
19. **Kamegai J, Unterman TG, Frohman LA, Kineman RD.** Hypothalamic/pituitary-axis of the spontaneous dwarf rat: autofeedback regulation of growth hormone (GH) includes suppression of GH releasing-hormone receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 139: 3554-3560, 1998.
20. **Kim E, Sohn S, Lee M, Jung J, Kineman RD, Park S.** Differential responses of the growth hormone axis in two rat models of streptozotocin-induced insulinopenic diabetes. *J Endocrinol* 188: 263-270, 2006.
21. **Lindmark S, Buren J, Eriksson JW.** Insulin resistance, endocrine function and adipokines in type 2 diabetes patients at different glycaemic levels: potential impact for glucotoxicity in vivo. *Clin Endocrinol* 65: 301-309, 2006.

22. **Lumpkin MD, McDonald JK.** Blockade of growth hormone-releasing factor (GRF) activity in the pituitary and hypothalamus of the conscious rat with a peptidic GRF antagonist. *Endocrinology* 124: 1522-1531, 1989.
23. **Luque RM, Gahete MD, Valentine RJ, Kineman RD.** Examination of the direct effects of metabolic factors on somatotrope function in a non-human primate model, *Papio anubis*. *J Molecular Endocrinol* 37: 25-38, 2006.
24. **Mayo KE.** Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 6: 1734-1744, 1992.
25. **McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LHT, Howard AD.** Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol* 11: 415-423, 1997.
26. **Menon RK, Stephan DA, Rao RH, Shen-Orr Z, Downs LS Jr, Roberts CT Jr, LeRoith D, Sperling MA.** Tissue-specific regulation of the growth hormone receptor gene in streptozocin-induced diabetes in the rat. *J Endocrinol* 142: 453-462, 1994.
27. **Miller TL and Mayo KE.** Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 138: 2458-2465, 1997.
28. **Murao K, Sato M, Mizobuchi M, Nimi M, Ishida T, Takahara J.** Acute effects of hypoglycemia and hyperglycemia on hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin gene expression in the rat. *Endocrinology* 134: 418-423, 1994.
29. **Nguyen-Yamamoto L, Deal CL, Finkelstein JA, Van Vliet G.** Hormonal control of growth in the genetically obese Zucker rat. I. Linear growth, plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF- binding proteins. *Endocrinology* 134: 1382-1388, 1994.

30. **Olchovsky D, Bruno JF, Wood TL, Gelato MC, Leidy JW, Jr., Gilbert JM, Jr., Berelowitz M.** Altered pituitary growth hormone (GH) regulation in streptozotocin-diabetic rats: a combined defect of hypothalamic somatostatin and GH-releasing factor. *Endocrinology* 126: 53-61, 1990.
31. **Patel YC.** Growth hormone stimulates hypothalamic somatostatin. *Life Sciences* 24: 1589-1593, 1979.
32. **Patel, YC.** Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 20: 157-98, 1999.
33. **Pfaffl MW.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* 29: e45, 2001.
34. **Poitout V, Amyot J, Semache M, Zarrouki B, Hagman D, Fontés G.** Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim Biophys Acta- Mol Cell Biol Lipids* 1801: 289-298, 2010.
35. **Renier G, Abribat T, Brazeau P, Deslauriers N, Gaudreau P.** Cellular mechanism of caprylic acid-induced growth hormone suppression. *Metabolism* 39: 1108-1112, 1990.
36. **Renier G and Serri O.** Effects of acute and prolonged glucose excess on growth hormone release by cultured rat anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 54: 521-525, 1991.
37. **Sato M and Frohman LA.** Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats. *Endocrinology* 133: 793-799, 1993.

38. **Sonntag W, Steger R, Forman L, Meites J.** Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology* 107: 1875-1879, 1980.
39. **Stein DT, Stevenson BE, Chester MW, Basit M, Daniels MB, Turley SD, McGarry JD.** The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J Clin Invest* 100: 398-403, 1997.
40. **Sugihara H, Emoto N, Tamura H, Kamegai J, Shibasaki T, Minami S, Wakabayashi I.** Effect of insulin-like growth factor-I on growth hormone-releasing factor receptor expression in primary rat anterior pituitary cell culture. *Neurosc Lett* 276: 87-90, 1999.
41. **Takahashi S, Kajikawa M, Umezawa T, Takahashi S, Kato H, Miura Y, Nam TJ, Noguchi T, Naito H.** Effect of dietary proteins on the plasma-immunoreactive insulin-like growth factor-1 somatomedin-c concentration in the rat. *Br J Nutr* 63: 521-534, 1990.
42. **Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Kineman RD, Frohman LA, Wakabayashi I.** Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone secretagogue receptor gene expression. *J Neuroendocrinol* 12: 481-485, 2000.
43. **Tannenbaum G.** Evidence for autoregulation of growth hormone secretion via the central nervous system. *Endocrinology* 107: 2117-2120, 1980.
44. **Tannenbaum G and Ling N.** The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 115: 1952-1957, 1984.
45. **Tannenbaum GS, Lapointe M, Gurd W, Finkelstein JA.** Mechanisms of impaired growth hormone secretion in genetically obese Zucker rats: roles of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 127: 3087-3095, 1990.



46. **Tannenbaum GS, Epelbaum J, Bowers CY.** Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 144: 967-974, 2003.
47. **Thissen JP, Triest S, Maes M, Underwood LE, Ketelslegers JM.** The decreased plasma concentration of insulin-like growth factor-I in protein-restricted rats is not due to decreased numbers of growth hormone receptors on isolated hepatocytes. *J Endocrinol* 124: 159-165, 1990.
48. **Unterman TG, Jentel JJ, Oehler DT, Lacson RG, Hofert JF.** Effects of glucocorticoids on circulating levels and hepatic expression of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins and IGF-I in the adrenalectomized streptozotocin-diabetic rat. *Endocrinology* 133: 2531-9, 1993.
49. **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* 89: 251-255, 1992.
50. **Yamashita S and Melmed S.** 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, 1986.

**Table 1: Primers used for real-time PCR**

<b>Primer ID</b>	<b>Refseq ID</b>	<b>Foward sequence (5' - 3')</b>	<b>Reverse sequence (5' - 3')</b>	<b>Annealing temperature (oC)</b>
<b>GAPDH</b>	NM_017008.3	AGGGCTGCCTTCTCTTGTGAC	TGGGTAGAATCATACTGGAACATGTAG	58
<b>GH</b>	NM_001034848.2	TCTCAGACTCCCTGGCTCCT	GTAGGCACGCTCGAACTCTT	60
<b>GHRH</b>	NM_031577.1	CATGCAGACGCCATCTTCAC	AACCTGGATCTTTGTTCTGG	58
<b>GHRH-R</b>	NM_012850.1	CTGCTGTCTTCCAGGGTGAT	TAGGAGATGTGGAGGCCAAC	58
<b>GHS-R</b>	NM_032075.3	GGACCAGAACCACAAGCAGA	GGCTCGAAGGACTTGAAAA	56
<b>SRIF</b>	NM_0126559	CTCTGCATCGTCCTGGCTTT	GCATCGTTCTCTGTCTGGTT	58
<b>Sstr2</b>	NM_019348.1	TCTGTCTCTGCTACCTGTTTCATCATCA	GCGCAGCTGTTGGCGTAGGT	60

**Table 2 : Body weight, metabolic and hormonal parameters at endpoint (72 h)**

Groups	2-month-old		6-month-old			
	SAL	GLU+IL	SAL	IL	GLU	GLU+IL
<b>Body weight (g)</b>	309 ± 7	270 ± 10 <sup>a</sup>	614 ± 24	634 ± 25	626 ± 21	617 ± 21
<b>Food intake (g/d)</b>	20,4 ± 0,5	1,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	26,4 ± 0,8	19,1 ± 0,7 <sup>b,d</sup>	6,3 ± 0,9 <sup>b,d</sup>	5,4 ± 1,1 <sup>b,d</sup>
<b>Glucose (mmol/L)</b>	5,82 ± 0,42	13,63 ± 1,63 <sup>c</sup>	6,47 ± 0,17	6,41 ± 0,24	10,74 ± 0,68 <sup>b,d</sup>	12,94 ± 0,93 <sup>b, d, e</sup>
<b>FFA (mmol/L)</b>	0,35 ± 0,15	0,82 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,14	1,94 ± 0,16 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,02 <sup>a, d</sup>	1,14 ± 0,17 <sup>f, g</sup>
<b>Insulin (ng/mL)</b>	1,96 ± 0,67	18,98 ± 5,63 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,14	0,41 ± 0,23	13,91 ± 2,84 <sup>b, d</sup>	11,70 ± 2,74 <sup>c, f</sup>
<b>Corticosterone (ng/mL)</b>	146 ± 13	570 ± 61 <sup>b</sup>	72 ± 21	54 ± 25	46 ± 9	83 ± 17

For 2-month-old rats, values represent the mean ± SEM of 4-5 rats/group.

For 6-month-old rats, values represent the mean ± SEM of 9-14 rats/group, except for insulin levels (5-6 rats/group) and corticosterone (3-4 rats/group).

<sup>a</sup>  $P < 0,05$  when compared to SAL group

<sup>b</sup>  $P < 0,001$  when compared to SAL group

<sup>c</sup>  $P < 0,01$  when compared to SAL group

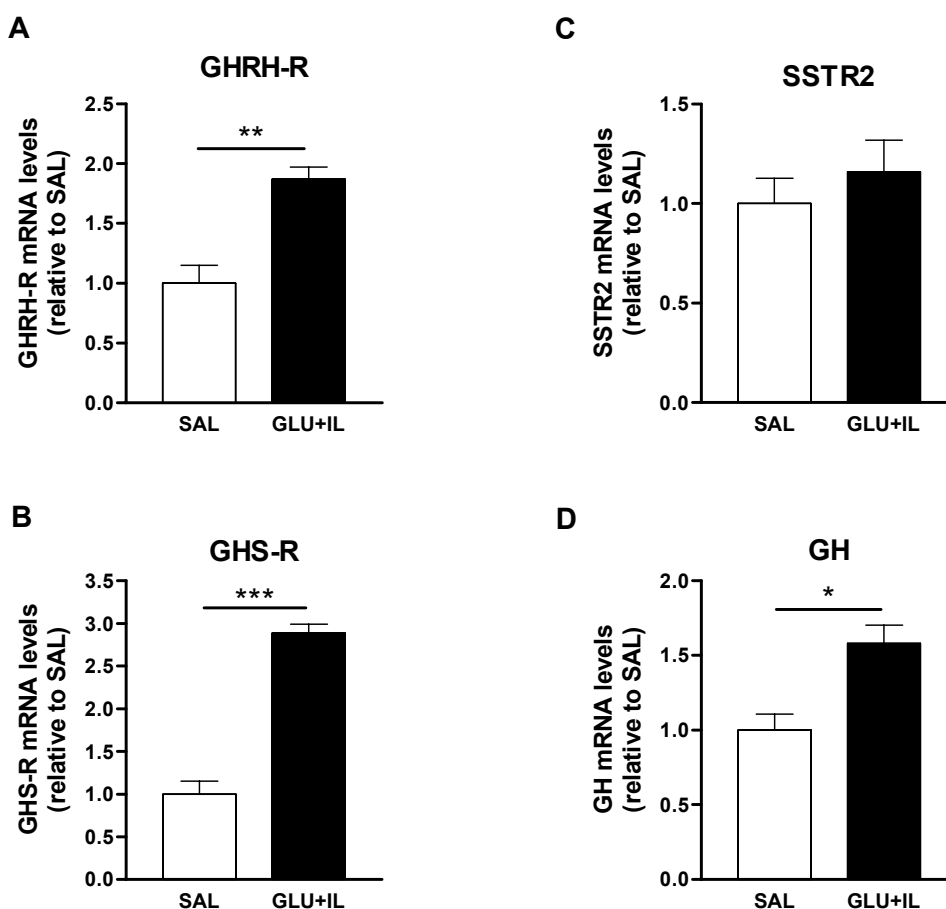
<sup>d</sup>  $P < 0,001$  when compared to IL group

<sup>e</sup>  $P < 0,05$  when compared to GLU group

<sup>f</sup>  $P < 0,01$  when compared to IL group

<sup>g</sup>  $P < 0,001$  when compared to GLU group

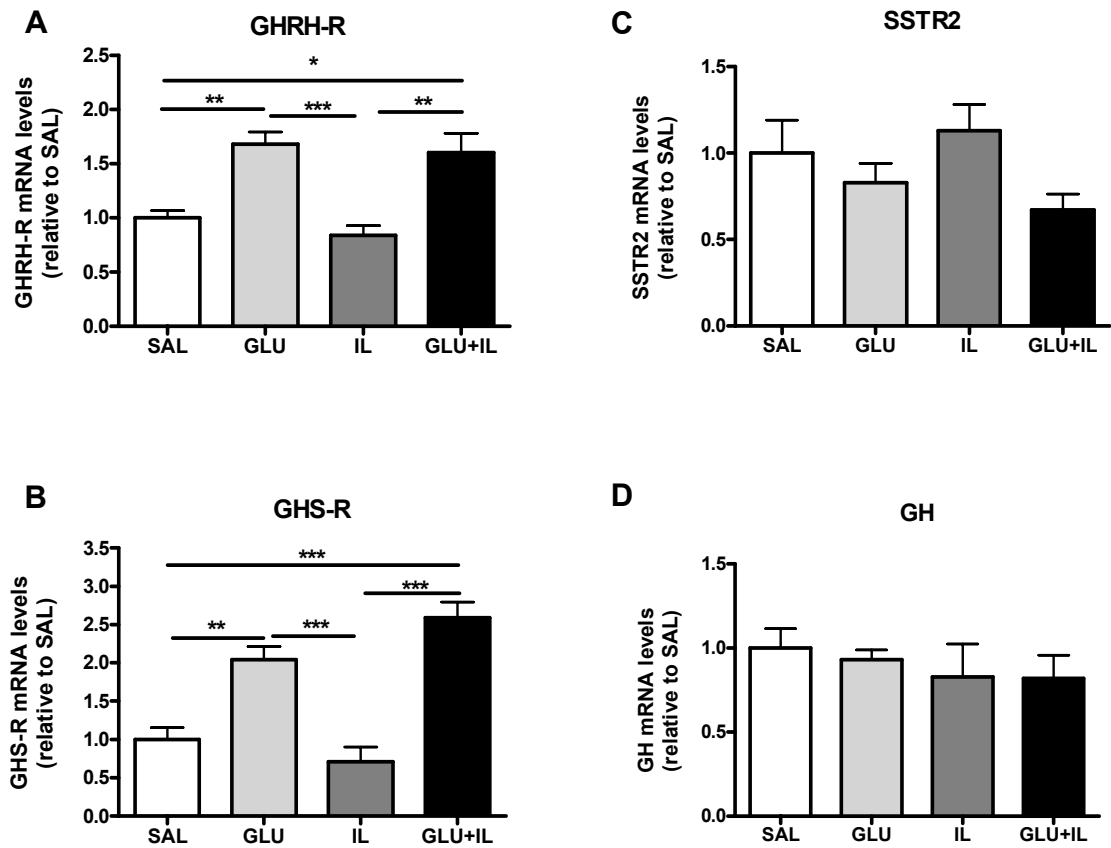
FIGURE 1



**Fig. 1** Anterior pituitary mRNA levels of genes related to the somatotroph function in 2-month-old infused rats.

GHRH-R (A), GHS-R (B), SSTR2 (C) and GH (D) mRNA levels in 2 month-old rats infused with GLU+IL or SAL. Quantification was performed by real-time PCR and mRNA levels were normalized with those of GAPDH. mRNA levels of rats infused with GLU+IL are expressed as relative density compared to SAL controls. The results represent the mean of 3-5 rats/group from 1 or 2 experiments performed in duplicate. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

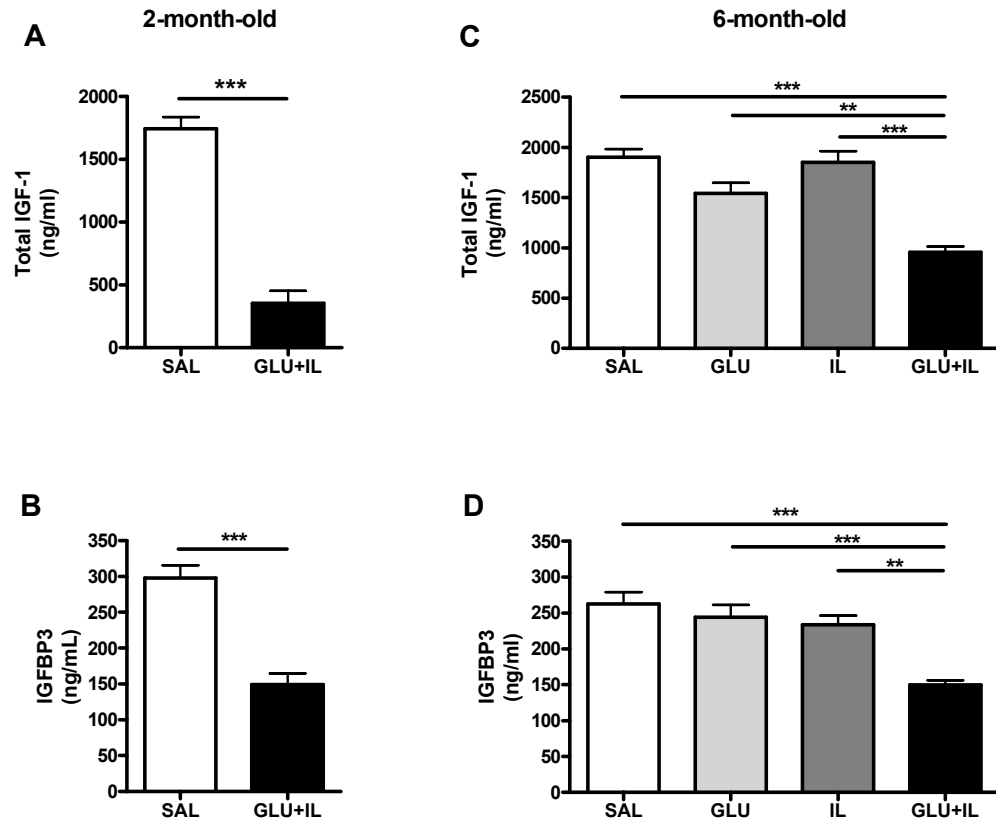
FIGURE 2



**Fig. 2** Anterior pituitary mRNA levels of genes expression related to the somatotroph function in 6-month-old infused rats.

GHRH-R (A), GHS-R (B), SSTR2 (C) and GH (D) mRNA levels in 6-month-old rats infused with GLU, IL, GLU+IL or SAL. Quantification and normalization were performed as described in Fig. 1. The results represent the mean of 4-6 rats/group from 1 or 2 experiments performed in duplicate. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

FIGURE 3

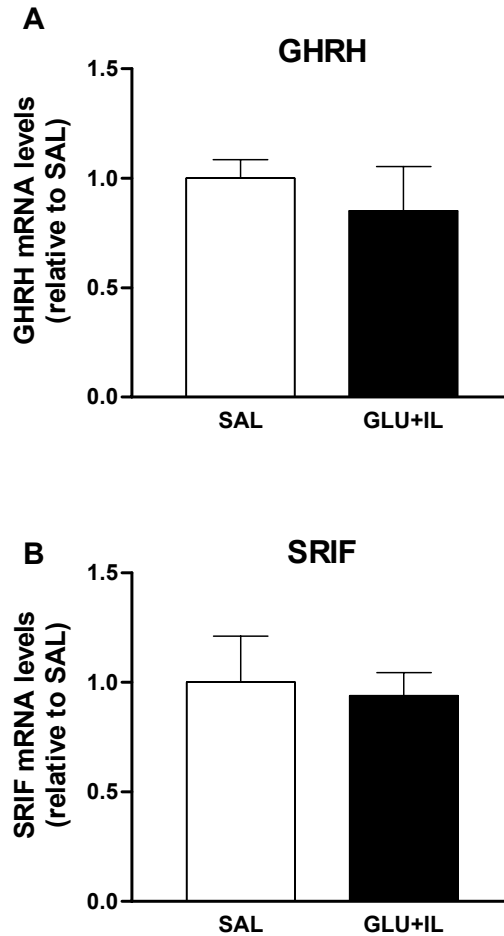


**Fig. 3** Plasma IGF-1 and IGFBP 3 levels of 2- and 6-month-old infused rats.

Plasma IGF-1 and IGFBP3 levels in 2- (A, B) and 6-month-old infused rats (C, D). The results represent mean levels (ng/mL) of IGF-1 in 4-5 rats and of IGFBP3 in 6 rats/group, from 1 experiment performed in duplicate. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

## SUPPLEMENTARY FIGURE

FIGURE S1



**Fig. S1** Hypothalamic mRNA levels of *GHRH* and *SRIF* genes in 2-month-old infused rats.

GHRH (A) and SRIF (B) mRNA levels of 2-month-old rats infused with GLU+IL or SAL, and quantified by real-time PCR using GAPDH as reference gene. The results are expressed as relative density compared to SAL controls and are the mean of 3-4 rats/group from 1 experiment performed in duplicate.

### **3.4 RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES NON-PUBLIÉS**

**Effets à long terme d'une diète enrichie en antioxydants sur l'axe somatotrope chez le rat vieillissant.**



## Résumé

Dans les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure de rat, le vieillissement est caractérisé par des modifications de niveaux de transcrits d'ARNm du GHRH-R et une diminution importante d'affinité de liaison du GHRH, menant à une diminution de la synthèse et sécrétion de GH. Chez le rat âgé, une augmentation significative de la glycémie suggère que l'hyperglycémie, conduisant à une glucotoxicité cellulaire et une augmentation des niveaux de stress oxydant, puisse constituer l'un des mécanismes permettant d'expliquer les altérations du GHRH-R au cours du vieillissement. Ainsi, l'implantation d'une diète riche en antioxydants en bas âge devrait constituer une stratégie de protection efficace. Afin de vérifier cette hypothèse, des rats de 2 mois ont été soumis à l'une des trois diètes suivantes : témoin, enrichie en antioxydants (vitamine C, vitamine E et S-adenosyl-méthionine), enrichie de 5% en sucrose dans l'eau de consommation, jusqu'à l'âge de 18 mois et comparés à des rats de 2 mois nourris avec la diète témoin. Aucun effet de la diète enrichie en antioxydants n'a pu être mis en évidence sur les niveaux d'ARNm de la GH et du GHRH-R hypophysaire dans les conditions testées. Toutefois, une augmentation significative des niveaux d'ARNm de REG3B, un gène impliqué dans la réponse inflammatoire et au stress cellulaire, a été observé avec le vieillissement mais prévenue par une diète enrichie en antioxydants. Les résultats de la présente étude ne permettent pas de conclure définitivement sur le bénéfice d'interventions nutritionnelles antioxydantes pour prévenir, retarder ou minimiser la somatopause. Par contre, les effets du vieillissement et d'une diète riche en antioxydants sur la régulation de l'expression du gène Reg3b suggèrent que REG3B joue un rôle dans la réponse à certains types de stress oxydant dans la somatotrope.

## **Introduction**

Au cours du vieillissement, des modifications de niveaux d'ARNm du récepteur du GHRH (GHRH-R) se produisent dans les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure. Elles sont associées à une diminution importante d'affinité de liaison du GHRH et de la concentration de GHRH-R fonctionnels (Girard et al., 1999; Gaudreau et al., 1999). Les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à ces changements au niveau de l'axe somatotrope demeurent encore largement inconnus. La production de stress oxydant est considérée comme un facteur important contribuant aux altérations observées au cours du vieillissement. Une augmentation des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou de dommages causés les ERO a été mise en évidence dans le foie, le cœur et le muscle *gastrocnemius* de rats âgés (Lopez et Torres, 2002; Drew et al., 2003). De plus, une étude récente de régulation génique dans l'hypophyse antérieure de rats a montré un effet du vieillissement sur l'expression de gènes codant pour des enzymes impliqués dans le contrôle du stress oxydant, suggérant une augmentation de ROS dans ce tissu (Manuscrit 3.2). Une augmentation des niveaux de stress oxydant a également été décrite dans des situations d'hyperglycémie chronique chez le rat, tel que dans le cas du diabète de type 1 (Hermans et al., 2007) et 2 (Bitar et al., 2005). De plus, nos études antérieures, portant sur les effets *in vitro* d'un stress hyperglycémiant dans les cellules d'hypophysés antérieures de rats jeunes, ont mis en évidence une glucotoxicité se manifestant par une augmentation significative de lipoperoxydation et d'altérations du GHRH-R, en fonction de la concentration et de la durée d'exposition au D-glucose (Bédard et al., 2008).

Si l'augmentation de la production de stress oxydant, découlant ou non d'une glucotoxicité, constitue un des mécanismes responsables de la dysfonction somatotrope au cours du vieillissement, l'implantation d'une diète riche en antioxydants en bas âge devrait constituer une stratégie de protection efficace. Une colonie, composée de rats âgés de 2 et 18 mois nourris à satiété avec une diète standard et de rats de 18 mois soumis à une diète enrichie en sucrose (5%) dans l'eau de consommation (stress glucotoxique) ou en antioxydants dans la nourriture sèche (vitamine C, vitamine E et S-adénosyl-méthionine) ou à la combinaison des deux diètes, a été étudiée pour vérifier cette hypothèse (Collaboration : D<sup>r</sup> WW Lutt, Université du Manitoba, Winnipeg, CA). L'impact du vieillissement et des diètes a été évalué sur la régulation des niveaux hypophysaires d'ARNm de la GH et du GHRH-R. Le niveau d'expression du gène de REG3B (protéine impliquée dans la réponse inflammatoire et au stress aigu) a également été mesuré puisque qu'il s'agit du gène le plus fortement augmenté dans l'hypophyse antérieure de rat âgé (Manuscrit 3.2) et que sa fonction hypophysaire est inconnue.

## **Matériel et méthodes**

### *Animaux*

Le modèle de rats utilisé dans cette étude était celui décrit récemment par Ming et al. (2009). Des rats Sprague Dawley mâles de 7 semaines (Charles River, St-Constant, QC, Canada) ont été nourris à une diète standard (diète témoin) contenant principalement 22.5% protéines, 5.4 % de matières grasses, 0.1 % glucose, 2.5 % minéraux et 75 UI/kg de vitamine E (3.2 kcal/g de nourriture; Prolab RMH300, PMI Feeds, St-Louis, USA) et avaient libre accès à l'eau. Les rats ont été hébergés dans un environnement contrôlé (température de  $22 \pm 1$  °C, cycles de 12 h de lumière/obscurité) en groupe de deux par cage.

À 9 semaines, ils ont été affectés à l'un des quatre régime alimentaire suivant et nourris *ad libitum* jusqu'à leur décès : 1) diète témoin (DT), 2) diète témoin et eau de consommation contenant 5% de sucrose (DS), 3) diète enrichie en antioxydants (S-adenosyl-méthionine, 5 g/kg poids corporel (PC); vitamine C, 12.5 g/kg PC; vitamine E, 1.5 g/kg PC) (DA) et 4) diètes DS et DA combinées (DSA). Des études préliminaires avaient démontré que les rats boivent en moyenne 40 ml d'eau par jour, mais peuvent boire plus de 100 ml si l'eau est additionnée de sucrose. Ainsi pour éliminer toute conséquence homéostatique néfaste, un volume maximal de 50 ml d'eau additionné de sucrose, soit un maximum de 2.5 g, était offert par jour aux animaux des groupes DS et DSA (Ming et al, 2009). Les besoins additionnels en ingestion de liquide étaient comblés avec de l'eau sans sucrose. Les rats consommaient en moyenne 20 g de nourriture sèche par jour, correspondant à un apport journalier moyen de 19 mg/kg PC de S-adenosyl-méthionine; 250 mg/kg PC de vitamine C et 30 mg/kg PC de vitamine E, pour les rats des groupes DA et DSA. Tous les rats ont été sacrifiés à l'âge de 18 mois, suite a un jeûne de 8 h avec des rats témoins jeunes (9-11 semaines) nourris avec la diète témoin (2DT). Une glycémie a été mesurée dans le sang, 2 semaines avant le sacrifice à l'aide d'un glucomètre, suite a un jeûne de 24 h.

*Quantification des niveaux hypophysaires d'ARNm de la GH, du GHRH-R et de REG3B par RT-PCR en temps réel*

Les hypophyses antérieures de 6 rats par groupe ont été utilisées pour la quantification des niveaux d'ARNm de la GH, du GHRH-R et de REG3B. L'extraction d'ARN a été effectuée à l'aide du TRIzol (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) (Bédard et al., 2008). La quantification de l'ARN total ainsi que sa pureté ( $RIN \geq 8.2$ ) ont été évaluées en utilisant le Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Mississauga, ON, CA). La transcription inverse

de 2 µg d'ARN total a été effectuée en utilisant la trousse Superscript II RT et les oligos (dt)<sub>12-18</sub> (Invitrogen). La quantification des ARNm a été effectuée sur Rotor-Gene 3000 à l'aide de la trousse Quantitech SYBR Green PCR (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Des amorces spécifiques au gène de la GH (sens : 5'-TCTCAGACTCCCTGGCTCCT-3'; antisens : 5'-GTAGGCACGCTCGAACTCTT-3'; NM\_001034848), du GHRH-R (sens: 5'-CTGCTGTCTTCCAG GGTGAT-3'; antisens: 5'-TAGGAGATGTGGAGGCCAAC-3'; NM\_012850); et de la REG3B (sens : 5'-TCCTGCCTGATGCTCTTATC-3' ; antisens : 5'-GCCAGTTCTGCA TCAAACCA-3'; S77413) ont été utilisées. La spécificité des amorces a été évaluée par migration sur gel d'agarose et par l'analyse des courbes de fusion. Pour chaque expérience, une courbe standard à 5 points (1/5 à 1/3125), effectuée à partir d'ARN total d'hypophyse antérieure de rats témoins de 2 mois, a été ajoutée. Les résultats ont été quantifiés en utilisant le GAPDH comme gène de référence (sens: 5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3'; antisens : 5'-ACTGTGGTCATGAGCCCTTC-3'; NM\_017008). Chaque échantillon a été analysé en duplicata et le CV intra-essai était ≤ 2.5%. Les résultats ont été analysés selon la méthode décrite par Pfaffl (2008) et ont été exprimés en niveaux relatifs d'ARNm en fonction de ceux des rats jeunes témoins (100%).

Pour le gène de la GH, deux expériences individuelles ont été réalisées alors que pour le GHRH-R et la REG3B, les résultats provenaient d'une seule expérience.

### *Analyses statistiques*

Les PC, glycémies à jeun et niveaux relatifs d'ARNm par rapport au groupe témoin 2DT (100%) sont exprimés en moyenne ± SEM. La significativité des différences a été analysée par ANOVA à deux voies suivie d'un test de Tukey.

## Résultats

### *Caractéristiques des rats*

Chez les rats de 18 mois, aucun changement significatif du poids corporel n'a été observé suite aux interventions nutritionnelles (Tableau 1). Suite à un jeûne de 24 h, la glycémie des groupes de rats âgés 18DT ( $P < 0.001$ ), 18DS ( $P < 0.001$ ) et 18DSA ( $P < 0.05$ ) est demeurée 1.3-1.6 fois plus élevée que celle des rats témoins de 2 mois (Tableau 1). Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée entre la glycémie des rats jeunes et celle des rats âgés 18DA. Finalement, la glycémie des rats 18DSA était 1.2 fois plus faible que celle des rats 18DS ( $P < 0.05$ ). Comme aucun effet additionnel du sucrose n'a été observé sur la glycémie des rats de 18 mois, les groupes de rats âgés 18DS et 18DSA n'ont pas été inclus dans les analyses subséquentes.

### *Quantification des niveaux d'ARN de GH, GHRH-R et REG3B hypophysaire*

Les niveaux d'ARNm de la GH étaient 3.8- 4.3 fois plus faibles chez les rats de 18 mois DT et DA que chez les rats de 2 mois DT ( $P < 0.001$ ) (Fig. 1A). Toutefois, ils n'étaient pas différents entre les groupes de rats de 18 mois. Aucun changement des niveaux d'ARNm du GHRH-R n'a été mis en évidence en fonction de l'âge ou d'une diète enrichie en antioxydants (Fig. 1B).

Les niveaux d'ARNm de REG3B étaient augmentés de 1.7 - 3.5 fois chez les rats de 18 mois DA et DT (Fig. 1C) en comparaison des rats jeunes ( $P < 0.001$ ). Les niveaux d'ARNm de REG3B n'étaient pas statistiquement différents entre les groupes 18DA et 2DT.

## Discussion

Une augmentation significative de la glycémie a déjà été rapportée chez des rats âgés après un jeûne de 6 h (Manuscrit 3.1). Dans la présente étude, la consommation de 5 % de sucrose dans l'eau à partir de l'âge de 9 sem n'a pas affecté la glycémie à jeun des rats âgés (18DT comparé à 18DS et 18DSA). Il est important de préciser que les niveaux de glucose sanguin ont été mesurés suite à un jeûne de 24 h, ce qui tend à normaliser la glycémie chez les rats âgés (Manuscrit 3.1). L'ingestion d'une diète enrichie en antioxydants a exercé un effet bénéfique sur la glycémie des rats 18DA, qui présentent une glycémie similaire à celle des rats de 2 mois, et des rats 18DSA dont la glycémie est significativement plus faible que celle des rats 18DS. Il est opportun de se questionner sur la quantité optimale de sucrose qui doit être ingérée pour obtenir une hyperglycémie chronique menant à une glucotoxicité. Des concentrations de 30% de sucrose sont utilisées dans l'eau de consommation pour provoquer une résistance à l'insuline à court terme (2-9 semaines) chez le rat jeune (Ribeiro et al., 2005). Des concentrations de 10% de glucose dans l'eau ont également été utilisées sur une période de 20 sem pour mener à une résistance à l'insuline et une hyperglycémie chez le rat jeune (El Midaoui et al., 2008).

Comme la diète enrichie en sucrose n'a pas eu d'effet significatif sur la glycémie des rats âgés (18DT comparé à 18DS), seuls les groupes 2DT, 18DT et 18DA ont été considérés pour les analyses de niveaux d'ARNm. Les niveaux hypophysaires d'ARNm de la GH étaient diminués dans ces deux groupes. Ces résultats sont en accord avec les études publiées (Kappeler et al., 2003; San Frutos et al., 2007). Par ailleurs, la stratégie antioxydante utilisée chez les rats du groupe DA indique que la combinaison d'antioxydants utilisés ou leurs concentrations n'étaient pas optimales pour permettre le maintien des

niveaux d'ARNm de la GH au cours du vieillissement et conséquemment la synthèse de GH. Une quantification de la production de ROS ou de dommages liés aux ERO (peroxydation des lipides, carbonylation des protéines) dans l'hypophyse antérieure des rats âgés DT et DA sera nécessaire afin de conclure sur l'efficacité de cette diète riche en antioxydants.

Quelques études ont été effectuées afin d'évaluer les effets d'interventions antioxydantes à long terme chez le rat vieillissant. Un traitement avec une dose élevée de vitamine E (2 g/kg PC), initié au sevrage et poursuivi jusqu'à l'âge de 24 mois, a montré une augmentation significative de la durée de vie médiane (50%) mais non de la durée de vie maximale (Porta et al., 1980). Une supplémentation de 4-6 mois en N-acétyl-cystéine (500 mg/kg PC), acide  $\alpha$ -lipoïque (30mg/kg PC) et de vitamine E (15 mg/kg PC) a pu prévenir en grande partie les diminutions d'activité superoxyde dismutase et catalase dans le cerveau de rats de 22-24 mois ainsi que l'accumulation de lipides peroxydés et de protéines carbonylées (Bagh et al., 2011). L'ingestion d'une diète enrichie en vitamine E (1 g/kg nourriture) durant 8 mois a également fait diminuer les niveaux de ROS dans le cervelet et le striatum de rat de 15 mois (Joseph et al., 1998). Ainsi, plusieurs combinaisons et doses d'antioxydants ont été utilisées et leurs effets sont variables en fonction de la durée du traitement et des tissus étudiés. Aucune étude similaire n'a été effectuée dans l'hypophyse antérieure de rat au cours du vieillissement, il est donc difficile de proposer une seule dose ou combinaison d'antioxydants à tester. Des études *in vitro* dans des cellules d'hypophyse antérieure de rats de différents groupes d'âge soumises à un stress oxydant (*e.g.* glucotoxicité) pourraient permettre d'identifier les composés antioxydants les plus efficaces dans un tel contexte physiopathologique.



Aucun changement significatif des niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire n'a été observé avec l'âge ou une diète enrichie en antioxydants. Il faut toutefois préciser que la quantification de l'ARNm du GHRH-R par RT-PCR en temps réel, bien que sensible, ne permet pas de distinguer les changements de niveaux des 2 transcrits d'ARNm du GHRH-R (2.5 et 4 kb). Ainsi, une détection par immunobuvardage de type Northern ou des analyses fonctionnelles telles que des études de liaison ou de production de seconds messagers (AMPc) devront être effectués avant de conclure sur l'absence d'effets d'une diète enrichie en antioxydants sur le GHRH-R hypophysaire.

Par ailleurs, la présente étude confirme, dans une nouvelle colonie de rats Sprague Dawley âgés, l'augmentation importante des niveaux d'ARNm de REG3B observée chez des rats de 20 mois dans le cadre de l'étude de transcriptomique rapportée dans le Manuscrit 3.2. Surprenamment, chez les rats du groupe 18DA, les niveaux d'ARNm de REG3B n'étaient pas significativement différents de ceux des rats jeunes, suggérant un effet protecteur de la diète riche en antioxydants. REG3B fait partie de la famille des gènes régénérateurs codant pour des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire et au stress cellulaire telles que la *pancreatic stone protein* (PSP) et la *pancreatic associated protein* (PAP) (Zhang et al., 2003). L'augmentation de REG3B observée au cours du vieillissement (condition présentant une augmentation de stress oxydant (Lopez et Torres, 2002; Drew et al., 2003) et un statut inflammatoire chronique (Goto, 2008) et la diminution de son expression suite à un régime alimentaire riche en antioxydants appuient un rôle de REG3B dans la réponse au stress oxydant. Comme la localisation de REG3B dans l'hypophyse antérieure est restreinte aux somatotropes (Yamamoto et al., 1992), un rôle en lien avec la fonction somatotrope peut-être proposé. Dans le cadre d'une étude préliminaire,

des cellules hypophysaires de rats de 2 mois ont été stimulée 1, 4 et 24 h avec la protéine REG3B recombinante de souris (5 et 50 nM) qui possède un degré d'homologie de 90% avec la protéine de rat (non disponible commercialement). Aucun effet n'a été observé sur la régulation des niveaux d'ARNm de la GH et du GHRH-R, suggérant que les conditions expérimentales évaluées n'étaient pas optimales ou que REG3B n'exerce aucun contrôle sur la régulation de l'expression de ces gènes. Des études devront donc être poursuivies afin de déterminer le mécanisme d'action de REG3B dans la somatotrope vieillissante.

En résumé, les résultats de la présente étude ne permettent pas de conclure définitivement sur le bénéfice d'interventions nutritionnelles antioxydantes pour prévenir, retarder ou minimiser la somatopause. Cette hypothèse de recherche devra être poursuivie en utilisant des méthodes expérimentales complémentaires à celle utilisée dans la présente étude, incluant des analyses fonctionnelles. Par contre, les effets du vieillissement et d'une diète riche en antioxydants sur la régulation de l'expression du gène *Reg3b* suggèrent que REG3B joue un rôle dans la réponse à certains types de stress oxydants dans la somatotrope.

**Références bibliographiques**

- Bagh** MB, Thakurta IG, Biswas M, Behera P, Chakrabarti S. Age-related oxidative decline of mitochondrial functions in rat brain is prevented by long term oral antioxidant supplementation. *Biogerontology*. 2011; 12(2): 119-31.
- Bédard** K, Strecko J, Thériault K, Bédard J, Veyrat-Durebex C, Gaudreau P. Effects of a high-glucose environment on the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor: type 1 diabetes compared with in vitro glucotoxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 294(4): E740-51.
- Bédard** K, Robinette K, Ferland G, Gaudreau P. Effects of long-term dietary interventions on pituitary growth hormone-releasing hormone receptor in aging rats and potential mechanisms of action. *Mech Ageing Dev*. 2010; 131(3): 169-78.
- Bitar** MS, Al-Saleh E, Al-Mulla F. Oxidative stress--mediated alterations in glucose dynamics in a genetic animal model of type II diabetes. *Life Sci*. 2005; 77(20): 2552-73
- Dias** JP, Talbot S, Sénécal J, Carayon P, Couture R. Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One*. 2010; 5(9):e12622
- Drew** B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, Barja G, Leeuwenburgh C. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 284(2): R474-80.

- El Midaoui A**, Ismael MA, Lu H, Fantus IG, de Champlain J, Couture R. Comparative effects of N-acetyl-L-cysteine and ramipril on arterial hypertension, insulin resistance, and oxidative stress in chronically glucose-fed rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2008; 86(11): 752-60.
- Frutos MG**, Cacicedo L, Méndez CF, Vicent D, González M, Sánchez-Franco F. Pituitary alterations involved in the decline of growth hormone gene expression in the pituitary of aging rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007; 62(6): 585-97.
- Gaudreau, P**, Boulanger L, Morel G. Axe somatotrope et vieillissement: importance du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance. *Medicine Science.* 1999; 15: VII-IX.
- Girard N**, Boulanger L, Denis S, Gaudreau P. Differential in vivo regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor by GHRH in young and aged rats. *Endocrinology* 1999; 140(6): 2836-42.
- Goto M**. Inflammaging (inflammation + aging): A driving force for human aging based on an evolutionarily antagonistic pleiotropy theory? *Biosci Trends.* 2008; 2(6): 218-30.
- Hermans N**, Cos P, De Meyer GR, Maes L, Pieters L, Vanden Berghe D, Vlietinck AJ, De Bruyne T. Study of potential systemic oxidative stress animal models for the evaluation of antioxidant activity: status of lipid peroxidation and fat-soluble antioxidants. *J Pharm Pharmacol.* 2007; 59(1): 131-6.

- Joseph** JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Prior RL, Cao G, Martin A, Tagliabene G, Bickford PC. Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci.* 1998; 18(19): 8047-55.
- Kappeler** L, Gourdj D, Zizzari P, Bluet-Pajot MT, Epelbaum J. Age-associated changes in hypothalamic and pituitary neuroendocrine gene expression in the rat. *J Neuroendocrinol.* 2003; 15(6): 592-601.
- López-Torres** M, Gredilla R, Sanz A, Barja G. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(9): 882-9.
- Ming** Z, Legare DJ, Lutt WW. Obesity, syndrome X, and diabetes: the role of HISS-dependent insulin resistance altered by sucrose, an antioxidant cocktail, and age. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009; 87(10): 873-82.
- Porta** EA, Joun NS, Nitta RT. Effects of the type of dietary fat at two levels of vitamin E in Wistar male rats during development and aging. I. Life span, serum biochemical parameters and pathological changes. *Mech Ageing Dev.* 1980; 13(1): 1-39.
- Ribeiro** RT, Lutt WW, Legare DJ, Macedo MP. Insulin resistance induced by sucrose feeding in rats is due to an impairment of the hepatic parasympathetic nerves. *Diabetologia.* 2005; 48(5): 976-83.

**Yamamoto** T, Katsumata N, Tachibana K, Friesen HG, Nagy JI. Distribution of a novel peptide in the anterior pituitary, gastric pyloric gland, and pancreatic islets of rat. *J Histochem Cytochem.* 1992; 40(2): 221-9

**Zhang** YW, Ding LS, Lai MD. Reg gene family and human diseases. *World J Gastroenterol.* 2003; 9(12): 2635-41.

**Tableau 1: Poids corporel et glycémie des rats : effet de l'âge et d'une diète enrichie en sucrose ou en antioxydants**

Groupes	2 mois	18 mois			
	DT	DT	DA	DS	DSA
Poids corporel (g)	394 ± 5	945 ± 26 <sup>a</sup>	896 ± 29 <sup>a</sup>	890 ± 31 <sup>a</sup>	868 ± 27 <sup>b</sup>
Glycémie à jeûn (mM)	4,1 ± 0,1	5,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,3 <sup>c</sup>	6,7 ± 0,2 <sup>a,d</sup>	5,4 ± 0,3 <sup>a</sup>

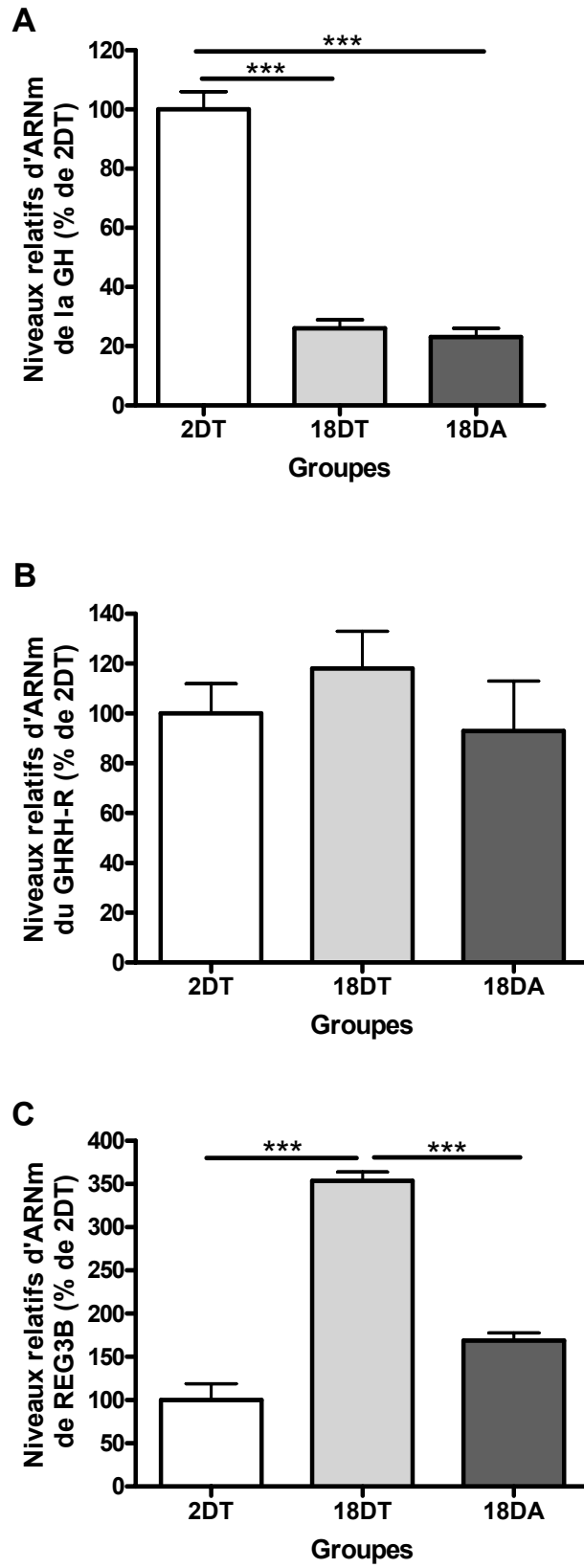
<sup>a</sup> P < 0.001 en comparant au groupe 2DT

<sup>b</sup> P < 0.05 en comparant au groupe 2DT

<sup>c</sup> P < 0.01 en comparant au groupe 18DS

<sup>d</sup> P < 0.05 en comparant au groupe 18DSA

FIGURE 1





**Fig. 1.** *Effets du vieillissement et d'une diète enrichie en antioxydant sur les niveaux hypophysaires d'ARNm de GH, GHRH-R et REG3B*

Niveaux relatifs d'ARNm de la GH (A), du GHRH-R (B) et de REG3B (C) dans l'hypophyse antérieure de rats de 2 et 18 mois nourris avec la diète témoin (DT) et de 18 mois nourris avec une diète enrichie en antioxydants (DA). La quantification a été effectuée par RT-PCR en temps réel et les niveaux ont été normalisés avec ceux de GAPDH. Les résultats représentent la moyenne de 6 rats/groupe et proviennent d'une expérience réalisée en duplicata. Les résultats sont exprimés en valeurs relatives d'expression en utilisant le groupe 2DT comme témoin (100%). \*\*\*  $P < 0.001$ .

## **4. DISCUSSION**

Chez les mammifères incluant l'homme, la fonction somatotrope est perturbée au cours du vieillissement (Atribat et al., 1991; D'Costa et al., 1993; Girard et al., 1999). Compte tenu de la contribution importante de cet axe neuroendocrinien au bon fonctionnement de l'organisme, l'identification de stratégies afin de retarder ou de prévenir sa dysfonction au cours du vieillissement et de favoriser un vieillissement en santé, est importante. À ce jour, la restriction calorique modérée de longue durée (RCMLD) demeure l'intervention nutritionnelle la plus efficace afin de contrer les détériorations ou maladies reliées au vieillissement (Fontana et al., 2010). Des études ont montré que la RCMLD exerce un rôle bénéfique dans le maintien de la fonction somatotrope au cours du vieillissement, entre autres par la prévention des altérations des sites de liaison du GHRH-R hypophysaire (Atribat et al., 1991; Girard et al., 1998) et de la sécrétion de GH (Sonntag et al., 1980). Toutefois, la RCMLD demeure une intervention difficile à appliquer chez l'homme dans une perspective de longue durée (Heilbronn et al., 2006). Il s'avère donc important d'identifier les effets de la RCMLD chez le rat âgé et d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents impliqués dans ces effets bénéfiques sur la fonction somatotrope. Ces connaissances pourraient permettre, à moyen terme, d'élaborer des interventions nutritionnelles ou pharmacologiques ciblant les mêmes voies que la RCMLD avec une efficacité similaire ou supérieure.

Les objectifs principaux de cette thèse étaient d'identifier les effets du vieillissement ainsi que les bénéfices de la RCMLD sur la fonction somatotrope et d'identifier des mécanismes potentiels sous-jacents à ces effets, en utilisant comme modèle animal le rat mâle vieillissant, nourri à satiété en comparaison à celui soumis à une RCMLD. Dans une première étude, l'accent a été mis sur le GHRH-R hypophysaire et sa fonctionnalité ainsi que sur l'identification de facteurs métaboliques ou hormonaux circulants pouvant contribuer à sa dysfonction (Manuscrit 3.1). Parmi les facteurs métaboliques potentiellement impliqués dans les effets délétères du vieillissement sur la fonction somatotrope, l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie, source de gluco- et lipotoxicité, ont été proposés. Une étude de régulation génique a, par la suite, permis d'identifier des gènes et familles de gènes pouvant être impliqués dans les mécanismes conduisant à la somatopause et ceux menant aux effets bénéfiques de la RCMLD sur l'axe hypothalamo-hypophysaire somatotrope (Manuscrit 3.2). De plus, comme il a été mis en évidence que le glucose puisse provoquer

une toxicité au niveau du GHRH-R hypophysaire *in vitro* (Bédard et al., 2008), il s'avérait important d'en étudier les effets sur les composantes de la fonction somatotrope dans un contexte *in vivo*, reproduisant des conditions similaires à celles pouvant être retrouvées chez le rat âgé ou diabétique (Manuscrit 3.3). Finalement, comme la glucotoxicité est accompagnée d'une augmentation significative du niveau de stress oxydant dans les cellules d'hypophyse antérieure de rats jeunes (Bédard et al., 2008), il était possible d'émettre l'hypothèse que dans l'hypophyse de rats âgés, le stress oxydant puisse contribuer aux altérations de la fonction somatotrope. Dans le but de vérifier celle-ci, les bénéfices à long terme d'une stratégie nutritionnelle de protection par une combinaison d'antioxydants ont été étudiés (Résultats supplémentaires 3.4).

#### **4.1. EFFETS DE LA RCMLD SUR LE GHRH-R HYPOPHYSAIRE ET LA FONCTION SOMATOTROPE DE RAT AU COURS DU VIEILLISSEMENT.**

Chez le rat, la régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire est affectée au cours du vieillissement. Les résultats obtenus par buvardage de type Northern (Manuscrit 3.1) ont permis de mettre en évidence que les transcrits d'ARNm du GHRH-R (2.5 et 4 kb) sont régulés différemment en fonction de l'âge. À l'âge de 12 mois, les deux transcrits sont significativement augmentés, résultant en une augmentation du ratio de 4/2.5 kb. Chez les rats de 18 mois, seul le transcrit de 4 kb demeure élevé conduisant à une forte augmentation du ratio 4/2.5 kb. Ces changements de niveau d'expression du GHRH-R sont associés à des altérations des paramètres de liaison du GHRH ainsi qu'une diminution importante de la production d'AMPC stimulée par le GHRH. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment observés chez les rats de 18 mois où la diminution du transcrit de 2.5 kb et l'augmentation du ratio 4/2.5 kb coïncidait avec la perte des sites de liaison à haute affinité du GHRH-R (Girard et al., 1999). La structure du transcrit de 4 kb du GHRH-R étant encore inconnue, il s'avère difficile d'établir une relation causale précise entre son augmentation et la perte de fonctionnalité du GHRH-R chez les rats âgés.

La RCMLD exerce des effets bénéfiques sur la régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R chez les rats âgés en augmentant les niveaux du transcrit de 2.5 kb et en normalisant ceux du transcrit de 4 kb (Manuscrit 3.1). Une augmentation significative des niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire a également été mise en évidence dans la

colonie de rats âgés soumis à la RCMLD, utilisée dans l'étude de régulation génique (Manuscrit 3.2) supportant les présents résultats ainsi que ceux provenant d'études précédentes (Girard et al., 1998; Shimokawa et al., 2000). Dans cette étude, aucune régulation d'autres GPCR impliqués dans la fonction somatotrope, tel que les récepteurs de la SRIF (Sstr) ou de la ghréline (GHS-R), n'a été observée suite à la RC, suggérant que les effets de cette intervention ne sont pas généralisés à tous les GPCRs de la cellule somatotrope. Une restriction protéique de 40% à long-terme ou une RCMLD sans restriction protéique n'ont eu aucun effet sur le gène du GHRH-R, indiquant que les effets de la RCMLD sur la somatotrope sont attribuables à une réduction globale d'apports énergétiques.

Cette étude a permis également de mettre en évidence que les effets transcriptionnels observés sont accompagnés d'effets fonctionnels. Ainsi, la RCMLD permet le maintien des paramètres de liaison du GHRH, supportant les résultats rapportés précédemment par Girard et al., (1998). La RCMLD permet également le maintien de la sensibilité des somatotropes au GHRH tel qu'observé avec les résultats de production d'AMPc et de synthèse/réparation d'ADN stimulées par le GHRH. Mentionnons toutefois que l'effet bénéfique sur la production d'AMPc est observé avec des concentrations élevées de GHRH. Comme l'essai de production d'AMPc sur homogénats d'hypophyses antérieures possède une sensibilité modérée, il pourrait sous-estimer l'effet de la RCMLD sur cette voie de signalisation. La perte de sensibilité au GHRH pourrait également affecter les autres voies de signalisation impliquées dans les réponses au GHRH telles que les voies PLC et MAPK responsables de la sécrétion de GH et de la prolifération cellulaire, respectivement, dans les cellules somatotropes.

Les mécanismes par lesquels la RCMLD peut efficacement protéger le GHRH-R du vieillissement *via* le maintien d'un ratio optimal des transcrits d'ARNm et des paramètres de liaison ne sont pas connus. Ainsi, le deuxième objectif de cette étude était d'identifier les facteurs hormonaux et métaboliques pouvant contribuer aux effets de la RCMLD observés sur l'axe somatotrope. Certains de ces facteurs sont connus pour exercer des effets directs sur la régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R. Les glucocorticoïdes, le glucose et les AGL sont principaux facteurs mis en évidence dans cette étude, puisque leurs concentrations

sont régulées par le vieillissement et la RCMLD dans un sens qui permettrait d'expliquer les changements de niveaux d'ARNm du GHRH-R observés.

Il a été rapporté que l'administration de glucocorticoïdes chez le rat jeune augmente les niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire (Lam et al., 1996 ; Miller et Mayo, 1997). De plus, un site de liaison pour le récepteur nucléaire des glucocorticoïdes a été identifié sur le gène du GHRH-R chez le rat (Miller et al., 1999), suggérant un effet direct des glucocorticoïdes sur la transcription du GHRH-R. Dans la présente étude, les niveaux de corticostérone sont augmentés significativement chez les rats âgés soumis à la RCMLD, suggérant que la corticostérone puisse participer aux effets bénéfiques de la RCMLD sur l'ARNm du GHRH-R. Chez les rats en RCMLD, l'augmentation des niveaux de corticostérone est en accord avec la théorie de l'hormèse, qui propose que la présence de stress chronique de faible intensité puisse mener à l'activation des systèmes de protection et de réparation cellulaire et être bénéfique pour la cellule alors qu'un niveau élevé de stress puisse être délétère (Masoro, 2007).

Des études antérieures ont montré que l'exposition des cellules hypophysaires de rats jeunes à des concentrations élevées de glucose affectait les niveaux d'ARNm du GHRH-R (Bédard et al., 2008). De plus, une diminution de l'affinité de liaison du GHRH a été rapportée dans les cellules hypophysaires de rats mises en présence de concentrations supra-physiologiques d'acide caprylique (Renier et al., 1990). L'augmentation des niveaux circulants de glucose et d'AGL observée chez les rats âgés pourrait donc contribuer aux effets délétères du vieillissement sur l'axe somatotrope. La contribution d'une gluco- ou lipotoxicité ainsi que leur prévention par la RCMLD seront discutés en détail dans la section suivante (4.2).

L'insuline a également été examinée comme hormone candidate pouvant être impliquée dans les effets de la RCMLD. Les niveaux d'insuline sont augmentés chez les rats âgés mais non chez les rats soumis à la RCMLD. Des études antérieures sur des cellules hypophysaires de souris ou de primates ont rapporté une régulation négative des niveaux d'ARNm du GHRH-R en présence d'insuline (0.5-50 nM), comparativement à une condition sans insuline qui ne représente pas un environnement physiologique (Luque and

Kineman, 2006; Luque et al., 2006). Toutefois, aucun effet n'a été observé sur les niveaux d'ARNm du GHRH-R et de la GH dans des cellules hypophysaires de rat mises en présence d'insuline à des concentrations similaires à celles retrouvées chez les rats jeunes, âgés nourris AL ou soumis à la RCMLD (Bédard et al., 2008). En appui à cette observation, notons également que chez les rats diabétiques traités à la STZ, qui présentent un statut hypo-insulinémique, on observe des altérations du GHRH-R similaires à celles retrouvées chez les rats âgés, écartant ainsi une implication de l'insuline dans cette régulation.

Cette étude est la première à rapporter des effets bénéfiques d'une RCMLD sur la régulation des niveaux de transcrits (2.5 et 4 kb) d'ARNm du GHRH-R au cours du vieillissement chez le rat. À la lumière de ces résultats, il pourrait être suggéré que l'augmentation du transcrit de 2.5 kb par la RCMLD se traduise en une production accrue de GHRH-R fonctionnels, qui se reflète par un maintien des paramètres de liaison et de la sensibilité de la somatotrope au GHRH (production d'AMPc maximale et capacité de synthèse/réparation d'ADN). Parmi les facteurs métaboliques et hormonaux étudiés, les glucocorticoïdes, le glucose et les AGL représentent des candidats intéressants à évaluer afin de mieux décrire les mécanismes de la RC envers le GHRH-R.

#### **4.2. CONTRIBUTION DE LA GLUCO- ET LIPOTOXICITÉ AUX PROCESSUS DU VIEILLISSEMENT DE L'AXE SOMATOTROPE ET PRÉVENTION PAR LA RCMLD.**

Au niveau cellulaire, une augmentation chronique des concentrations de glucose et d'AGL génère une toxicité qui se manifeste, entre autres, *via* la production de ROS menant à des conséquences délétères sur la structure et la fonctionnalité des cellules de différents tissus de l'organisme (Poitout et al., 2010; Poitout et Robertson, 2008). Il est important de préciser que dans le cadre de cette thèse le terme « toxicité » n'implique pas nécessairement la mort cellulaire. Nous avons observé précédemment que des concentrations élevées de glucose ne provoquent pas d'apoptose ni de nécrose des cellules d'hypophyse antérieures de rats en culture primaire (Bédard et al., 2008). Les termes gluco- et lipotoxicité sont utilisés pour décrire les altérations du GHRH-R et de réponse au GHRH découlant d'une exposition à des concentrations élevées de ces molécules.

Tel que mentionné à la section précédente, une augmentation significative des taux de glucose sérique (12.4 vs 6.7 mM) et d'AGL (0.52 vs 0.26 mM) est observée chez de 18 mois AL en comparaison aux rats de 2 mois AL (Manuscrit 3.1). Ainsi une gluco- ou lipotoxicité modérée, de longue durée, pourrait se développer au cours du vieillissement et contribuer aux effets délétères observés sur le GHRH-R hypophysaire, affectant la sensibilité des somatotropes au GHRH. Une étude antérieure effectuée sur des cellules d'hypophyse antérieure de rat, a mise en évidence une dérégulation des niveaux d'ARNm en fonction de la durée de la sévérité de la glucotoxicité. Des altérations de la production d'AMPC stimulée par le GHRH et du processus d'internalisation du GHRH-R ont également été observés dans ces conditions (Bédard et al., 2008).

Suite aux résultats observés dans cette étude *in vitro*, l'identification de l'impact d'une gluco- ou lipotoxicité *in vivo* sur l'axe somatotrope s'avérait importante. Des rats de 2 et 6 mois, infusés iv avec de la saline (SAL), du glucose (GLU) ou des Intralipides (IL) durant 72 h, ont permis de mimer *in vivo* les environnements gluco- et lipotoxiques similaires à ceux retrouvés chez les rats âgés ou diabétiques (Manuscrit 3.3). Une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH-R ainsi que du GHS-R a été observée chez les rats de 2 et 6 mois infusés avec GLU et GLU+IL de 2 et 6 mois. Les effets observés sur l'expression de ces deux GPCR sont causés essentiellement par la glucotoxicité, puisqu'aucun effet additionnel n'a été observé chez les rats GLU+IL par rapport aux rats GLU. Chez les rats âgés, aucune régulation du GHS-R n'est observé (Manuscrit 3.2), ce qui suggère que l'augmentation de GHS-R soit un mécanisme adaptatif présent seulement chez le rat jeune. Chez les rats de 2 mois infusés GLU+IL, une augmentation des niveaux d'ARNm de la GH est également observée, Cette augmentation de GH n'est pas présente chez les rats de 6 mois et le contenu hypophysaire en GH hypophysaire demeure inchangé. Il pourrait être suggéré que ces augmentations soient le résultat de mécanismes compensatoires à court terme, afin de maintenir les niveaux de GH circulante. Ces mécanismes semblent efficaces chez les rats de 2 mois mais non chez ceux de 6 mois, suggérant qu'avec l'âge la capacité de contrer efficacement les effets de la glucotoxicité diminuent. Ce phénomène pourrait être attribuable à l'accumulation des dommages



cellulaires ou au dysfonctionnement des systèmes de maintenance et de réparation cellulaire (Rattan, 2006).

Chez les rats de 2 mois infusés GLU+IL, l'augmentation des niveaux d'expression de ces récepteurs ne semble pas être déclenchée par des facteurs hypothalamiques régulateurs tels que le GHRH ou la SRIF, puisque leurs niveaux d'ARNm ne sont pas modifiés. Des observations provenant d'une étude de micro-puces à ADN dans l'hypothalamus médiobasal des rats de 6 mois infusés GLU+IL ont suggéré une faible diminution des niveaux d'ARNm du GHRH, par rapport aux rats témoins du même âge. La possibilité que des changements de niveaux d'expression du GHRH interviennent, en partie, dans la régulation du GHRH-R chez des rats plus âgés ne peut donc pas être écartée définitivement. L'augmentation de l'expression des gènes GHRH-R et GHS-R est possiblement causée par des facteurs circulants (*e.g.* métaboliques, hormonaux, inflammatoires) puisque ces résultats sont différents de ceux observés dans les cultures primaires de cellules d'hypophyse antérieure de rat exposées 72 h à 12 ou 33 mM de D-glucose (Bédard et al., 2008). Une augmentation des niveaux de corticostérone a été observée chez les rats de 2 mois infusés GLU+IL par rapport aux témoins et pourrait expliquer, du moins en partie, l'augmentation des niveaux de GHRH-R. Par contre, aucune modification significative de corticostérone n'a été rapportée chez les rats de 6 mois pour tous les groupes infusés, suggérant que d'autres facteurs modulent la régulation des récepteurs hypophysaires chez ces rats.

Fait intéressant, seule la combinaison de gluco- et lipotoxicité provoque une diminution des niveaux circulants d'IGF-1 et d'IGFBP3 (Manuscrit 3.3) chez les rats de 2 et 6 mois. Ces diminutions ne concordent pas avec l'augmentation des niveaux hypophysaires d'ARNm du GHRH-R retrouvée chez les rats de 2 et 6 mois GLU+IL ainsi que de l'augmentation d'expression de GH chez les rats de 2 mois. Cette discordance suggère une déconnection dans la régulation de l'axe somatotrope entre la portion hypothalamo-hypophysaire et le foie, en situation de gluco-lipotoxicité et pourrait refléter une résistance à l'action de la GH au niveau hépatique chez les rats de 2 mois. Les niveaux d'ARNm de GH-R, d'IGF-1 et d'IGFBP3 devront être quantifiés dans le foie de ces rats afin de préciser si ces effets sont réceptoriels ou post-réceptoriels. Une étude précédente chez les rats STZ

avait mis en évidence une diminution des niveaux circulants d'IGF-1 suivant l'administration de corticostérone (50 mg/kg PC) (Unterman et al., 1993). Dans la présente étude, l'augmentation des niveaux de corticostérone chez les rats GLU+IL de 2 mois pourrait constituer un facteur à considérer dans la diminution des niveaux d'IGF-1. Par contre, cette association ne peut être considérée pour les rats de 6 mois, suggérant que d'autres facteurs soient impliqués dans cette régulation. La contribution de l'apport protéique dans la régulation des niveaux d'IGF-1 et d'IGFBP3 doit également être prise en compte. Chez les rats jeunes, une privation complète de protéines dans la diète entraîne une diminution importante des niveaux d'IGF-1 et d'IGFBPs circulants (Takahashi et al., 1990 ; Thissen et al., 1990). Le modèle de rats infusés comporte des limites, leur consommation de nourriture étant significativement diminuée lorsqu'ils sont infusés GLU et IL, comparés aux SAL. Ainsi, chez ces rats, bien qu'aucune déficience en apport énergétique ne soit observée, l'apport de nourriture est diminué de 80-90 %, ce qui pourrait contribuer à la diminution des niveaux d'IGF-1 et d'IGFBP3. Néanmoins, il ne s'agit probablement pas du seul facteur impliqué puisque cet apport protéique réduit est également observé chez les rats de 6 mois infusés GLU, condition dans laquelle aucune différence des niveaux d'IGF-1 et d'IGFBP3 n'a été notée. Une étude chez la souris mutée pour la métalloprotéase *Zmpste24*, un modèle de progéria, a révélé une dérégulation de la balance GH/IGF-1, caractérisée par des niveaux hépatiques d'ARNm et circulants d'IGF-1 diminués et une augmentation de la GH circulante (Marino et al., 2010). Chez cette souris, une augmentation de l'expression d'un microARN, miR-1, ciblant entre autres l'IGF-1, a été retrouvée dans plusieurs tissus. Une quantification des niveaux d'expression de ce microARN serait intéressante à effectuer afin de vérifier si ce facteur participe à la dérégulation que nous observons dans notre modèle.

Ce modèle *in vivo* de glucotoxicité pourrait constituer un modèle d'intérêt pour étudier les changements qui surviennent au début du vieillissement. Les concentrations de glucose sérique retrouvées chez le rat infusé GLU sont similaires à celles observées chez le rat âgé de 12 et 18-20 mois. Toutefois, les rats infusés étant des rats jeunes (2 et 6 mois), ils ont vraisemblablement une meilleure capacité à combattre la glucotoxicité, tel qu'observé dans les expériences de synthèse/réparation d'ADN stimulé par le GHRH (Manuscrit 3.1). L'accumulation des dommages oxydatifs ainsi que le dysfonctionnement de certains

mécanismes protecteurs et réparateurs (Martinez-Vincente et al., 2008) ou une diminution de l'activité d'enzymes antioxydantes (Bonfont-Rousselot et al., 2000) au cours du vieillissement, qui pourraient intervenir dans le déclenchement de la somatopause, sont difficilement reproductibles dans ce modèle chez le rat jeune.

Se basant sur la dynamique temporelle de régulation de l'ARNm du GHRH-R observée chez les rats âgés où une augmentation des niveaux du transcrit de 2.5 kb du GHRH-R est d'abord observée à 12 mois, suivie d'une diminution à 18 mois (Manuscrit 3.1), il pourrait être suggéré qu'une période plus longue de glucotoxicité *in vivo*, puisse mimer les diminutions observées plus tardivement chez le rat âgé. Des expériences d'infusion prolongées *in vivo* seraient toutefois difficiles à réaliser, compte tenu de la lourdeur du traitement pour les rats. Alternativement, l'utilisation de rats un peu plus âgés (e.g 8-12 mois) pourrait être envisagée afin de poursuivre l'étude de ce modèle de « vieillissement accéléré ».

Chez les rats âgés soumis à la RCMLD, les niveaux de glucose et d'AGL sont significativement plus bas que ceux des rats âgés AL (Manuscrit 3.1). Ainsi la RCMLD prévient le développement d'une gluco- ou lipotoxicité chez les rats âgés, ce qui pourrait expliquer, en partie, les effets bénéfiques au niveau du GHRH-R et de la fonction somatotrope. De plus, ces rats semblent avoir une plus grande résistance face à la glucotoxicité. Dans les cellules d'hypophyse antérieure stimulées par le GHRH et exposées à 12 mM D-GLU, la synthèse ou la réparation d'ADN évaluée par l'incorporation du BrdU, est augmentée seulement chez les rats de 2 mois et de 18 mois soumis à la RCMLD et non chez les 18 mois AL (Bédard et al., 2008). Des études complémentaires avec des marqueurs plus spécifiques à la prolifération tel que le Ki-67, une protéine nucléaire associée au contrôle du cycle cellulaire, utilisée en combinaison avec un marquage pour la GH, permettrait de préciser si ces résultats sont également associés à une augmentation de la prolifération des somatotropes. Ces résultats suggèrent que la RCMLD améliore l'état des cellules et leur permet de mieux contrecarrer ou de répondre à un stress glucotoxique.

Les mécanismes par lesquels la gluco- ou lipotoxicité exercent leurs effets délétères sont encore inconnus et doivent être investigués. Une des hypothèses proposée est une

production accrue de stress oxydant générée par la gluco- ou lipotoxicité qui serait responsable des altérations du GHRH-R et de d'autres composantes de l'axe somatotrope. En appui à cette hypothèse, l'étude *in vitro* sur les cellules d'hypophyse antérieure de rats de 2 mois avaient montré une augmentation significative de la LPO en fonction de la durée d'exposition et de la concentration de glucose utilisée (Bédard et al., 2008), indiquant une production accrue de stress oxydant en situation de glucotoxicité. Le rôle du stress oxydant dans les effets du vieillissement sur la cellule somatotrope et sa protection par la RCMLD est abordé dans la section suivante.

L'ensemble des résultats obtenus dans les différents modèles étudiés suggèrent qu'en présence de concentrations circulantes élevées de glucose, une glucotoxicité affecte la cellule somatotrope. De plus, le modèle de rats infusés GLU ou IL a permis d'évaluer les effets de la gluco- et lipotoxicité dans des conditions similaires à celles retrouvées chez le rat âgé ou diabétique et de dissocier leurs effets. Ainsi, la glucotoxicité semble jouer un rôle plus important au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire somatotrope *via* la régulation des niveaux d'ARNm de GHRH-R hypophysaire. La glucotoxicité pourrait donc représenter un des mécanismes permettant d'expliquer les effets délétères observés au cours du vieillissement, sur la fonction somatotrope. Comme la RCMLD prévient l'apparition de cette glucotoxicité, le maintien de la fonction somatotrope dans cette condition, pourrait en découler.

#### **4.3. RÔLE DU STRESS OXYDANT DANS LES EFFETS DU VIEILLISSEMENT SUR LA CELLULE SOMATOTROPE ET PROTECTION PAR LA RCMLD.**

L'accumulation de ROS et des dommages cellulaires et moléculaires qu'ils causent sont considérés comme étant des éléments importants du processus du vieillissement (Finkel et Holdbrook et al., 2000). Plusieurs études ont rapporté les bénéfices de la RCMLD sur la diminution des niveaux de ROS (Hagopian et al., 2005), de l'oxydation des protéines, de la LPO (Lambert et al., 2004) ainsi que les dommages à l'ADN (Lopez-Torres et al., 2002) causés par le vieillissement. De plus, une étude réalisée chez des rats Fischer 344 a mis en évidence que la RCMLD atténuait les effets du vieillissement en augmentant les niveaux

d'ARNm de la SOD-Cu/Zn, de la CAT et de la GPX dans le foie, ainsi que leur activité (Rao et al., 1990; Merry, 2000).

Au niveau de l'hypophyse antérieure de rat âgé, les résultats de l'étude de régulation génique ont révélé une augmentation des niveaux d'ARNm de gènes codant pour des enzymes antioxydantes associées au système glutathion (Gpx2, Gpx4 et Glxr) (manuscrit 3.2). Ces résultats suggèrent la présence de stress oxydant dans l'hypophyse antérieure au cours du vieillissement et la mise en place de systèmes de protection afin de contrer ce stress. La fonction principale de la Gpx2 et Gpx4 étant l'élimination des lipoperoxydes et du peroxyde d'hydrogène par l'oxydation du glutathion (Mari et al., 2009), leur régulation à la hausse au cours du vieillissement pourrait s'expliquer par une augmentation de ces produits d'oxydation. Ces mécanismes protecteurs sont modifiés ou bonifiés avec la RCMLD par la diminution de l'expression de la Glxr ainsi que l'augmentation de la Gsta3. La Glxr est une protéine mitochondriale dépendante du glutathion, qui joue un rôle important dans la réduction des ponts disulfures et la déglutathionylation de certaines protéines (Holmgren, 2000). La Gsta3 est également impliquée dans la protection contre la LPO en éliminant les peroxydes et ses produits dérivés (Mari et al., 2009). Son augmentation d'expression supporte donc un rôle de la RCMLD dans le maintien des défenses antioxydantes. Les autres systèmes antioxydants ne semblent pas modifiés par la RCMLD suggérant que les effets bénéfiques pourraient être attribués à l'élimination de certains types de ROS ou de dommages oxydatifs. Il sera utile de quantifier le niveau de ROS et de dommages oxydatifs (*e.g.* LPO) chez les rats âgés nourris *ad libitum* et soumis à la RCMLD dans une prochaine colonie.

Tel que mentionné à la section précédente, la présence de glucotoxicité au cours du vieillissement pourrait être associée à une augmentation de la production de ROS. Une augmentation de LPO a été observée dans les cellules d'hypophyse antérieure de rat suite à une exposition de 1, 4, 24 et 48 h à une concentration de 33 mM de D-glucose, indiquant une génération rapide de ROS (Bédard et al., 2008). De plus, l'addition de 2.5 mM de Trolox, un analogue hydrosoluble de la vitamine E, à des cellules hypophysaires soumises à 33 mM GLU pour 24 h, protège complètement ces cellules de la LPO.

Comme l'hyperglycémie conduit à la glucotoxicité et à l'augmentation du niveau de stress oxydant et que ceux-ci pourraient jouer un rôle dans l'apparition des effets délétères observés sur la fonction somatotrope, l'implantation d'une diète enrichie en antioxydants chez le rat jeune, pourrait constituer une stratégie de protection efficace contre les effets néfastes du vieillissement. Des rats de 18 mois soumis à une diète enrichie en vitamine C, vitamine E et SAME, depuis l'âge de 2 mois, ont donc été comparés à des rats de 2 et 18 mois nourris avec une diète standard (Résultats supplémentaires 3.4). Chez les rats de 18 mois, la présence d'antioxydants n'a pas eu d'effet sur la diminution des niveaux d'ARNm de la GH provoquée par l'âge. De plus, aucun changement des niveaux d'ARNm du GHRH-R n'a été détecté chez ces rats. Toutefois une quantification des niveaux des 2 transcrits d'ARNm du GHRH-R (2.5 et 4 kb) devra être effectuée avant de conclure sur l'efficacité de ce type de diète sur la régulation de l'expression du GHRH-R hypophysaire. Pour le moment, ces résultats ne permettent pas de conclure sur les effets possibles d'une telle intervention nutritionnelle antioxydante sur l'axe somatotrope au cours du vieillissement. Des mesures des dommages oxydatifs (*e.g.* LPO, carbonylation des protéines) dans l'hypophyse antérieure de ces rats pourraient permettre de statuer sur l'efficacité de cette intervention dans ce tissu. Selon les résultats obtenus, le choix et les concentrations d'antioxydants devront être réévalués et ajustés, *in vitro* et *in vivo*, afin d'obtenir des conditions de protection antioxydantes optimales.

Les mécanismes par lesquels le stress oxydant peut affecter directement ou indirectement le GHRH-R sont inconnus. Il pourrait être proposé que des modifications oxydatives du GHRH-R par les ROS soient impliquées dans la perte de sensibilité des somatotropes au GHRH. Les ROS pourraient oxyder certains acides aminés du GHRH-R, comme les résidus Cys qui sont importantes pour le maintien de la structure et la liaison du ligand au GPCR (Laburthe et al., 1996). Ceci pourrait entraîner un changement conformationnel du récepteur ne permettant plus une liaison à haute affinité du GHRH. De plus, une LPO pourrait entraver le processus d'internalisation du GHRH-R ainsi que son efficacité de signalisation, en modifiant les propriétés de la membrane cytoplasmique. Une diminution de la capacité d'internalisation du Fluo-GHRH a été mise en évidence dans les cellules hypophysaires soumises à 33 mM de D-GLU durant 24 h, condition où une augmentation de la LPO avait été observée (Bédard et al., 2008) Dans les cellules primaires de tubules proximaux rénaux de rat, une exposition au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimule la PKC et la translocation

de la kinase 2 des GPCR (GRK2) à la membrane cellulaire, causant une hyperphosphorylation du récepteur à la dopamine D1 et l'inhibition du couplage aux protéines G (Asghar et al., 2006). Un mécanisme similaire pourrait être proposé pour le GHRH-R et offrirait une explication possible en regard de sa perte de fonctionnalité.

#### **4.4. EFFETS DU VIEILLISSEMENT ET DE LA RCMLD SUR LA RÉGULATION DES GÈNES DE L'HYPOPHYSE ANTÉRIEURE ET DE L'HYPOTHALAMUS.**

Les études précédentes ont mis en évidence des effets de la RCMLD sur le GHRH-R et la fonction somatotrope. Elles ont également permis d'identifier certains facteurs métaboliques et hormonaux qui pourraient être impliqués dans ces effets bénéfiques. Dans plusieurs tissus, la RCMLD est reconnue pour moduler l'expression de nombreux gènes. Ainsi, la RCMLD pourrait modifier l'expression de certains gènes qui seraient bénéfiques aux cellules somatotropes vieillissantes. Une étude de régulation génique utilisant des micropuces à ADN a donc été effectuée dans l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus afin d'identifier des gènes susceptibles de jouer un rôle important dans le maintien de la fonction somatotrope par la RCMLD, au cours du vieillissement (Manuscrit 3.2). L'impact d'une substitution de la caséine pour du soya, comme principale source protéique, a également été étudiée et exerce très peu d'effets significatifs similaires à ceux de la RCMLD. L'utilisation d'une diète à base de soya ou enrichie en isoflavones ne serait donc pas une stratégie alternative à envisager.

Dans l'hypothalamus, les gènes régulés par le vieillissement étaient principalement associés à l'apoptose. Parmi les gènes les plus augmentés, certains sont impliqués dans la réponse immunitaire et l'activité chaperonne. Toutefois, la RCMLD semble avoir peu d'impact dans la régulation des gènes de l'hypothalamus, où peu de gènes sont régulés, avec de faibles changements de niveaux d'expression. Par conséquent, nous avons privilégié l'étude des effets de la RCMLD sur la régulation des gènes des cellules hypophysaires. De plus, sachant que les effets du vieillissement et de la RCMLD ne sont vraisemblablement pas causés par la régulation d'un gène unique, nous avons concentré nos analyses à l'identification d'ensembles de gènes associés à des fonctions cellulaires communes.

Dans l'hypophyse antérieure, cette étude a principalement mis en évidence une régulation de gènes impliqués dans les systèmes de défense et de réparation des dommages cellulaires au cours du vieillissement et par la RCMLD. Il s'agit de la première étude portant sur les effets de ces deux conditions dans l'hypophyse antérieure qui met en évidence une régulation de plusieurs gènes associées à ces fonctions. Les études précédentes avaient rapportés très peu de gènes significativement régulés (Chen et al., 2004) ou étaient concentrés sur certains gènes impliqués dans les fonctions hormonales de ce tissu (Kappeler et al., 2003). Dans la présente étude, une grande proportion des gènes régulés par le vieillissement (185/773) sont associés ou directement impliqués dans la mort cellulaire. Certains de ces gènes ont des fonctions pro- et d'autres anti-apoptotiques, suggérant un équilibre dans le contrôle de l'élimination des cellules hypophysaires endommagées et dysfonctionnelles. Une augmentation des niveaux d'ARNm des gènes Xpa, Rpa1 et Pcn1 a été rapporté chez les rats âgés et est maintenue avec la RC. Ces gènes jouent un rôle dans la réparation par excision de nucléotides et en remplaçant le nucléotide endommagé (Schumacher et al., 2009). Chez les mammifères, incluant l'homme, l'absence des systèmes de réparation par excision de nucléotides causent des phénotypes de vieillissement accéléré ou des cancers (Schumacher et al., 2009), indiquant l'importance de ces mécanismes au cours du vieillissement. En plus des dommages oxydatifs à l'ADN, la présence de stress oxydant pourrait également endommager les protéines. Une augmentation des gènes codant pour les protéines de réponse au choc thermique (Hsp8 et 1) a été observée chez les rats âgés en comparaison des rats jeunes. Avec la RCMLD une augmentation des niveaux d'ARNm de Hsp70 et de son cofacteur, Dnajb1, sont observés. La protéine HSP70 est reconnue pour jouer plusieurs rôles importants en réponse au stress oxydant tels que la sélection des protéines endommagées, leur acheminement au protéasome ou vers les lysosomes pour la dégradation, le repliement des protéines lorsque possible ainsi que l'inhibition de l'apoptose et de l'inflammation (Kalmar et Greensmith, 2009). Des gènes codant pour des protéines à propriétés antioxydantes, dont l'importance a été discutée dans la section précédente, sont également modulés par le vieillissement et la RCMLD et viennent compléter le profil de protection cellulaire.



En plus des gènes discutés dans l'article, l'expression de quelques gènes associés à des médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNFSF12 (*tumor necrosis factor superfamily, member 12*), l'Ifi2712b (*interferon, alpha-inducible protein 27-like 2b*), Ifitm1 (*interferon induced transmembrane protein 1*) et l'Ifitm3 ainsi qu'à des chimiokines dont Ccl2 (*chemokine ligand 2*) est augmentée dans l'hypophyse antérieure avec le vieillissement. Ces résultats sont en accord avec la théorie de l'inflammation du vieillissement qui propose qu'un faible niveau d'inflammation chronique soit présent au cours du vieillissement et participe au développement de maladies associées à l'âge (Chung et al., 2006). La surexpression de ces gènes dans l'hypophyse antérieure peut suggérer l'organisation d'une réponse pro-inflammatoire dans ce tissu au cours du vieillissement. L'augmentation des systèmes de défenses cellulaires discutée dans la section précédente pourrait donc être bénéfique afin de contrer ce stress inflammatoire. Chez l'humain, une augmentation des niveaux circulants de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  et CRP, des biomarqueurs reconnus de l'inflammation, est observée au cours du vieillissement (Chung et al., 2009). Dans la présente étude, les niveaux circulants de TNF- $\alpha$  sont sous le seuil de détection chez les rats jeunes et âgés AL ou soumis à la RCMLD (résultats non-montrés). La quantification des autres interleukines mentionnées plus haut ou de la CRP devra être réalisée afin de valider la présence d'un statut inflammatoire chronique dans notre modèle animal au cours du vieillissement.

La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance est également décrite dans les cellules sénescents (Coppé et al., 2010). La sénescence cellulaire est définie par un arrêt de la prolifération irréversible des cellules suite à différents stress cellulaires. Plusieurs types de stress peuvent déclencher la sénescence cellulaire tels que le stress oxydant, le dommage à l'ADN, une dysfonction des télomères ou l'expression de certains oncogènes (Coppé et al., 2010). L'accumulation de cellules exprimant des marqueurs de sénescence a été associée au vieillissement et aux pathologies chroniques liées à l'âge telles que l'arthrite et l'athérosclérose (Campisi et al., 2007). Dans notre étude, une augmentation de l'expression des gènes codant pour les protéines pro-inflammatoires mentionnées plus haut, ainsi que pour l'IGFBP-3, l'IGFBP-7 et le VEGFa (*vascular endothelial growth factor A*) sont observés dans l'hypophyse antérieure de rats âgés. Cette régulation s'apparente à l'augmentation de la sécrétion de ces facteurs observée chez les

cellules sénescentes (Coppé et al., 2010), suggérant que certaines cellules hypophysaires pourrait être en processus de sénescence. Il a été proposé que ces facteurs sécrétés par les cellules sénescentes pourraient affecter les cellules avoisinantes et contribuer à la tumorigénèse en activant la prolifération cellulaire, la motilité ainsi que l'inhibition de la différenciation des cellules (Coppé et al., 2007). Bien que les augmentations des niveaux d'ARNm concordent à ceux des profils de sécrétion dans l'étude de Coppé et al. (2007), les niveaux de protéines de ces facteurs devront être quantifiés dans notre modèle afin de valider leur significativité.

La plupart des gènes qui sont régulés dans l'hypophyse antérieure par le vieillissement ne le sont pas dans l'hypothalamus, suggérant que ces effets sont spécifiques à ce tissu. Toutefois, une récente méta-analyse réalisée à partir d'études de régulation génique effectuées dans plusieurs tissus de souris, rats et humains âgés a mise en évidence des signatures moléculaires communes au vieillissement (De Magalhaes et al., 2009). Parmi les gènes communs, 15 d'entre eux sont également régulés dans notre étude dans l'un des deux tissus, suggérant que certains mécanismes du vieillissement soient conservés entre les tissus et les espèces. Dans certains cas, les signatures observées avec le vieillissement peuvent être interprétées comme des mécanismes impliqués dans les processus du vieillissement ou des réponses compensatoires à ces processus (De Magalhaes et al., 2009). Dans notre étude, les effets majeurs observés sont vraisemblablement des mécanismes compensatoires, qui tentent de protéger ou d'effectuer un sauvetage des cellules hypophysaires endommagées au cours du vieillissement.

En regard des effets de la RCMLD sur la fonction somatotrope, l'augmentation de l'expression de gènes associés à l'activité chaperonne ou antioxydante suggère une meilleure protection de la cellule somatotrope dans cette condition. De plus, la RCMLD maintien certains systèmes de protection et de réparation des dommages cellulaires mis en place au cours du vieillissement. Ces effets pourraient être bénéfiques pour la fonctionnalité de l'axe somatotrope. Tel que proposé précédemment, le GHRH-R pourrait subir des dommages oxydatifs affectant sa fonctionnalité au cours du vieillissement. Avec la RCMLD, une meilleure gestion du stress oxydant *via* une augmentation de l'efficacité des systèmes antioxydants mènerait à une diminution de la production de ROS et permettrait de

prévenir en partie, ces dommages oxydatifs au GHRH-R. De plus, l'augmentation des protéines chaperonnes, pourraient corriger plus efficacement les dommages, oxydatifs ou autres, causés au GHRH-R afin de permettre son repliement adéquat pour le recyclage ou encore favoriser l'élimination des GHRH-R dysfonctionnels. Ces mécanismes proposés pourraient aider à préserver un niveau adéquat de GHRH-R fonctionnels et ainsi expliquer le maintien des paramètres de liaison et de la réponse au GHRH observés chez les rats âgés soumis à la RCMLD (manuscrit 3.1).

La RCMLD est souvent définie comme une intervention qui bloque ou interfère avec les mécanismes du vieillissement. Les résultats de cette étude montrent qu'au niveau de l'hypophyse antérieure, la RCMLD non seulement exerce un effet protecteur sur la régulation de certains gènes modulés par le vieillissement (37 gènes), mais agit de façon plus importante sur de nouveaux gènes pour contrer les effets du vieillissement. Les mécanismes potentiels de la RCMLD mis en évidence dans l'hypophyse antérieure sont en accord avec des théories précédentes qui proposent qu'une atténuation des dommages oxydatifs soit un processus important impliqué dans les effets bénéfiques de la RCMLD sur les maladies liées à l'âge et la longévité (Masoro et al., 2009 ; Yu, 1996). Plusieurs gènes nommés «gènes de longévité» sont rapportés dans différents tissus et organismes en tant que gènes importants dans les effets de la RC sur la longévité. Il s'agit entre autres des gènes associés aux voies de la kinase de l'AMP (AMPK)-mTOR (*mammalian target of Rapamycin*), FOXO (*Forkhead Box O*), les sirtuines (Sir) ou la SOD (Shimokawa et al., 2008; Fontana et al., 2010) De façon intéressante, aucune régulation significative de ces gènes n'a été observée dans notre étude suggérant que les effets de la RCMLD sur cette glande neuroendocrinienne impliquent des voies différentes des autres cibles neuronales ou métaboliques étudiées à ce jour.

En plus des catégories de gènes mentionnés précédemment, deux gènes ont particulièrement attiré notre attention puisqu'ils présentent les plus importants changements d'expression observés dans la présente étude, Reg3B par le vieillissement et IGFBP3 par la RCMLD. Leur fonction dans l'hypophyse antérieure n'est pas connue mais un lien potentiel avec l'axe somatotrope pourrait être proposé en se basant sur leur localisation hypophysaire et leurs fonctions dans d'autres tissus.

#### **4.4.1. Reg3b, un nouveau gène impliqué dans le vieillissement de la somatotrope.**

Une augmentation importante des niveaux d'ARNm du gène Reg3b a été rapportée pour la première fois dans l'hypophyse antérieure des rats âgés (Manuscrit 3.2 et résultats supplémentaires 3.4). Toutefois son expression n'était pas modifiée par la RCMLD. Reg3b est membre de la famille des gènes régénérateurs (Reg), appartenant à la superfamille des lectines de type C dépendantes du calcium. Les protéines encodées par les gènes Reg sont retrouvées principalement dans le tractus gastro-intestinal ainsi que le pancréas et leur expression est augmentée de façon importante lors de pathologies inflammatoires telle que la pancréatite aigüe (Zhang et al., 2003). Le gène Reg3b ainsi que sa protéine, nommée « peptide 23 » dans l'hypophyse antérieure de rat, ont été identifiés exclusivement au niveau des cellules somatotropes (Katsumata et al., 1995; Yamamoto et al., 1992). Dans les cellules d'hypophyse antérieure de rat mises en culture, la sécrétion du « peptide 23 » est stimulée par le GHRH et inhibée par le SRIF (Yokoya et Friesen, 1986). La localisation et la régulation de Reg3b suggèrent un rôle dans la fonction somatotrope. Jusqu'à maintenant, seul un rôle dans la prolifération des cellules hypophysaires a été proposé pour le « peptide 23 » puisque son expression est augmentée dans les cellules de rats jeunes mises en culture (Katsumata et al., 1995). Néanmoins, cette fonction n'a pas été confirmée et le rôle de Reg3b dans l'hypophyse antérieure de rats vieillissants demeure à être identifié.

En se basant sur les travaux effectués sur le PAP-1, homologue du peptide 23, il pourrait être suggéré que Reg3b puisse agir sur certaines composantes de l'axe somatotrope au niveau transcriptionnel. Une étude récente a montré que PAP-1 régulait sa propre expression en agissant sur différentes voies MAPK, activant différents facteurs de transcription (CREB, C/EBP) dans les cellules pancréatiques (Ferrés-Maso et al., 2009). Une action similaire du peptide 23, via ces facteurs de transcription ou d'autres, pourrait être suggérée sur certains gènes de l'axe somatotrope. Dans le but de préciser le rôle de Reg3b sur les composants de l'axe somatotrope, des expériences préliminaires ont été effectuées sur des cellules d'hypophyse antérieure de rat de 2 mois exposées 1, 4 ou 24 h avec 5 ou 50 nM de protéine recombinante de REG3B de souris, homologue à 90 % avec le REG3B de rat. L'analyse des niveaux d'ARNm de la GH, du GHRH-R ou de la cycline D2, un

important régulateur du cycle cellulaire dans l'hypophyse antérieure de rat (Qian et al., 1998), n'a pas révélé de changements significatifs suivant les différentes expositions (résultats non-montrés). Les concentrations et la durée optimale d'exposition à la protéine recombinante de rat demeurent à être étudiées.

Une piste mécanistique intéressante a été mise en évidence dans l'étude chez les rats âgés soumis à une diète enrichie en antioxydants (résultats supplémentaires 3.4). Dans cette étude, une augmentation significative des niveaux d'ARNm de Reg3b est observée dans l'hypophyse antérieure de rats âgés de 18 mois comparativement aux rats de 2 mois, nourris avec une diète témoin, mais non chez les rats de 18 mois nourris avec une diète enrichie en antioxydants. Ce résultat suggère que l'expression de Reg3b pourrait être augmentée en présence de certains types de stress oxydant afin de jouer un rôle protecteur dans ces conditions. Cette hypothèse est en accord avec une étude effectuée sur une lignée de cellules pancréatiques cancéreuses de rat (AR4-2J) transfectées avec Reg3b/PAP-1, montrant un effet protecteur de celui-ci contre l'apoptose induite par le stress oxydant (Ortiz et al., 1998). Fait intéressant, chez les rats Wistar de 2 mois infusés 72 h avec GLU+IL et 6 mois infusés avec GLU, les niveaux d'ARNm de Reg3b montrent une tendance à l'augmentation dans un sous-groupe de rats (résultats non-montrés), suggérant que l'hypophyse de rats jeunes utilisent préférentiellement d'autres mécanismes de défenses cellulaires.

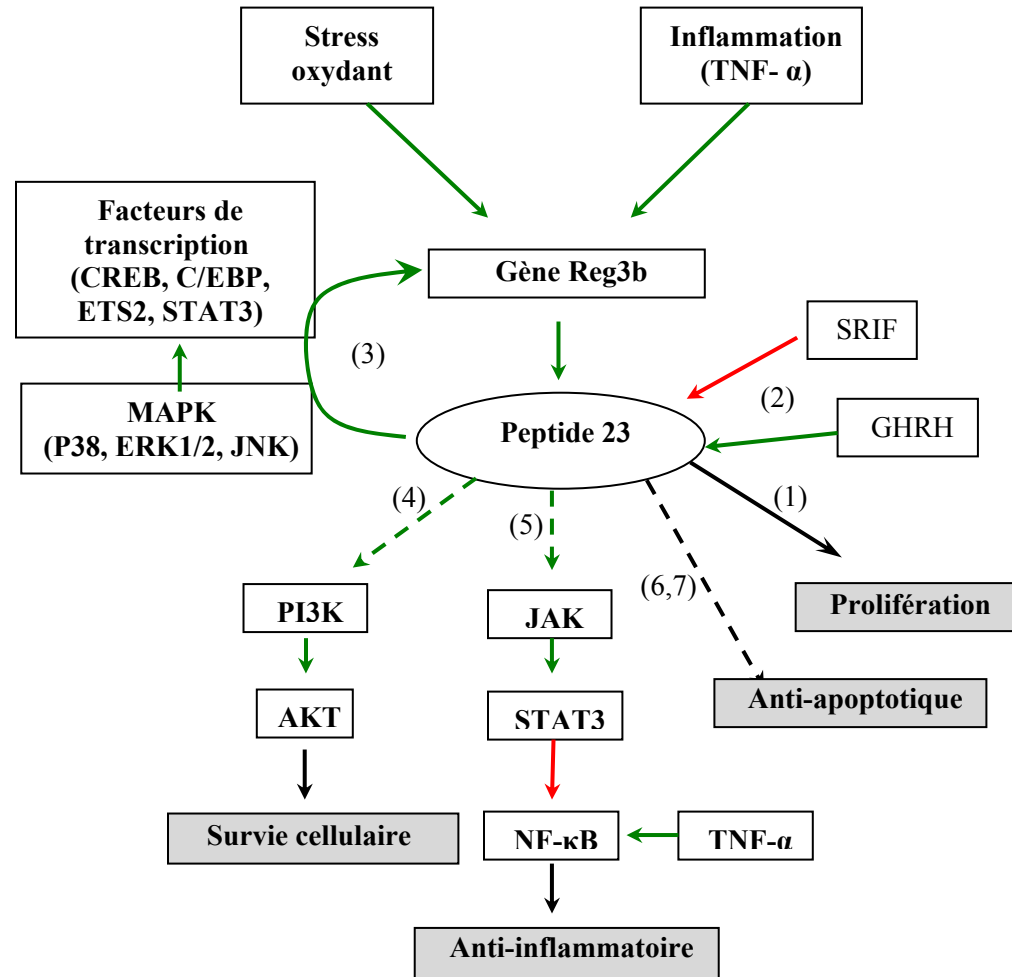
L'ADN du « peptide 23 » possède une identité de séquence complète avec les protéines associées à la pancréatite (PAP) encodées elles aussi par le gène Reg3b mais exprimées dans le système gastro-intestinal. La protéine PAP-1 a davantage été étudiée à cause de son importance dans les pancréatites aiguës et dans certains cancers (Ferrés-Maso et al., 2009). Plusieurs rôles ont été suggérés pour les PAP dans différents tissus et espèces dont certains pourraient être impliqués dans les effets Reg3b sur la cellule somatotrope au cours du vieillissement (Fig. 6). Une étude sur la lignée de cellules pancréatiques cancéreuses AR4-J2 en présence de PAP-1 a montré une inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B par TNF- $\alpha$  suggérant un rôle anti-inflammatoire pour PAP-1 *via* les voies de signalisation JAK/STAT3 (Folch-Puy et al., 2006). Une action anti-apoptotique de PAP-1 en présence de TNF- $\alpha$  a également été observée dans les cellules AR4-J2 (Malka et al., 2000). De plus, une étude dans des neurones moteurs de rat a révélé une augmentation de la survie cellulaire

associée à l'activation des voies PI3K et AKT en présence de PAP-1 (Nishimune et al., 2000). Finalement, il a récemment été mis en évidence dans les cellules AR4-J2 que PAP-1 régulaït sa propre expression en agissant sur différentes voies MAPK, activant des facteurs de transcription tels que CREB, C/EBP, ETS2 et Stat3 qui possèdent des sites de liaison sur le gène de Reg3b (Ferrés-Maso et al., 2009).

Ainsi, dans la cellule somatotrope vieillissante, l'augmentation des niveaux d'ARNm de Reg3b pourrait constituer une réponse à une augmentation de stress oxydant et exercer un rôle protecteur. Toutefois, il semble peu probable que l'augmentation de Reg3b soit due à une augmentation des niveaux circulants de TNF- $\alpha$  puisqu'ils demeurent sous le seuil de détection chez les rats jeunes et âgés AL ou soumis à la RCMLD (résultats non-montrés). Par contre, il n'est pas exclu qu'un statut inflammatoire chronique soit présent au cours du vieillissement, impliquant l'élévation d'interleukines ou de la protéine C-réactive, et puisse stimuler l'expression de Reg3b.

Un rôle anti-apoptotique ou dans la survie cellulaire au cours du vieillissement pourrait être proposé et serait en accord avec l'augmentation de l'expression des gènes associés à l'apoptose chez les rats âgés. Une inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B serait également bénéfique pour la cellule somatotrope et pourrait appuyer l'augmentation de l'expression du gène NF- $\kappa$ B observée au cours du vieillissement. Fait intéressant, l'expression du gène de Reg3b n'est pas modifiée par la RCMLD, suggérant que ses rôles doivent être maintenus même en situation de RCMLD chez les rats âgés. Il pourrait donc être suggéré que Reg3b soit impliqué dans la gestion du stress oxydant ou de dommages différents de ceux pris en charge par les mécanismes de la RC, expliquant l'absence de régulation de Reg3b chez les rats en RCMLD.

**FIGURE 6 : Résumé des mécanismes potentiels de régulation du gène Reg3b et des rôles possibles du Peptide 23 dans la somatotrope de rat**



**Légende :**

- Activation
- Inhibition
- - - - Rôle potentiel par comparaison avec PAP

- (1) Katsumata *et al.*, 1995.
- (2) Yokoya et Friesen, 1986.
- (3) Ferrés-Maso *et al.*, 2009.
- (4) Nishimune *et al.*, 2000.
- (5) Folch-Puy *et al.*, 2006.
- (6) Malka *et al.*, 2000.
- (7) Ortiz *et al.*, 1998

#### 4.4.2. IGFBP3, un gène d'intérêt dans les effets bénéfiques de la RCMLD.

L'expression du gène de l'IGFBP3 hypophysaire est fortement augmentée par le vieillissement et diminuée par la RCMLD et s'avère un candidat intéressant à évaluer pour l'identification des mécanismes associés aux effets bénéfiques de la RCMLD (Manuscrit 3.2). Dans l'hypothalamus, les niveaux d'expression d'IGFBP3 sont également augmentés significativement par le vieillissement, mais aucun effet significatif de la RCMLD n'est observé. Cette augmentation des niveaux d'ARNm ne concorde pas avec la diminution de l'IGFBP3 circulant chez les rats âgés, indiquant que l'IGFBP3 hypophysaire n'est pas une composante importante dans la régulation de sa fraction circulante. De plus, aucune différence des niveaux d'ARNm de l'IGF-1 n'a été observée dans ces deux tissus suggérant que l'IGFBP3 y exercerait un rôle indépendant de l'action de l'IGF-1. De nombreux rôles indépendants de l'IGF-1, ont été proposés pour l'IGFBP3 tels que des rôles dans l'apoptose, l'angiogénèse et le métabolisme (Yamada et Lee, 2009). Dans des fibroblastes de souris, la transfection du gène humain de l'IGFBP3 provoque une diminution significative de la prolifération cellulaire suggérant un rôle antiprolifératif pour IGFBP3 (Cohen et al., 1993). Une augmentation des niveaux protéiques et d'ARNm de l'IGFBP3, a également été observée *in vitro* dans les fibroblastes humains en sénescence (Goldstein et al., 1991). Une délétion du gène de l'IGFBP3 dans des cellules endothéliales ombilicales humaines mène à une diminution de plusieurs phénotypes associés à la sénescence (Kim et al., 2007). Ainsi la diminution des niveaux d'IGFBP3 avec la RCMLD pourrait être reliée à une diminution de l'apoptose et d'un phénotype de sénescence dans l'hypophyse antérieure. Une quantification des niveaux d'IGFBP3 dans l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus chez des rats âgés et en RCMLD devront être effectués pour confirmer la régulation d'IGFBP3 dans ces conditions avant de proposer un rôle pour cette protéine dans ces tissus.

Le mécanisme par lequel l'IGFBP-3 peut exercer des effets indépendants de l'IGF-1/IGFR dans l'hypophyse antérieure, ou dans d'autres tissus, n'est pas connu. Pour le moment, une seule étude a rapporté la présence d'un récepteur membranaire spécifique pour l'IGFBP3 dans une lignée de cellules humaines de cancer du sein mais celui-ci n'a pas encore été caractérisé (Yamanaka et al., 1999). La majorité des études mécanistiques portent sur les actions de l'IGFBP3 anti-prolifératives ou en lien avec l'apoptose. Une étude a



montré qu'IGFBP-3 stimulait la phosphorylation des protéines SMAD 1 et 2 *via* TGF- $\beta$  pour inhiber la prolifération des cellules d'une lignée humaine de cancer du sein (Fanayan et al., 2002). Une interaction avec la protéine STAT-1 a également été proposée comme impliquée dans l'action anti-proliférative de l'IGFBP3, dans une lignée de cellules chondrocytaires (Spagnoli et al., 2002). Dans des cellules de cancer du sein surexprimant l'IGFBP3, l'apoptose est associée à une augmentation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bad ainsi qu'une diminution des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (Butt et al., 2000). L'IGFBP-3 peut également transloquer au noyau en se liant à l'importine  $\beta$  (Schedlich et al., 2000) et agir au niveau de différents récepteurs nucléaires tel que le récepteur des rétinoïdes X type alpha pour provoquer l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques (Liu et al., 2005). Les possibilités de voies de signalisation semblent multiples et devront être étudiées dans notre type cellulaire d'intérêt avant de proposer un mécanisme précis.

Afin d'explorer la possibilité d'un rôle d'IGFBP3 sur les niveaux d'ARNm de certains composants de l'axe somatotrope, des expériences préliminaires sur des cellules d'hypophyse antérieure de rat de 2 mois exposées 24 h avec 100 nM d'IGFBP3 de souris (95% homologue à la protéine de rat) ont été effectuées. Aucun changement des niveaux d'ARNm de la GH et du GHRH-R hypophysaire n'a été observé (résultats non-montrés), indiquant qu'IGFBP3 ne régule pas l'expression de ces gènes dans les conditions utilisées. Des études supplémentaires impliquant différentes durées d'exposition et plusieurs concentrations d'IGFBP3 de rat devront être effectuées afin de confirmer ces résultats.

En résumé, cette étude a mis en évidence une régulation de gènes impliqués dans les mécanismes de protection et de réparation des dommages cellulaires au cours du vieillissement dans l'hypophyse antérieure. Des effets de la RCMLD dans le maintien et l'augmentation de ces défenses cellulaires dans l'hypophyse antérieure sont observés et pourraient être bénéfiques pour la somatotrope. Cette étude de régulation génique nous a fourni, jusqu'à maintenant, plusieurs cibles intéressantes et demeure une source d'information précieuse et complémentaire à d'autres études sur le vieillissement et la RCMLD, au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La quantification des niveaux de ces protéines d'intérêt ainsi que des études fonctionnelles pourront être effectuées afin de

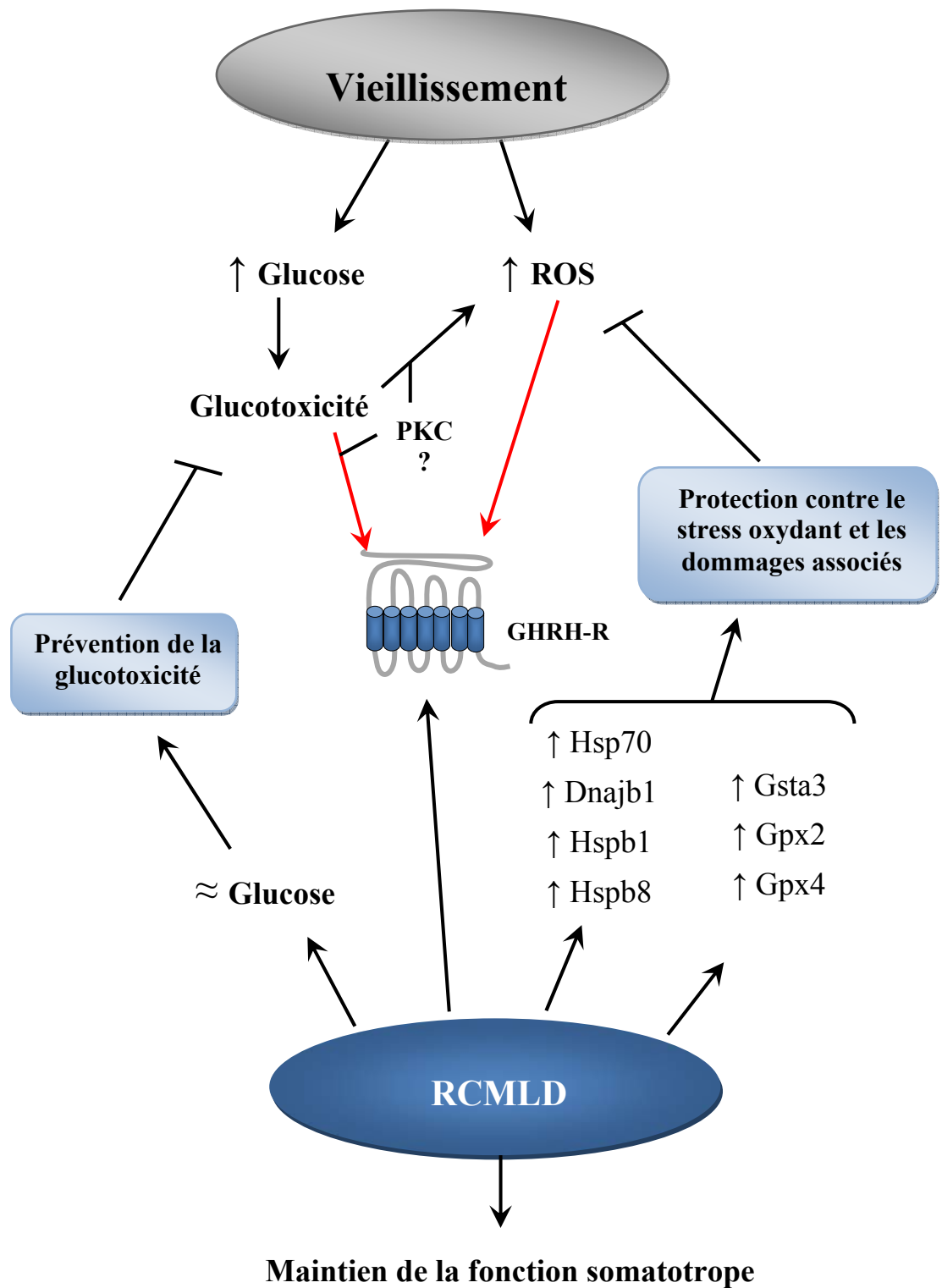
mieux définir leur régulation et leur rôle dans la somatotrope. Toutefois ces résultats sont novateurs et différent de ceux présentés dans d'autres études portant sur la restriction calorique. Ces nouvelles pistes mécanistiques pourront être étudiées et mener à l'élaboration de stratégies nutritionnelles ou pharmacologiques aussi efficaces que la RCMLD pour prévenir ou retarder la somatopause.

## **5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Les études présentées dans le cadre de cette thèse ont permis de mettre en évidence les effets bénéfiques de la RCMLD sur la régulation des niveaux d'ARNm et la fonctionnalité du GHRH-R. Elles ont permis de proposer le glucose et les glucocorticoïdes comme des facteurs hormonaux ou métaboliques susceptibles de contribuer aux effets bénéfiques de la RCMLD sur le GHRH-R. Des gènes associés à des systèmes de protection et de réparation des dommages cellulaires ont été identifiés dans l'hypophyse antérieure de rats âgés et soumis à la RCMLD et pourraient jouer un rôle important dans la prévention ou le retardement de la somatopause. Elles ont également permis de déterminer qu'une glucotoxicité *in vivo* affecte la régulation de certains gènes de l'axe somatotrope et de proposer que celle-ci puisse contribuer aux effets délétères observés au niveau de cet axe au cours du vieillissement.

Ces résultats permettent de proposer de nouvelles hypothèses mécanistiques dans le processus de la somatopause et dans les effets bénéfiques de la RCMLD (Fig. 7). Chez le rat âgé, une augmentation chronique des niveaux de glucose circulants se traduirait par une glucotoxicité au niveau de la cellule somatotrope. Il pourrait être proposé que cette glucotoxicité exerce ses effets délétères soit par une augmentation de stress oxydant ou par l'intermédiaire d'autres voies de signalisation qui pourraient affecter directement ou indirectement la régulation du gène du GHRH-R. Dans les cellules endothéliales vasculaires, la présence d'une concentration élevée de glucose active la PKC et participe aux complications vasculaires diabétiques (Avignon et Sultan, 2006). En situation physiologique, le glucose est principalement métabolisé *via* les voies de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative. En situation d'hyperglycémie, le glucose en excès peut être dirigé dans des voies alternatives et peut, entre autres, participer à la synthèse *de novo* de DAG, qui active la PKC. L'activation de la PKC est également associée à une augmentation de TGF- $\beta$ , de NADPH oxydase, de NF- $\kappa$ B et de ROS (Roberstson, 2004). Celle-ci pourrait possiblement être impliquée dans les effets de la glucotoxicité dans plusieurs types cellulaires, incluant la somatotrope. Plusieurs études ont également rapporté la présence de O-N-acétylglucosaminylation, une modification post-transcriptionnelle de certains facteurs de transcription tels que le Sp1, NF- $\kappa$ B, P53 ou Foxo, en situation de glucotoxicité et proposé qu'elle contribue aux complications diabétiques (Issad et Kuo, 2008). Il pourrait être suggéré qu'une telle modification puisse survenir sur les facteurs de transcription

**FIGURE 7 : Mécanismes potentiellement impliqués dans les effets bénéfiques de la RCMLD sur la fonction somatotrope du rat vieillissant**



**Légende :**  
 → Effet bénéfique      → Effet délétère      —| Protection

associés à la régulation de l'expression du GHRH-R et vienne affecter sa régulation. Une augmentation de production de stress oxydant, indépendamment de la glucotoxicité, est également possible et pourrait contribuer aux effets délétères observés. Tel que mentionné précédemment, la présence de ROS pourrait mener à l'oxydation du GHRH-R et d'autres composantes de l'axe somatotrope ou encore affecter sa fonctionnalité par une oxydation moins sélective des constituants de la somatotrope.

Afin de vérifier les hypothèses concernant les effets de la glucotoxicité au cours du vieillissement, le modèle de rats infusés présenté dans cette thèse pourrait être utile dans un premier temps afin de préciser les mécanismes sous-jacents. Des études précédentes *in vitro* ayant mis en évidence une augmentation de LPO en présence de glucotoxicité (Bédard et al., 2008). Afin de valider la présence de stress oxydant, une mesure des niveaux de ROS ou de LPO devra être effectuée dans le modèle *in vivo*. Des mécanismes indirects, tels que l'activation de la voie PKC, devront être évalués afin de préciser leur implication possible dans les effets de la glucotoxicité. Les niveaux d'ARNm et protéines phosphorylées devront d'abord être quantifiés en situation de glucotoxicité *in vitro* et *in vivo*. Si des changements sont observés, des études sur des cellules hypophysaires de rat, en absence et présence d'inhibiteurs sélectifs des ces voies pourront être envisagées. Afin d'étudier si l'interaction entre des facteurs de transcription et le promoteur du gène du GHRH-R est modifiée en condition de glucotoxicité, une étude de retard sur gel pourra être entreprise.

Une prévention de la glucotoxicité et du stress oxydant, pourraient constituer des phénomènes importants dans les effets de la RCMLD sur le GHRH-R. L'étude de régulation génique a révélé la capacité de la RCMLD à maintenir et augmenter l'expression des gènes associés aux systèmes antioxydants et aux chaperonnes. Afin de montrer l'importance de ces gènes candidats dans le maintien des niveaux de GHRH-R, des études dans les cellules hypophysaires utilisant une stratégie d'ARN interférents pourrait être envisagée. Ainsi, si ces mécanismes sont essentiels au maintien des niveaux fonctionnels de GHRH-R, une diminution ou absence de leur action pourrait mener à un phénotype de vieillissement accéléré de la somatotrope. Il serait également intéressant de quantifier les niveaux d'ARNm et de protéines de ces candidats dans un autre modèle de vieillissement réussi, le rat LOU

qui montre un maintien des niveaux de GHRH-R avec le vieillissement (Veyrat-Durebex et al., 2005), dans le but de déterminer si ces mécanismes sont également activés.

Considérant les résultats obtenus à l'étape précédente, l'élaboration de stratégies nutritionnelles alternatives qui ciblent ces voies de signalisation serait à considérer. Les résultats de l'étude portant sur les effets d'une diète riche en antioxydants sur l'axe somatotrope des rats âgés ont montré que des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier la combinaison et le dosage en antioxydants nécessaire à l'obtention d'un traitement optimal. Pour ce faire, des études *in vitro* devront d'abord être effectuées dans des cellules d'hypophyse antérieure de rats soumises à un stress oxydant (*e.g.* glucotoxicité) et permettront d'identifier les composés antioxydants les plus efficaces dans cette condition. L'acide  $\alpha$ -lipoïque qui est reconnue pour jouer plusieurs rôles en plus de son potentiel antioxydant et qui exerce des effets bénéfiques dans plusieurs types cellulaires et modèles animaux (Shay et al., 2009), pourrait être ajoutée à ceux déjà étudiés (vitamine C, E et SAME). Une quantification des niveaux d'ARNm du GHRH-R ainsi que de la production d'AMPc et de GH stimulés par le GHRH en conditions de stress oxydant et en présence d'antioxydants pourront être effectués afin de confirmer cette hypothèse. Des études récentes ont suggéré des bénéfices d'une supplémentation en acétylcarnitine, impliqué dans le métabolisme mitochondrial de l'acétyl-CoA, dans certaines dysfonctions reliées au vieillissement, en particulier au niveau cardiaque et cognitif (Rosca et al., 2009). Dans des cellules neuronales de rat en présence de  $\beta$ -amyloïde, un traitement avec l'acétyl-L-carnitine augmente significativement les niveaux de la protéine Hsp72 (Abdul et al., 2006). De plus un traitement avec l'acétyl-L-carnitine durant 4 mois chez les rats de 24 mois montre une augmentation des niveaux de protéines Hsp70 comparativement aux rats âgés non-traités (Calabrese et al., 2006). Ainsi, dans le cadre de notre étude, l'utilisation de l'acétyl-L-carnitine pourrait également être envisagée afin de favoriser une expression de Hsp70 similaire à celle observée avec le RCMLD. Finalement, les composés démontrant une efficacité concluante pourront être testés à long terme chez le rat vieillissant et comparés avec les effets de la RCMLD. Il faut également envisager que les mécanismes de la somatopause ou de la RCMLD soient plus complexes que ceux proposés ici. Dans ce cas, de nouvelles études devront être proposées, prenant comme point de départ d'autres cibles identifiées dans l'étude de régulation génique.

Le vieillissement de la population est un phénomène mondial et le Canada n'y fait pas exception. Le dernier recensement canadien de 2006 nous indique que 13.7 % de la population est âgée de plus de 65 ans. Selon les projections démographiques, la proportion de personnes âgées pourrait représenter près du quart (23-25 %) de la population totale canadienne en 2036 (Statistique Canada: [www.statcan.gc.ca](http://www.statcan.gc.ca)). Ainsi, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui surviennent au cours du vieillissement, utilisant des modèles animaux, est donc importante et ces connaissances pourront par la suite être utiles chez l'humain. Ces études n'ont pas pour but ultime d'allonger la durée de vie mais visent plutôt à améliorer la qualité de vie des personnes âgées. Les résultats de la présente thèse suggèrent des pistes mécanistiques mises en place par la RCMLD pour prévenir ou retarder la somatopause. Ils permettront une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le maintien de la fonction somatotrope au cours du vieillissement et serviront à l'élaboration de stratégies nutritionnelles ou pharmacologiques favorisant un vieillissement en santé.



## **6. BIBLIOGRAPHIE**

**Abdul** HM, Calabrese V, Calvani M, Butterfield DA (2006) Acetyl-L-carnitine-induced up-regulation of heat shock proteins protects cortical neurons against amyloid-beta peptide 1-42-mediated oxidative stress and neurotoxicity: Implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 84:398-408

**Abribat** T, Boulanger L, Gaudreau P (1990) Characterization of [<sup>125</sup>I-Tyr<sub>10</sub>] human growth hormone-releasing factor (1-44) amide binding to rat pituitary: evidence for high and low affinity classes of sites. *Brain Res* 528: 291-299.

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

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

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

**Alvarez** CV, Mallo F, Burguera B, Cacicedo L, Dieguez C, Casanueva FF (1991) Evidence for a direct pituitary inhibition by free fatty-acids *in vivo* growth-hormone responses to growth hormone-releasing hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 53:185-189.

**Anderson** LL, Jeftinija S, Scanes CG (2004) Growth hormone secretion: molecular and cellular mechanisms and *in vivo* approaches. *Exp Biol Med* 229: 291-302.

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

**Anderson** RM, Weindruch R (2010) Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging. *Trends Endocrinol Metab* 21:134-141.

**Argente** J, Chowen JA, Zeitler P, Clifton DK, Steiner RA (1991) Sexual dimorphism of growth hormone-releasing hormone and somatostatin gene expression in the hypothalamus of the rat during development. *Endocrinology* 128:2369-2375.

**Asghar** M, Banday AA, Fardoun RZ, Lokhandwala MF (2006) Hydrogen peroxide causes uncoupling of dopamine D1-like receptors from G proteins via a mechanism involving protein kinase C and G-protein-coupled receptor kinase 2. *Free Radic Biol Med* 40:13-20.

**Aso** Y, Inukai T, Tayama K, Takemura Y (2000) Serum concentrations of advanced glycation endproducts are associated with the development of atherosclerosis as well as diabetic microangiopathy in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetologica* 37:87-92.

**Avignon** A, Sultan A (2006) PKC-B inhibition: a new therapeutic approach for diabetic complications? *Diabetes Metab* 32(3):205-13.

**Babusikova E**, Hatok J, Dobrota D, Kaplan P (2007) Age-related oxidative modifications of proteins and lipids in rat brain. *Neurochem Res* 32:1351-1356.

**Bach MA**, Bondy CA (1992) Anatomy of the pituitary insulin-like growth factor system. *Endocrinology* 131:2588-2594.

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

**Barabutis N**, Schally AV (2008a) Antioxidant activity of growth hormone-releasing hormone antagonists in LNCaP human prostate cancer line. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20470-20475.

**Barabutis N**, Schally AV (2008b) Knocking down gene expression for growth hormone-releasing hormone inhibits proliferation of human cancer cell lines. *Br J Cancer* 98:1790-1796.

**Barabutis N**, Siejka A, Schally AV, Block NL, Cai R, Varga JL (2010) Activation of mitogen-activated protein kinases by a splice variant of GHRH receptor. *J Mol Endocrinol* 44:127-134.

**Barabutis N**, Siejka A, Schally AV (2011) Growth hormone releasing hormone induces the expression of nitric oxide synthase. *J Cell Mol Med* 15:1148-1155.

**Barinaga M**, Yamonoto G, Rivier C, Vale W, Evans R, Rosenfeld MG (1983) Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by growth hormone-releasing factor. *Nature* 306:84-85.

**Barinaga M**, Bilezikjian LM, Vale WW, Rosenfeld MG, Evans RM (1985) Independent effects of growth hormone-releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314: 279-281.

**Barja G** (2004) Free radicals and aging. *Trends in Neurosciences* 27:595-600.

**Barnett P** (2003) Somatostatin and somatostatin receptor physiology. *Endocrine* 20:255-264.

**Baumeister H**, Meyerhof W (2000) Gene regulation of somatostatin receptors in rats. *Journal of Physiology-Paris* 94:167-177.

**Bédard K**, Strecko J, Thériault K, Bédard J, Veyrat-Durebex C, Gaudreau P (2008) Effects of a high-glucose environment on the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor: type 1 diabetes compared with in vitro glucotoxicity. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 294:E740-E751.

**Bedo G**, Santisteban P, Jolin T, Aranda A (1991) Expression of the growth hormone gene and the pituitary-specific transcription factor GHF-1 in diabetic rats. *Mol Endocrinol* 5(11):1730-9.

- Bengmark S** (2006) Impact of nutrition on ageing and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9(1):2-7.
- Bennett PA**, Thomas GB, Howard AD, Feighner SD, van der Ploeg LH, Smith RG, Robinson IC (1997) Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology* 138(11):4552-7.
- Ben-Shlomo A**, Melmed S (2010) Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends in Endocrinol Metab* 21:123-133
- Benzi G**, Moretti A (1995) Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic Biol Med* 19:77-101.
- Berelowitz M**, Firestone SL, Frohman LA (1981) Effects of growth hormone excess and deficiency on hypothalamic somatostatin content and release on tissue somatostatin distribution. *Endocrinology* 109 : 714-719.
- Bhathena SJ**, Ali AA, Mohamed AI, Hansen CT, Velasquez MT (2002) Differential effects of dietary flaxseed protein and soy protein on plasma triglyceride and uric acid levels in animal models. *J Nutr Biochem* 13:684-689.
- Bichell DP**, Rotwein P, McCarthy TL (1993) Prostaglandin E2 rapidly stimulates insulin-like growth factor-I gene expression in primary rat osteoblast cultures: evidence for transcriptional control. *Endocrinology* 133:1020-1028.
- Bierhaus A**, Humpert P, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern D, Nawroth P (2005) Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* 83:876-886.
- Bilezikjian LM**, Seifert H, Vale W (1986) Desensitization to growth hormone-releasing factor (GRF) is associated with down-regulation of GRF-binding sites. *Endocrinology*. 118(5):2045-52.
- Billestrup N**, Swanson LW, Vale W (1986) Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6854-6857.
- Billestrup N**, Mitchell RL, Vale W, Verma IM (1987) Growth hormone-releasing factor induces c-fos expression in cultured primary pituitary cells. *Mol Endocrinol* 1: 300-305.
- Bohlen P**, Brazeau P, Bloch B, Ling N, Gaillard R, Guillemin R (1983) Human hypothalamic growth hormone releasing factor (GRF): evidence for two forms identical to tumor derived GRF-44-NH2 and GRF-40. *Biochem Biophys Res Commun*. 114 : 930-6.
- Boisvert C**, Paré C, Veyrat-Durebex C, Robert A, Dubuisson S, Morel G and Gaudreau P (2002) Localization and regulation of a functional growth hormone-releasing hormone receptor in the rat renal medulla. *Endocrinology* 143: 1475-1484.

- Bondy C**, Werner H, Roberts J, LeRoith D (1992) Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: Comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience* 46:909-923.
- Bonnefont-Rousselot D**, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J (2000) Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 26:163-176.
- Bonnefont-Rousselot D** (2002) Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 5(5):561-8.
- Bottiglieri T**, Godfrey P, Flynn T, Carney MW, Toone BK, Reynolds EH (1990) Cerebrospinal fluid S-adenosylmethionine in depression and dementia: effects of treatment with parenteral and oral S-adenosylmethionine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53:1096-1098.
- Bottiglieri T** (2002) S-Adenosyl-L-methionine (SAME): from the bench to the bedside—molecular basis of a pleiotropic molecule. *Am J Clin Nutr* 76:1151S-1157S.
- Boujon CE**, Bestetti GE, Abramo F, Locatelli V, Rossi GL (1995) The reduction of circulating growth hormone and prolactin in streptozocin-induced diabetic male rats is possibly caused by hypothalamic rather than pituitary changes. *J Endocrinol.* 145(1): 19-26.
- Boulanger L**, Andersen PH, Gaudreau P (1999) Development of a site-directed polyclonal antibody against the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its use to estimate GHRH receptor concentration in normal and hypothyroid rats. *Neuroendocrinology* 70:117-127.
- Brazeau P**, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179:77-79.
- Brazeau P**, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB, Guillemin R (1984) Growth hormone-releasing factor from ovine and caprine hypothalamus: isolation, sequence analysis and total synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 25(2):606-14.
- Brindle PK**, Montminy MR (1992) The CREB family of transcription activators. *Curr Opin Genet Dev* 2:199-204.
- Bruno JF**, Xu Y, Song J, Berelowitz M (1994) Pituitary and hypothalamic somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in the food-deprived and diabetic rat. *Endocrinology* 135:1787-1792.
- Busiguina S**, Argente J, Garcia-Segura LM, Chowen JA (2000) Anatomically specific changes in the expression of somatostatin, growth hormone-releasing hormone and growth hormone receptor mRNA in diabetic rats. *J Neuroendocrinol* 12: 29-39.

- Butler** AA, Roith DL (2001) Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu Rev Physiol* 63:141-164.
- Butt** AJ, Firth SM, King MA, Baxter RC (2000) Insulin-like growth factor-binding protein-3 modulates expression of Bax and Bcl-2 and potentiates p53-independent radiation-induced apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 275 :39174-39181.
- Calabrese** V, Colombrita C, Sultana R, Scapagnini G, Calvani M, Butterfield DA, Stella AMG (2006) Redox modulation of heat shock protein expression by acetylcarnitine in aging brain: relationship to antioxidant status and mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal* 8:404-416.
- Camino**s JE, Nogueiras R, Blanco M, Seoane LM, Bravo S, Alvarez CV, Garcia-Caballero T, Casanueva FF, Dieguez C (2003) Cellular distribution and regulation of ghrelin messenger ribonucleic acid in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 144:5089-5097.
- Campbell** RM, Scanes CG (1992) Evolution of the growth hormone-releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth Regul.* 2:175-191.
- Campisi** J, d'Adda di Fagagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 729-740.
- Cao** SX, Dhahbi JM, Mote PL, Spindler SR (2001) Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19):10630-5.
- Carr** Anit, Frei Balz (1999) Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *The FASEB Journal* 13:1007-1024.
- Casanueva** FF, Villanueva L, Dieguez C, Diaz Y, Cabranes JA, Szoke B, Scanlon MF, Schally AV, Fernandez-Cruz A (1987) Free fatty acids block growth hormone (gh) releasing hormone-stimulated gh secretion in man directly at the pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 65:634-642.
- Castillo** AI, Aranda A (1997) Differential Regulation of Pituitary-Specific Gene Expression by Insulin-Like Growth Factor 1 in Rat Pituitary GH4C1 and GH3 Cells. *Endocrinology* 138:5442-5451.
- Cederroth** CR, Nef S (2009) Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol Cell Endocrinol* 304:30-42.
- Chen** H (2004) Gene expression by the anterior pituitary gland: effects of age and caloric restriction. *Mol Cell Endocrinol* 222(1-2):21-31.
- Cheng** K, Chan WW, Butler B, Wei L, Schoen WR, Wyvratt MJ, Jr., Fisher MH, Smith RG (1993) Stimulation of growth hormone release from rat primary pituitary cells by L-692,429, a novel non-peptidyl GH secretagogue. *Endocrinology* 132:2729-2731.
- Cheng** Rang, Chan Wws, Barreto A, Jr., Convey Em, Smith RG (1989) The synergistic effects of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> on growth hormone (GH)-releasing factor-

stimulated GH release and intracellular adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in rat primary pituitary cell culture. *Endocrinology* 124:2791-2798.

**Chiang** PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *The FASEB Journal* 10:471-480.

**Chin** E, Zhou J, Bondy C (1992) Anatomical relationships in the patterns of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-1, and IGF-I receptor gene expression in the rat kidney. *Endocrinology* 130:3237-3245.

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

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

**Chung** HY, Kim HJ, Kim JW, Yu BP (2001) The inflammation hypothesis of aging. *Ann NY Acad Sci* 928:327-335.

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

**Clemmons** DR, Klibanski Anne, Underwood LE, McArthur JW, Ridgway EC, Beitins IZ, Van Wyk JJ (1981) Reduction of plasma immunoreactive somatomedin C during fasting in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 53:1247-1250.

**Clemmons** DR, Thissen JP, Maes M, Ketelslegers JM, Underwood LE (1989) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) infusion into hypophysectomized or protein-deprived rats induces specific igf-binding proteins in serum. *Endocrinology* 125:2967-2972.

**Cohen** P, Lamson G, Okajima T, Rosenfeld RG (1993) Transfection of the human insulin-like growth factor binding protein-3 gene into Balb/c fibroblasts inhibits cellular growth. *Mol Endocrinol* 7:380-386.

**Colman** RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325:201-204.

**Coppé** JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J (2009) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5: 99-118.

**Corpas** Emil, Harman SM, Blackman MR (1993) Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev* 14:20-39.

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

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

**Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS (2001)** A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50(8):1714-9.

**Cunha SR, Mayo KE (2002)** Ghrelin and growth hormone (GH) secretagogues potentiate GH-releasing hormone (GHRH)-induced cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production in cells expressing transfected GHRH and GH secretagogue receptors. *Endocrinology* 143:4570-4582.

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

**Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2000)** Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141:4255-4261.

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

**D'Costa AP, Lenham JE, Ingram RL, Sonntag WE (1993b)** Moderate caloric restriction increases type 1 IGF receptors and protein synthesis in aging rats. *Mech Ageing Dev* 71:59-71.

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

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

**De Gennaro Colonna V, Fidone F, Cocchi D, Müller EE (1993)** Feedback effects of growth hormone on growth hormone-releasing hormone and somatostatin are not evident in aged rats. *Neurobiol Aging* 14(5):503-7.

**De Magalhaes JP, Curado J, Church GM (2009)** Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics* 25:875-881.

**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.

**Dilman VM, Dean W (1992)** The neuroendocrine theory of aging and degenerative disease. Pensacola, Fla: Center for Bio-Gerontology.



**Di Padova C** (1987) S-Adenosylmethionine in the treatment of osteoarthritis : Review of the clinical studies. *Am J Med* 83:60-65.

**Dmitriev LF, Titov VN** (2010) Lipid peroxidation in relation to ageing and the role of endogenous aldehydes in diabetes and other age-related diseases. *Ageing Research Reviews* 9:200-210.

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

**Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenber A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JCM, Breteler MMB** (2002) Dietary intake of antioxidants and risk of alzheimer disease. *JAMA* 287:3223-3229.

**Englander EW, Gomez GA, Greeley J** (2004) Alterations in stomach ghrelin production and in ghrelin-induced growth hormone secretion in the aged rat. *Mech Ageing Dev* 125:871-875.

**Eppler E, Jevdjovic T, Maake C, Reinecke M** (2007) Insulin-like growth factor I (IGF-I) and its receptor (IGF-1R) in the rat anterior pituitary. *Eur J Neurosci* 25:191-200.

**Ernst M, Rodan GA** (1991) Estradiol regulation of insulin-like growth factor-1 expression in osteoblastic cells: evidence for transcriptional control. *Mol Endocrinol* 5:1081-1089.

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

**Fanayan S, Firth SM, Baxter RC** (2002) Signaling through the Smad pathway by insulin-like growth factor-binding protein-3 in breast cancer cells. Relationship to transforming growth factor-beta 1 signaling. *J Biol Chem* 277: 7255-7261.

**Fang YZ, Yang S, Wu G** (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18:872-879.

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

**Ferone D, Boschetti M, Resmini E, Giusti M, Albanese V, Goglia U, Albertelli M, Vera L, Bianchi F, Minuto F** (2006) Neuroendocrine-immune interactions. *Ann NY Acad Sci* 1069:129-144.

**Ferrés-Maso M, Sacilotto N, Lopez-Rodas G, Dagorn J, Iovanna J, Closa D, Folch-Puy E** (2009) PAP1 signaling involves MAPK signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 66:2195-2204.

**Finkel T, Holbrook NJ** (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247.

- Firth** SM, Baxter RC (2002) Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 23:824-854.
- Fodor** M, Oudejans CBM, Delemarre-van de Waal HA (2001) Absence of androgen receptor in the growth hormone-releasing hormone-containing neurons in the mediobasal hypothalamus of the adult male rat. *J Neuroendocrinol* 13:724-727.
- Folch-Puy** E, Granell S, Dagorn JC, Iovanna JL, Closa D (2006) Pancreatitis-associated protein 1 suppresses NF- $\kappa$ B activation through a JAK/STAT-mediated mechanism in epithelial cells. *J Immunol* 176:3774-3779.
- Fontana** L, Klein S (2007) Aging, Adiposity, and Calorie Restriction. *JAMA* 297:986-994.
- Fontana** L (2009) Neuroendocrine factors in the regulation of inflammation: Excessive adiposity and calorie restriction. *Exp Gerontol* 44:41-45.
- Fontana** L, Partridge L, Longo VD (2010) Extending Healthy Life Span : From Yeast to Humans. *Science* 328:321-326.
- French** MB, Moor BC, Lussier BT, Kraicer J (1989) Protein kinase C is not essential for growth hormone (GH)-releasing factor-induced GH release from rat somatotrophs. *Endocrinology* 124:2235-2244.
- Frohman** LA, Szabo M (1981) Ectopic production of growth hormone-releasing factor by carcinoid and pancreatic islet tumors associated with acromegaly. *Prog Clin Biol Res* 74:259-271.
- Frohman** MA, Downs TR, Chomczynski P, Frohman LA (1989) Cloning and characterization of mouse growth hormone-releasing hormone (GRH) complementary DNA: increased GRH messenger RNA levels in the growth hormone-deficient lit/lit mouse. *Mol Endocrinol* 3:1529-1536.
- Frohman** LA, Downs TR, Chomczynski P (1992) Regulation of growth hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 13: 344-405.
- Frohman** LA (1996) Cellular physiology of growth hormone-releasing hormone. In: *Growth hormone secretagogues*, BB Bercu and RF Walker Eds Springer-Verlag, New-York :137-44.
- Frutos** MGS, Cacicedo L, Méndez CF, Vicent D, Gonzalez M, Sanchez-Franco F (2007) Pituitary alterations involved in the decline of growth hormone gene expression in the pituitary of aging rats. *J Geront A Biol Sci Med Sci* 62:585-597.
- Fry** C, Gunter DR, McMahon CD, Steele B, Sartin JL (1998) Cytokine-mediated growth hormone release from cultured ovine pituitary cells. *Neuroendocrinology* 68: 192-200.
- Fryburg** DA (1994) Insulin-like growth factor I exerts growth hormone- and insulin-like actions on human muscle protein metabolism. *Am J Physiol- Endocrinol Metab* 267:E331-E336.

**Frystyk J**, Delhanty PJD, Skjaerbaek C, Baxter RC (1999) Changes in the circulating IGF system during short-term fasting and refeeding in rats. *Am J Physiol- Endocrinol Metab* 277:E245-E252.

**Fukata J**, Diamond DJ, Martin JB (1985) Effects of rat growth hormone (rGH)-releasing factor and somatostatin on the release and synthesis of rGH in dispersed pituitary cells. *Endocrinology* 117:457-467.

**Garcia-Segura LM**, Rodriguez JR, Torres-Aleman I (1997) Localization of the insulin-like growth factor I receptor in the cerebellum and hypothalamus of adult rats: an electron microscopic study. *Journal of Neurocytology* 26:479-490.

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

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

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

**Ghigo E**, Arvat E, Muccioli G, Camanni F (1997) Growth hormone-releasing peptides. *Eur J Endocrinol* 136:445-460.

**Gick GG**, Zeytin FN, Brazeau P, Ling NC, Esch FS, Bancroft C (1984) Growth hormone-releasing factor regulates growth hormone mRNA in primary cultures of rat pituitary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1553-1555.

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

**Girard N**, Boulanger L, Denis S, Gaudreau P (1999) Differential in vivo regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor by GHRH in young and aged rats. *Endocrinology* 140:2836-42.

**Giustina A**, Mazziotti G, Canalis E (2008) Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev* 29:535-559.

**Godfrey P**, Rahal JO, Beamer WG, Copeland NG, Jenkins NA, Mayo KE (1993) GHRH receptor of *little* mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nat. Genet.* 4: 227-32.

**Goldberg T**, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H (2004) Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc* 104:1287-1291.

**Goldstein S**, Moerman EJ, Jones RA, Baxter RC (1991) Insulin-like growth factor binding protein 3 accumulates to high levels in culture medium of senescent and quiescent human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9680-9684.

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

**Goodman-Gruen D**, Kritz-Silverstein D (2001) Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *J Nutr* 131(4):1202-6.

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

**Granata R**, Trovato L, Gallo MP, Destefanis S, Settanni F, Scarlatti F, Brero A, Ramella R, Volante M, Isgaard J, Levi R, Papotti M, Alloatti G, Ghigo E (2009) Growth hormone-releasing hormone promotes survival of cardiac myocytes in vitro and protects against ischaemia-reperfusion injury in rat heart. *Cardiovasc Res* 83:303-312.

**Gredilla R**, Barja G (2005) Minireview: The Role of Oxidative Stress in Relation to Caloric Restriction and Longevity. *Endocrinology* 146:3713-3717.

**Gronborg M**, Wulff BS, Rasmussen JS, Kjeldsen T, Gammeltoft S (1993) Structure-function relationship of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 268:23435-23440.

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

**Gucev ZS**, Oh Y, Kelley KM, Labarta JI, Vorwerk P, Rosenfeld RG (1997) Evidence for Insulin-Like Growth Factor (IGF)-Independent Transcriptional Regulation of IGF Binding Protein-3 by Growth Hormone in SKHEP-1 Human Hepatocarcinoma Cells. *Endocrinology* 138:1464-1470.

**Guillemin R**, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB (1982) Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 218: 585-7.

**Gutierrez S**, Palacios I, Sanchez-Pernaute O, Hernandez P, Moreno J, Egido J, Herrero-Beaumont G (1997) SAME restores the changes in the proliferation and in the synthesis of fibronectin and proteoglycans induced by tumour necrosis factor alpha on cultured rabbit synovial cells. *Rheumatology* 36:27-31.

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

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

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

**Harman** D (1956) Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol* 11:298-300.

**Harmar** A (2001) Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biology* 2:3013.

**Hashimoto** K, Koga M, Motomura T, Kasayama S, Kouhara H, Ohnishi T, Arita N, Hayakawa T, Sato B, Kishimoto T (1995) Identification of alternatively spliced messenger ribonucleic acid encoding truncated growth hormone-releasing hormone receptor in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2933-2939.

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

**Havt** A, Schally AV, Halmos G, Varga JL, Toller GL, Horvath JE, Szepeshazi K, Koster F, Kovitz K, Groot K, Zarandi M, Kanashiro CA (2005) The expression of the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its splice variants in normal and neoplastic human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:17424-17429.

**Heilbronn** LK, de JL, Frisard MI, Delany JP, Larson-Meyer DE, Rood J, Nguyen T, Martin CK, Volaufova J, Most MM, Greenway FL, Smith SR, Deutsch WA, Williamson DA, Ravussin E (2006) Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. *JAMA* 295:1539-1548.

**Higami** Y, Pugh TD, Page GP, Allison DB, Prolla TA, Weindruch R (2004) Adipose tissue energy metabolism: altered gene expression profile of mice subjected to long-term caloric restriction. *FASEB J* 18(2):415-7.

**Higashi** Y, Takenaka A, Takahashi SI, Noguchi T (1998) Effect of protein restriction on messenger RNA of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding proteins in liver of ovariectomized rats. *Br J Nutr* 79:447-453.

**Higgins** SC, Gueorguiev M, Korbonits M (2007) Ghrelin, the peripheral hunger hormone. *Ann Med* 39:116-136.

**Hipkiss** AR (2006) Accumulation of altered proteins and ageing: Causes and effects. *Exp Gerontol* 41:464-473.

**Hofbauer** LC, Rafferzeder M, Janssen OE, Gartner R (1995) Insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid expression in porcine thyroid follicles is regulated by thyrotropin and iodine. *Eur J Endocrinol* 132:605-610.

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

**Holmgren A** (2000) Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid Redox Signal* 2:811-820.

**Honegger J**, Spagnoli A, D'Urso R, Navarra P, Tsagarakis S, Besser GM, Grossman AB (1991) Interleukin-1 beta modulates the acute release of growth hormone-releasing hormone and somatostatin from rat hypothalamus in vitro, whereas tumor necrosis factor and interleukin-6 have no effect. *Endocrinology* 129: 1275-1282.

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

**Horikawa R**, 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.

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

**Hou Z**, Miao Y, Gao L, Pan H, Zhu S (2006) Ghrelin-containing neuron in cerebral cortex and hypothalamus linked with the DVC of brainstem in rat. *Regul Pept* 134:126-131.

**Howard AD**, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJS, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LHT (1996) A Receptor in Pituitary and Hypothalamus That Functions in Growth Hormone Release. *Science* 273:974-977.

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

**Hudson EK**, Hogue BA, Souza-Pinto NC, Croteau DL, Anson RM, Bohr VA, Hansford RG (1998) Age-associated change in mitochondrial DNA damage. *Free Radic Res* 29:573-579.

**Imaki T**, Shibasaki T, Masuda A, Hotta M, Yamauchi N, Demura H, Shizume K, Wakabayashi I, Ling N (1986) The effect of glucose and free fatty-acids on growth-hormone (GH) releasing factor-mediated GH secretion in rats. *Endocrinology* 118:2390-2394.

**Issad T**, Kuo M (2008) O-GlcNAc modification of transcription factors, glucose sensing and glucotoxicity. *Trends Endocrinol Metab* 19:380-389.

**James RA**, Sarapura VD, Bruns C, Raulf F, Dowding JM, Gordon DF, Wood WM, Ridgway EC (1997) Thyroid Hormone-Induced Expression of Specific Somatostatin Receptor Subtypes Correlates with Involution of the TtT-97 Murine Thyrotrope Tumor. *Endocrinology* 138:719-724.

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

**Judd AM**, Koike K, Yasumoto T, MacLeod RM (1986) Protein kinase C activators and calcium-mobilizing agents synergistically increase GH, LH, and TSH secretion from anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 42:197-202.

**Kalmar B**, Greensmith L (2009) Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev* 61:310-318.

**Kamegai J**, Tamura H, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I (2001) Thyroid hormones regulate pituitary growth hormone secretagogue receptor gene expression. *J Neuroendocrinol* 13:275-278.

**Kamegai J**, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Tatsuguchi A, Sugihara H, Oikawa S, Kineman RD (2004) The role of pituitary ghrelin in growth hormone (GH) secretion: GH-releasing hormone-dependent regulation of pituitary ghrelin gene expression and peptide content. *Endocrinology* 145: 3731-3738.

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

**Kato M**, Hoyland J, Sikdar SK, Mason WT (1992) Imaging of intracellular calcium in rat anterior pituitary cells in response to growth hormone releasing factor. *J Physiol* 447:171-189.

**Katsumata N**, Chakraborty C, Myal Y, Schroedter IC, Murphy LJ, Shiu RP, Friesen HG (1995) Molecular cloning and expression of peptide 23, a growth hormone-releasing hormone-inducible pituitary protein. *Endocrinology* 136:1332-1339.

**Kawakami Y**, Tsurugasaki W, Yoshida Y, Igarashi Y, Nakamura S, Osada K (2004) Regulative actions of dietary soy isoflavone on biological antioxidative system and lipid metabolism in rats. *J Agric Food Chem* 52:1764-1768.

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

**Kim E**, Seo S, Chung H, Park S (2008) Role of Glucocorticoids in Fasting-induced Changes in Hypothalamic and Pituitary Components of the Growth Hormone (GH)-axis. *Korean J Physiol Pharmacol* 12: 217-23.

**Kim** KS, Kim MS, Seu YB, Chung HY, Kim JH, Kim JR (2007) Regulation of replicative senescence by insulin-like growth factor-binding protein 3 in human umbilical vein endothelial cells. *Aging Cell* 6:535-545.

**Kineman** RD, Kamegai J, Frohman LA (1999) Growth Hormone (GH)-Releasing Hormone (GHRH) and the GH Secretagogue (GHS), L692,585, Differentially modulate rat pituitary ghs receptor and ghrh receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 140:3581-3586.

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

**Kojima** M, Kangawa K (2010) Ghrelin: more than endogenous growth hormone secretagogue. *Ann NY Acad Sci* 1200:140-148.

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

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

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

**Lam** KS, Lee MF, Tam SP, Srivastava G (1996) Gene expression of the receptor for growth-hormone-releasing hormone is physiologically regulated by glucocorticoids and estrogen. *Neuroendocrinology* 63: 475-480.

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

**Larson-Meyer** DE, Heilbronn LK, Redman LM, Newcomer BR, Frisard MI, Anton S, Smith SR, Alfonso A, Ravussin E (2006) Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects. *Diabetes Care* 29(6):1337-44.

**Lasko** CM, Korytko AI, Wehrenberg WB, Cuttler L (2001) Differential GH-releasing hormone regulation of GHRH receptor mRNA expression in the rat pituitary. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E626-E631.

**Lee** CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA (1999) Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 285(5432):1390-3.



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

**Lee SC, Shin SH (1996)** Somatostatin does not inhibit prolactin synthesis in normal male rat pituitary cells but inhibits prolactin synthesis in estradiol-primed pituitary cells. *J Endocrinol* 148:69-76.

**Lefevre M, Redman LM, Heilbronn LK, Smith JV, Martin CK, Rood JC, Greenway FL, Williamson DA, Smith SR, Ravussin E (2009)** Caloric restriction alone and with exercise improves CVD risk in healthy non-obese individuals. *Atherosclerosis* 203:206-213.

**Lefrancois L, Boulanger L, Gaudreau P (1995)** Effects of aging on pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites: in vitro mimicry by guanyl nucleotides and reducing agents. *Brain Res* 673: 39-46.

**Lehy T, Accary JP, Dubrasquet M, Lewin MJ (1986)** Growth hormone-releasing factor (somatocinin) stimulates epithelial cell proliferation in the rat digestive tract. *Gastroenterology* 90: 646-53.

**Leidy JW, Cugini CD, Driscoll HK Jr, Chertow BS (1995)** Time course of hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin content in streptozotocin diabetic rats: evidence for early changes in hypothalamic regulation. *Brain Res* 681: 84-90.

**Leitol H, Behrends J, Brabant G (2002)** The thyroid axis in ageing. *Novartis Found Symp* 242: 193-201.

**Leow MK, Loh KC (2006)** Controversial endocrine interventions for the aged. *Singapore Med J* 47: 569-79.

**Le Roith D (2003)** The insulin-like growth factor system. *Exp Diabetes Res* 4: 205-12.

**Levine RL, Stadtman ER (2001)** Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 36:1495-1502.

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

**Liu B, Lee KW, Li H, Ma L, Lin GL, Chandraratna RA, Cohen P (2005)** Combination therapy of insulin-like growth factor binding protein-3 and retinoid X receptor ligands synergize on prostate cancer cell apoptosis in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 11: 4851-4856.

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

**Ludwig B, Ziegler CG, Schally AV, Richter C, Steffen A, Jabs N, Funk RH, Brendel MD, Block NL, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR (2010)** Agonist of growth hormone-releasing hormone as a potential effector for survival and proliferation of pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci* 107:12623-12628.

**Lumpkin**, M.D., McDonald, J.K (1989) Blockade of growth hormone-releasing factor (GRF) activity in the pituitary and hypothalamus of the conscious rat with a peptidic GRF antagonist. *Endocrinology* 124: 1522-31.

**Luque** RM, Kineman RD, Park S, Peng XD, Gracia-Navarro F, Castano JP, Malagon MM (2004) Homologous and heterologous regulation of pituitary receptors for ghrelin and growth hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 145:3182-3189.

**Luque** RM, Gahete MD, Valentine RJ, Kineman RD (2006) Examination of the direct effects of metabolic factors on somatotrope function in a non-human primate model, *Papio anubis*. *J Mol Endocrinol* 37:25-38.

**Luque** RM, Kineman RD (2006) Impact of obesity on the growth hormone axis: evidence for a direct inhibitory effect of hyperinsulinemia on pituitary function. *Endocrinology* 147:2754-2763.

**Lussier** BT, French MB, Moor BC, Kraicer J (1991) Free intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and growth hormone (GH) release from purified rat somatotrophs. III. Mechanism of action of GH- releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 128: 592-603.

**Mahn** K, Borrás C, Knock GA, Taylor P, Khan IY, Sugden D, Poston L, Ward JP, Sharpe RM, Vina J, Aaronson PI, Mann GE (2005) Dietary soy isoflavone-induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo. *The FASEB Journal* 19:1755-1757.

**Malka** D, Vasseur S, Bödeker H, Ortiz EM, Dusetti NJ, Verrando P, Dagorn JC, Iovanna JL (2000) Tumor necrosis factor alpha triggers antiapoptotic mechanisms in rat pancreatic cells through pancreatitis-associated protein I activation. *Gastroenterology* 119: 816-28.

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

**Mari** M, Morales A, Colell A, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC (2009) Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 11:2685-2700.

**Marino** G, Ugalde AP, Fernandez F, Osorio FG, Fueyo A, Freije JMP, Lopez-Otin C (2010) Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proc Natl Acad Sci* 107:16268-16273.

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

**Martinez-Vicente** M, Sovak G, Cuervo AM (2008) Protein degradation and aging. *Exp Gerontol* 40:622-633.

- Masoro** EJ, McCarter RJM, Katz MS, McMahan CA (1992) Dietary Restriction Alters Characteristics of Glucose Fuel Use. *J Gerontol* 47:B202-B208.
- Masoro** EJ (2007) Role of hormesis in life extension by caloric restriction. *Dose Response* 5:163-73.
- Masoro** EJ (2009) Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: A critique of proposed mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1790:1040-1048.
- Matsubara** S, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Takahara J (1995) Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues *J. Endocrinology* 136: 4147-50.
- Mayo** KE, Cerelli GM, Lebo RV, Bruce BD, Rosenfeld MG, Evans RM (1985a) Gene encoding human growth hormone-releasing factor precursor: structure, sequence, and chromosomal assignment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 63-7.
- Mayo** KE, Cerelli GM, Rosenfeld MG, Evans RM (1985b) Characterization of cDNA and genomic clones encoding the precursor to rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature* 314(6010): 464-7.
- Mayo** KE (1992) Molecular cloning and expression of a pituitary specific receptor for growth hormone-releasing factor. *Mol Endocrinol* 6: 1734-1744.
- Mayo** KE, Miller TL, DeAlmeida V, Zheng J, Godfrey PA (1996) The growth-hormone-releasing hormone receptor: signal transduction, gene expression, and physiological function in growth regulation. *Ann.N.Y.Acad.Sci* 805:184-203.
- McCann** SM, Lyson K, Karanth S, Gimeno M, Belova N, Kamat A, Rettori V (1994) Role of cytokines in the endocrine system. *Ann N Y Acad Sci* 741: 50-63.
- McCay** CM, Crowell MF, Maynard LA (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutr* 10; 63-79.
- McCord** JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108:652-659.
- McKee** KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LHT, Howard AD (1997) Molecular Analysis of Rat Pituitary and Hypothalamic Growth Hormone Secretagogue Receptors. *Mol Endocrinol* 11:415-423.
- Melmed** S, Yamashita S, Yamasaki H, Fagin J, Namba H, Yamamoto H, Weber M, Morita S, Webster J (1996) IGF-I receptor signalling: Lessons from the somatotroph. *Recent Prog Horm Res* 51:189-216.
- Merry** BJ (2000) Calorie restriction and age-related oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 908:180-98.
- Messina** M (2010) Insights Gained from 20 years of soy research. *J Nutr* 140:2289S-2295S.

- Meydani** SN, Meydani M, Verdon CP, Shapiro AA, Blumberg JB, Hayes KC (1986) Vitamin E supplementation suppresses prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis and enhances the immune response of aged mice. *Mech Ageing Dev* 34:191-201.
- Miki** N, Ono M, Murata Y, Tamitsu K, Ri T, Demura H, Yamada M (1995) Thyroid hormone regulation of gene expression of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 217: 1087-1093.
- Miller** TL, Mayo KE (1997) Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 138: 2458-2465.
- Miller** TL, Godfrey PA, Dealmeida VI, Mayo KE (1999) The rat growth hormone-releasing hormone receptor gene: structure, regulation, and generation of receptor isoforms with different signaling properties. *Endocrinology* 140: 4152-4165.
- Miura** J, Yamagishi Si, Uchigata Y, Takeuchi M, Yamamoto H, Makita Z, Iwamoto Y (2003) Serum levels of non-carboxymethyllysine advanced glycation endproducts are correlated to severity of microvascular complications in patients with Type 1 diabetes. *J Diabetes Complications* 17:16-21.
- Moller** C, Arner P, Sonnenfeld T, Norstedt G (1991) Quantitative comparison of insulin-like growth factor mRNA levels in human and rat tissues analysed by a solution hybridization assay. *J Mol Endocrinol* 7:213-222.
- Moller** N, Jorgensen JOL (2009) Effects of Growth Hormone on Glucose, Lipid, and Protein Metabolism in Human Subjects. *Endocrine Rev* 30:152-177.
- Morel** G, Gallego R, Boulanger L, Pintos E, Garcia-Caballero T, Gaudreau P (1999) Restricted presence of the growth hormone-releasing hormone receptor to somatotropes in rat and human pituitaries. *Neuroendocrinology* 70: 128-136.
- Moretti** C, Bagnato A, Solan N, Frajese G, Catt KJ (1990) Receptor-mediated actions of growth hormone releasing factor on granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 127: 2117-26.
- Morimoto** N, Kawakami F, Makino S, Chihara K, Hasegawa M, Iyata Y (1988) Age-related changes in growth hormone releasing factor and somatostatin in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 47:459-464.
- Morrison** LD, Smith DD, Kish SJ (1996) Brain S-Adenosylmethionine Levels Are Severely Decreased in Alzheimer's Disease. *J Neurochem* 67:1328-1331.
- Motomura** T, Hashimoto K, Koga M, Arita N, Hayakawa T, Kishimoto T, Kasayama S (1998) Inhibition of signal transduction by a splice variant of the growth hormone-releasing hormone receptor expressed in human pituitary adenomas. *Metabolism* 47: 804-808.
- Moxley** RT, Arner P, Moss A, Skottner A, Fox M, James D, Livingston JN (1990) Acute effects of insulin-like growth factor I and insulin on glucose metabolism in vivo. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 259:E561-E567.

**Murao** K, Sato M, Mizobuchi M, Nimi M, Ishida T, Takahara J (1994) Acute effects of hypoglycemia and hyperglycemia on hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin gene expression in the rat. *Endocrinology* 134(1): 418-23.

**Nanzer** AM, Khalaf S, Mozid AM, Fowkes RC, Patel MV, Burrin JM, Grossman AB, Korbonits M (2004) Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Endocrinol* 151:233-240.

**Navarro** A, Boveris A (2004) Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol- Regul Integr Comp Physiol* 287:R1244-R1249.

**Navarro** A, Gomez C, Sanchez-Pino MaJs, Gonzalez HI, Bandez MJ, Boveris AD, Boveris A (2005) Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in aging male mice. *Am J Physiol- Regul Integr Comp Physiol* 289:R1392-R1399.

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

**Nishimune** H, Vasseur S, Wiese S, Birling MC, Holtmann B, Sendtner M, Iovanna JL, Henderson CE (2000) Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway. *Nat Cell Biol* 2:906-914.

**Nogami** H, Matsubara M, Harigaka T, Yatayama M, Kawamura K (2000) Retinoic acids and thyroid hormone act synergistically with dexamethasone to increase growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 141: 4396-4401.

**Nogami** H, Hiraoka Y, Matsubara M, Nonobe E, Harigaya T, Katayama M, Hemmi N, Kobayashi S, Mogi K, Aiso S, Kawamura K, Hisano S (2002) A composite hormone response element regulates transcription of the rat GHRH receptor gene. *Endocrinology* 143(4): 1318-26.

**Obal** F, Alfoldi P, Cady AB, Johannsen L, Sary G, Krueger JM (1988) Growth hormone-releasing factor enhances sleep in rats and rabbits. *Am J Physiol- Regul Integr Comp Physiol* 255:R310-R316.

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

**Obal** F, Floyd R, Kapas L, Bodosi B, Krueger JM (1996) Effects of systemic GHRH on sleep in intact and hypophysectomized rats. *Am J Physiol- Endocrinol Metab* 270:E230-E237.

**Obal F, Fang J, Taishi P, Kacs+lh B, Gardi J, Krueger JM (2001)** Deficiency of growth hormone-releasing hormone signaling is associated with sleep alterations in the dwarf rat. *J Neurosci* 21:2912-2918.

**Obal F, Alt J, Taishi P, Gardi J, Krueger JM (2003)** Sleep in mice with nonfunctional growth hormone-releasing hormone receptors. *Am J Physiol- Regul Integr Comp Physiol* 284:R131-R139.

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

**Olchovsky D, Bruno JF, Wood TL, Gelato MC, Leidy JW, Gilbert JM, Berelowitz M (1990)** Altered pituitary growth hormone (GH) regulation in streptozotocin-diabetic rats: a combined defect of hypothalamic somatostatin and GH-releasing factor. *Endocrinology* 126: 53-61.

**Olias G, Viollet C+, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W (2004)** Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem* 89:1057-1091.

**Ono M, Miki N, Murata Y, Osaki E, Tamitsu K, Ri T, Yamada M, Demura H (1995)** Sexually dimorphic expression of pituitary growth hormone-releasing factor receptor in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 216: 1060-1066.

**Ortiz EM, Dusetti NJ, Vasseur S, Malka D, Bodeker H, Dagorn J, Iovanna JL. (1998)** The pancreatitis-associated protein is induced by free radicals in AR4-2J cells and confers cell resistance to apoptosis. *Gastroenterology* 114: 808-816.

**Osterstock G, Escobar P, Mitutsova V, Gouty-Colomer LA, Fontanaud P, Molino F, Fehrentz JA, Carmignac D, Martinez J, Guerineau NC, Robinson ICAF, Mollard P, Méry PF (2010)** Ghrelin Stimulation of Growth Hormone-Releasing Hormone Neurons Is Direct in the Arcuate Nucleus. *PLoS ONE* 5:e9159.

**Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A, Panetta R, Srikant CB (1994)** All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 198:605-612.

**Patel YC (1999)** Somatostatin and Its Receptor Family. *Front Neuroendocrinol* 20:157-198.

**Pazos F, Sánchez-Franco F, Balsa J, Escalada J, Cacicedo L (2004)** Differential regulation of gonadotropins and glycoprotein hormone alpha-subunit by IGF-I in anterior pituitary cells from male rats. *J Endocrinol Invest* 27: 670-5.

**Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F (2010)** The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol* 205:201-210.

- Peterfi** Z, McGinty D, Sarai E, Szymusiak R (2010) Growth hormone-releasing hormone activates sleep regulatory neurons of the rat preoptic hypothalamus. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 298:R147-R156.
- Petersenn** S, Rasch AC, Heyens M, Schulte HM (1998) Structure and regulation of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Mol Endocrinol* 12: 233-247.
- Petersenn** S, Schulte HM (2000) Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. *Vitam.Horm* 59: 35-69.
- Petersenn** S, Rasch AC, Peshorn M, Beil FU, Schulte HM (2001) Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 142:2649-2659.
- Poitout** V, Robertson RP (2002) Minireview: secondary beta-cell failure in type 2 diabetes - a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143: 339-342.
- Poitout** V, Robertson RP (2008) Glucolipotoxicity: Fuel excess and  $\beta$ -Cell dysfunction. *Endocrine Reviews* 29:351-366.
- Poitout** V, Amyot J, Semache M, Zarrouki B, Hagman D, Fontés G (2010) Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim Biophys Acta- Mol Cell Biol Lipids* 1801:289-298.
- Pombo** CM, Zalvide J, Gaylinn BD, Dieguez C (2000) Growth hormone-releasing hormone stimulates mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 141: 2113-2119. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5093-5098.
- Prolla** TA (2002) DNA microarray analysis of the aging brain. *Chem Senses* 27(3):299-306.
- Qian** X, Kulig E, Jin L, Lloyd RV (1998) Expression of D-type cyclins in normal and neoplastic rat pituitary. *Endocrinology* 139:2058-2067.
- Rajaram** S, Baylink DJ, Mohan S (1997) Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 18:801-831.
- Rao** G, Xia E, Nadakavukaren MJ, Richardson A (1990) Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. *J Nutr* 120(6): 602-609.
- Rattan** SIS (2006) Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals. *Free Radic Res* 40:1230-1238.
- Redman** LM, Heilbronn LK, Martin CK, Alfonso A, Smith SR, Ravussin E; Pennington CALERIE Team (2007) Effect of calorie restriction with or without exercise on body composition and fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 92(3):865-72.
- Renier** G, Abribat T, Brazeau P, Deslauriers N, Gaudreau P (1990) Cellular mechanism of caprylic acid-induced growth hormone suppression. *Metabolism* 39:1108-1112.

- Renier G, Serri O (1991)** Effects of acute and prolonged glucose excess on growth hormone release by cultured rat anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 54: 521-5.
- Rettori V, Milenkovic L, Beutler BA, McCann SM (1989)** Hypothalamic action of cachectin to alter pituitary hormone release. *Brain Res Bull* 23: 471-475.
- Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W (1982)** Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature* 300: 276-8.
- 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.
- Roberts CT Jr, Brown AL, Graham DE, Seelig S, Berry S, Gabbay KH, Rechler MM (1986)** Growth hormone regulates the abundance of insulin-like growth factor I RNA in adult rat liver. *J Biol Chem* 261(22):10025-8.
- Robertson RP (2004)** Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 279: 42351-42354.
- Robertson RP, Harmon JS (2006)** Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radic Biol Med* 41: 177-84.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, Patel YC (2000)** Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 275:7862-7869.
- Rosca MG, Lemieux H, Hoppel CL (2009)** Mitochondria in the elderly: Is acetylcarnitine a rejuvenator? *Adv Drug Deliv Rev* 61:1332-1342.
- Sacks FM, Lichtenstein A, Van Horn L, Harris W, Kris-Etherton P, Winston M, for the American Heart Association Nutrition Committee (2006)** Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association science advisory for professionals from the nutrition committee. *Circulation* 113:1034-1044.
- Sarret P, Nouel D, Dal Farra C, Vincent JP, Beaudet A, Mazella J (1999)** Receptor-mediated internalization is critical for the inhibition of the expression of growth hormone by somatostatin in the pituitary cell line AtT-20. *J Biol Chem* 274: 19294-300.
- Sato M, Frohman LA (1993)** Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats. *Endocrinology* 133: 793-799.
- Schedlich LJ, Le Page SL, Firth SM, Briggs LJ, Jans DA, Baxter RC (2000)** Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin beta subunit. *J Biol Chem* 275: 23462-23470.



**Schumacher B** (2009) Transcription-blocking DNA damage in aging: a mechanism for hormesis. *BioEssays* 31:1347-1356.

**Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA.** (2007) A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 18: 567-579.

**Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L** (2010) Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A: Biol Sci Med Sci* 65A:963-975.

**Senaris RM, Lago F, Lewis MD, Dominguez F, Scanlon MF, Dieguez C** (1992) Differential effects of in vivo estrogen administration on hypothalamic growth hormone releasing hormone and somatostatin gene expression. *Neurosci.Lett* 141: 123-126.

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

**Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM** (2009) Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta – Gen Subj* 1790:1149-1160.

**Sheppard MS, Bala RM** (1986) Insulin-like growth-factor inhibition of growth-hormone secretion. *Can J Physiol Pharmacol* 64:525-530.

**Shibasaki T, Kiyosawa Y, Masuda A, Nakahara M, Imaki T, Wakabayashi I, Demura H, Shizume K, Ling N** (1984) Distribution of growth hormone-releasing hormone-like immunoreactivity in human tissue extracts. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 263-8.

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

**Shimokawa I, Higami Y, Okimoto T, Tomita M, Ikeda T** (1996) Effects of lifelong dietary restriction on somatotropes: immunohistochemical and functional aspects. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 51: B396-402.

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

**Shimokawa I, Chiba T, Yamaza H, Komatsu T** (2008) Longevity genes: insights from calorie restriction and genetic longevity models. *Mol Cells* 26: 427-35.

**Shimon I, Taylor JE, Dong JZ, Bitonte RA, Kim S, Morgan B, Coy DH, Culler MD, Melmed S** (1997) Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation. *J Clin Invest* 99:789-798.

- Siejka A**, Schally A, Barabutis N (2010) Activation of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 pathway by growth hormone-releasing hormone. *Cell Mol Life Sci* 67:959-964.
- Sohal RS**, Agarwal S, Candas M, Forster MJ, Lal H (1994) Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech Ageing Dev* 76:215-224.
- Sohal RS**, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273:59-63.
- Sonntag WE**, Steger RW, Forman LJ, Meites J (1980) Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology* 107(6): 1875-9.
- Sonntag WE**, Boyd RL, Booze RM (1990) Somatostatin gene expression in hypothalamus and cortex of aging male rats. *Neurobiol Aging* 11:409-416.
- Spadafranca A**, Erba D, Foti P, Testolin G (2008) The consumption of soy products positively affects DNA resistance to oxidative stress in healthy subjects. *Nutr metab cardiovasc dis* 8 : e45-e46.
- Spagnoli A**, Torello M, Nagalla SR, Horton WA, Pattee P, Hwa V, Chiarelli F, Roberts CT Jr, Rosenfeld RG (2002) Identification of STAT-1 as a molecular target of IGFBP-3 in the process of chondrogenesis. *J Biol Chem* 277: 18860-18867.
- Spatola E**, Peskovitch OH, Marsh K, Johnson NB, Berry SA, Gelato MC (1991) Interraction of growth hormone-releasing hormone with the insulin-like growth-factors during prenatal development in the rat. *Endocrinology* 129: 1193-1200.
- Spiess J**, Rivier J, Vale W (1983) Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature* 303: 532-535.
- Srivastava CH**, Breyer PR, Rothrock JK, Peredo MJ, Pescovitz OH (1993) A new target for growth hormone releasing-hormone action in rat: the Sertoli cell. *Endocrinology* 133: 1478-1481.
- Steiger A**, Dresler M, Schüssler P, Kluge M (2011) Ghrelin in mental health, sleep, memory. *Mol Cell Endocrinol* 340(1):88-96.
- Straus DS**, Takemoto CD (1990) Effect of fasting on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone receptor mRNA levels and IGF-1 gene transcription in rat liver. *Mol Endocrinol* 4:91-100.
- Strowski MZ**, Kohler M, Chen HY, Trumbauer ME, Li Z, Szalkowski D, Gopal-Truter S, Fisher JK, Schaeffer JM, Blake AD, Zhang BB, Wilkinson HA (2003) Somatostatin receptor subtype 5 regulates insulin secretion and glucose homeostasis. *Mol Endocrinol* 17:93-106.
- Stuart JA**, Brown MF (2006) Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1757:79-89.

- Sugihara** H, Emoto N, Tamura H, Kamegai J, Shibasaki T, Minami S, Wakabayashi I (1999) Effect of insulin-like growth factor-I on growth hormone-releasing factor receptor expression in primary rat anterior pituitary cell culture. *Neurosci Lett.* 276(2): 87-90.
- Suhr** ST, Rahal JO, Mayo KE (1989) Mouse growth-hormone-releasing hormone: precursor structure and expression in brain and placenta. *Mol Endocrinol* 3(11): 1693-700.
- Taishi** P, De A, Alt J, Gardi J, Obal F Jr, Krueger JM (2004) Interleukin-1beta stimulates growth hormone-releasing hormone receptor mRNA expression in the rat hypothalamus in vitro and in vivo. *J Neuroendocrinol* 16: 113-8.
- Takahashi** S, Kajikawa M, Umezawa T, Takahashi SI, Kato H, Miura Y, Nam TJ, Noguchi T, Naito H (1990) Effect of dietary proteins on the plasma immunoreactive insulin-like growth factor-1/somatomedin C concentration in the rat. *Br J Nutr* 63:521-534.
- Takahashi** T, Okimura Y, Yoshimura K, Shigeyoshi Y, Kaji H, Abe H, Chihara K (1995) Regional distribution of growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor mRNA in the rat brain. *Endocrinology* 136(10): 4721-4.
- Takahashi** Y, Kipnis DM, Daughaday WH (1968) Growth hormone secretion during sleep. *J Clin Invest* 47(9): 2079-90.
- Tamura** H, Kamegai J, Sugihara H, Kineman RD, Frohman LA, Wakabayashi I (2000) Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone secretagogue receptor gene expression. *J Neuroendocrinol* 12(6):481-5.
- Tanaka** Y, Egawa M, Inoue S, Takamura Y (1991) Effect of hypothalamic administration of growth hormone-releasing factor (GRF) of feeding behavior in rats. *Brain Res* 558(2): 273-9.
- Tang** J, Lagace G, Castagne J, Collu R (1995) Identification of human growth hormone-releasing hormone receptor splicing variants. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 2381-2387.
- Tannenbaum** GS, Martin JB (1976) Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 98(3): 562-70.
- Tannenbaum** GS (1980) Evidence for autoregulation of growth hormone secretion via the central nervous system. *Endocrinology* 107:2117-2120.
- Tannenbaum** GS (1981) Growth hormone secretory dynamics in streptozotocin diabetes: evidence of a role for endogenous circulating somatostatin. *Endocrinology* 108: 76-82.
- 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, Epelbaum J, Bowers CY (2003) Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 144:967-974.

**Tanner JW**, Davis SK, McArthur NH, French JT, Welsh TH (1990) Modulation of growth hormone (GH) secretion and GH mRNA levels by GH-releasing factor, somatostatin and secretagogues in cultured bovine adenohypophysial cells. *J Endocrinol* 125:109-115.

**Taylor A**, Hobbs M (2001) The 2001 assessment of nutritional influences on risk for cataract. *Nutrition* 17:845-857.

**Thissen JP**, Triest S, Maes M, Underwood LE, Ketelslegers JM (1990) The decreased plasma concentration of insulin-like growth factor-I in protein-restricted rats is not due to decreased numbers of growth hormone receptors on isolated hepatocytes. *J Endocrinol* 124:159-165.

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

**Tsagarakis S**, Ge F, Besser GM, Grossman A (1991) Similar high molecular weight forms of growth hormone-releasing hormone are found in rat brain and testis. *Life Sci* 49:1627-1634.

**Tyrell, JB.**, Findling, J.W., and Aron, D.C (1994) Hypothalamus and pituitary, In F.S, Greenspan and J.D Baxter, eds., *Basic and clinical Endocrinology*, East Norwalk, Appleton and Lange, pp.64-127.

**Ullrich A**, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E et al., (1986) Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5: 2503-2512.

**Unterman TG**, Jentel JJ, Oehler DT, Lacson RG, Hofert JF (1993) Effects of glucocorticoids on circulating levels and hepatic expression of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins and IGF-I in the adrenalectomized streptozotocin-diabetic rat. *Endocrinology* 133:2531-2539.

**Vaccarino FJ**, Feifel D, Rivier J, Vale W (1991) Antagonism of central growth hormone-releasing factor activity selectively attenuates dark-onset feeding in rats. *J Neurosci* 11: 3924-3927.

**Vahl N**, Jorgensen JO, Jurik AG, Christiansen JS (1996) Abdominal adiposity and physical fitness are major determinants of the age associated decline in stimulated GH secretion in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2209-2215.

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

**Van Vught AJ**, Nieuwenhuizen AG, Brummer RJ, Westerterp-Plantenga MS (2008) Somatotropic responses to soy protein alone and as part of a meal. *Eur J Endocrinol* 159:15-18.

- Vardatsikos G, Sahu A, Srivastava AK (2008)** The insulin-like growth factor family: molecular mechanisms, redox regulation, and clinical implications. *Antioxid Redox Signal* 11:1165-1190.
- Velasco B, Cacicedo L, Escalada J, Lopez-Fernandez J, Sanchez-Franco F (1998)** Growth hormone gene expression and secretion in aging rats is age dependent and not age-associated weight increase related. *Endocrinology* 139:1314-1320.
- Velasquez MT, Bhathena SJ (2007)** Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci* 4:72-82.
- Veldhuis JD (2000)** Recent neuroendocrine facets of male reproductive aging. *Exp Gerontol* 35:1281-1308.
- Veldhuis JD, Bowers CY (2003)** Human GH pulsatility: an ensemble property regulated by age and gender. *J Endocrinol Invest* 26(9): 799-813.
- Veldhuis JD, Bowers CY (2010)** Integrating GHS into the Ghrelin System. *Int J Pept* 2010: PMID: 20798846.
- Velloso CP (2008)** Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *Br J Pharmacol* 154:557-568.
- Veyrat-Durebex C, Gaudreau P, Boghossian S, Alliot J (2001)** Effects of peripheral and central administration of GHRH on feeding in aging LOU rats. *Peptides* 22: 2119-26.
- Veyrat-Durebex C, Pomerleau L, Langlois D, Gaudreau P (2005)** Internalization and trafficking of the human and rat growth hormone-releasing hormone receptor. *J Cell Physiol* 203: 335-344.
- Vincent AM, Feldman EL (2002)** Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Hormone & IGF Research* 12:193-197.
- Viollet C, Lepousez G, Loudes C, Videau C, Simon A, Epelbaum J (2008)** Somatostatinergic systems in brain: Networks and functions. *Molecular and Cellular Endocrinology* 286:75-87.
- Visser-Wisselaar HA, van Uffelen CJC, van Koetsveld PM, Lichtenauer-Kaligis EGR, Waaijers AM, Uitterlinden P, Mooy DM, Lamberts SWJ, Hofland LJ (1997)** 17-beta-Estradiol-Dependent Regulation of Somatostatin Receptor Subtype Expression in the 7315b Prolactin Secreting Rat Pituitary Tumor in Vitro and in Vivo. *Endocrinology* 138:1180-1189.
- Wajnrach MP, Chua SC, Green ED, Leibel RL (1994)** Human growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) maps to a YAC at chromosome 7p15. *Mamm Genome* 5: 595.
- Weinert BT, Timiras PS (2003)** Invited Review: Theories of aging. *J Appl Physiol* 95:1706-1716.

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

**Woodhouse LJ, Mukherjee A, Shalet SM, Ezzat S (2006)** The influence of growth hormone status on physical impairments, functional limitations, and health-related quality of life in adults. *Endocrine Rev* 27:287-317.

**Xu Y, Berelowitz M, Bruno JF (1995)** Dexamethasone regulates somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in rat pituitary GH4C1 cells. *Endocrinology* 136:5070-5075.

**Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D (1999)** Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7324-7329.

**Yamada PM, Lee KW (2009)** Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic action. *Am J Physiol- Cell Physiol* 296:C954-C976.

**Yamamoto T, Katsumata N, Tachibana K, Friesen HG, Nagy JI (1992)** Distribution of a novel peptide in the anterior pituitary, gastric pyloric gland, and pancreatic islets of rat. *J Histochem Cytochem* 40:221-229.

**Yamanaka Y, Fowlkes JL, Wilson EM, Rosenfeld RG, Oh Y (1999)** Characterization of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) binding to human breast cancer cells: kinetics of IGFBP-3 binding and identification of receptor binding domain on the IGFBP-3 molecule. *Endocrinology* 140: 1319-1328.

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

**Yokote R, Sato M, Matsubara S, Ohye H, Niimi M, Murao K, Takahara J (1998)** Molecular cloning and gene expression of growth hormone-releasing peptide receptor in rat tissues. *Peptides* 19:15-20.

**Yokoya SU, Friesen HG (1986)** Human growth hormone (gh)-releasing factor stimulates and somatostatin inhibits the release of rat gh variants. *Endocrinology* 119:2097-2105.

**Yu BP (1996)** Aging and oxidative stress: Modulation by dietary restriction. *Free Rad Biol Med* 21:651-668.

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

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

**Zeitler** P, Stevens P, Siriwardana G (1998) Functional GHRH receptor carboxyl terminal isoforms in normal and dwarf (dw) rats. *J Mol Endocrinol* 21: 363-371.

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

**Zhang** YW, Ding LS, Lai MD (2003) Reg gene family and human diseases. *World J Gastroenterol* 9: 2635-41.

### **Références électroniques:**

Statistique Canada: [www.statcan.gc.ca](http://www.statcan.gc.ca)

The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Nutrition et alimentation, Santé et services sociaux du gouvernement du Québec :  
<http://www.msss.gouv.qc.ca>