



HAL
open science

L'hormone de croissance : une cytokine

Mireille Raccurt

► **To cite this version:**

Mireille Raccurt. L'hormone de croissance : une cytokine. Physiologie [q-bio.TO]. Ecole pratique des hautes études - EPHE PARIS, 2003. Français. NNT : . tel-00069301

HAL Id: tel-00069301

<https://theses.hal.science/tel-00069301>

Submitted on 17 May 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la Vie

Présentée et soutenue publiquement le 28 Avril 2003

par

Mireille RACCURT – PINARD

pour l'obtention du grade de Docteur de l'École Pratique des Hautes Études

L'HORMONE DE CROISSANCE : UNE CYTOKINE

Devant le jury suivant : Pr. Robert Garonne
Pr. Peter Lobie (Rapporteur)
Pr. Tomas Garcia-Caballero (Rapporteur)
Pr. Jean Marie Exbrayat
Dr. Gérard Morel (Directeur scientifique)

Directeur de Thèse EPHE : Pr. Jean Marie Exbrayat
Laboratoire de reproduction et développement des vertébrés, 25 rue du Plat, 69002 LYON

2.5.2 - <i>Localisation cellulaire</i>	41
2.6 - Formation du complexe GH-(GHR) ₂	42
3 - Internalisation du complexe GH-(GHR)₂	43
3.1 - La voie des vésicules à clathrine	44
3.2 - La voie des caveolae	47
3.3 - La translocation nucléaire	49
3.4 - Le système ubiquitine-protéasome, passage obligé	52
4 - La transduction du signal	54
4.1 - Les Janus kinases	54
4.1.1 – <i>Structure</i>	54
4.1.2 - <i>Janus kinases et signalisation induite par la GH</i>	56
4.2 - Activation de la voie des MAPK « Ras-Mitogen-Activated Protein kinase »	57
4.3 - La voie des IRS-1, -2, -3 « Insulin receptor substrates » et de la PI-3 kinase « phosphatidylinositol-3'-kinase »	59
4.4 - La voie de la protéine kinase C (PKC)	62
4.5 - Activation des protéines STAT « signal transducer and activator of transcription ».	63
4.5.1 - <i>La famille des STAT</i>	64
4.5.2 - <i>La voie de signalisation JAK-STAT</i>	65
4.5.3 - <i>Les STAT et l'oncogénèse</i>	67
4.5.4 - <i>Le transport nucléo-cytoplasmique des protéines STAT</i>	68
4.5.5 - <i>Régulation négative des STAT</i>	69
5 - De l'hormone à la cytokine	70
5.1 - Rôle physiologique de la GH	70
5.1.1 - <i>Action indirecte</i>	70
5.1.2 - <i>Action directe</i>	72
5.1.3 - <i>Action locale</i>	73
5.1.3.1 - GH et système immunitaire	74
5.1.3.2 - GH et système nerveux central	75
5.1.3.3 - GH et odontogénèse	76
5.1.3.4 - GH et système reproducteur	76
5.1.3.5 - GH et glande mammaire	77
5.1.4 - <i>Les minihypophyses, hypothèse de régulation locale</i>	77
5.2 - GH et progression tumoral	78
5.2.1 - <i>GH « endocrine »</i>	78
5.2.1.1 - Action indirecte	78
5.2.1.2 - Action directe	80

5.2.2 - GH « autocrine »	82
5.2.2.1 - Mise en évidence dans la glande mammaire pathologique	82
5.2.2.2 - Induction de sa synthèse mammaire par les progestatifs	82
5.2.2.3 - Ses effets, modélisation <i>in vitro</i>	83
5.2.2.4 - Son mécanisme d'action	85
5.2.2.5 - Sa régulation locale	87
6 - Régulation négative du signal induit par les cytokines	89
6.1 - Découverte de la famille des protéines SOCS	89
6.2 - Mécanisme d'action	91
6.3 - Profil d'expression des SOCS	94
6.4 - Contribution des modèles animaux	96
III – OBJECTIFS	99
IV – RESULTATS	100
Publication N° 1 : Prenatal and adult growth hormone gene expression in rat lymphoid organs.	100
Publication N° 2 : High stromal and epithelial human GH gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland.	109
Publication N° 3 : Nuclear translocation and retention of growth hormone.	122
Publication N° 4 : SOCS gene expression is elevated in breast carcinoma.	161
Résultats préliminaires	
Publication N° 5 : Growth hormone preferentially induces CIS and SOCS-3 expression in cancer cell lines	201
V - DISCUSSION ET PERSPECTIVES	216
VI – CONCLUSIONS	230
VII – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	231
VI – ANNEXES	272
Les principales techniques utilisées :	
Publication N° 6 : Méthodes de visualisation / Niveaux d'expression. Application à l'hormone de croissance et son récepteur.	
Livre : PCR / RT-PCR <i>in situ</i> . Light and electron microscopy	
Liste des communications personnelles	

Abréviations

ALS	« Acid Labile Subunit »
AP-2	« Activator protein-2 »
ATF-2	« Activator of Transcription Factor-2 »
Bcl-2	« B cell leukemia-2»
Bcl-xl	« B cell leukemia-xl»
CAT	« Chloramphenicol Acetyl Transferase »
Cbl	« Cobalamin »
CHO	« Chinese Hamster Ovary »
CHO	« Chinese Hamster Ovary »
CHOP	« C/EBP Homologous Protein »
CIN85	« Cbl interacting protein of 85 kDa ».
CIS	« Cytokine-Inducible SH2-containing protein »
CNTFR	Récepteur du « Ciliary Neutrophic Factor »
CREB	« cAMP Response Element Binding Protein »
CS-A	« chorionic somatomammotropin A gene »
CS-B	« chorionic somatomammotropin B gene»
Cs-L	« chorionic somatomammotropin-like gene»
DAG	diacylglycerol
EGF	« Epidermal Growth Factor »
EPOR	Récepteur de l'Erythropoïétine
ER	« Estrogen Receptor »
FAK	« Focal Adhesion protein Kinase »
FFA	« Free fatty acids »
G-CSFR	Récepteur du « Granulocyte Colony Stimulating Factor »
GEF	« Guanine nucleotide Exchange Factor »
GH	« Growth hormone »
GHBP	« Growth Hormone Binding Protein »
GH-N	« Growth Hormone Normal gene » ou vraie GH
GHR	Récepteur de l'hormone de croissance
GHRH	« Growth Hormone-Releasing Hormone »
GLE	« Gas Like Element »
GM-CSFR	Récepteur du « Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor »
GR	« Glucocorticoid hormone-receptor complex »
Grb2	« Growth factor Receptor-Binding protein 2 »
GRF	« Growth Hormone-Releasing Factor »
HSP	« Heat Shock Proteins »
IFN- γ	interféron- γ
IFN- α R	Récepteur de l'interféron- α
IFN- γ R	Récepteur de l'interféron- γ
IGF-I	« Insulin Growth factor-I »
IGF-II	« Insulin Growth factor-I I »
IP3	Inositol 1, 4, 5 triphosphate
IRS	« Insulin Receptor Substrates »
JAK	« Janus protein-Tyrosine Kinase »
JH	« JAK homology »
Kaps	Karyopherines
KIR	« Kinase Inhibitory Region »
l'EGFR	« Epidermal Growth Factor Receptor »
LIF	« Leukemia Inhibitory Factor »
LIFR	Récepteur de la chaîne β du « Leukemia Inhibitory Factor »
MAPK p44/42	« Extracellular Signal-regulated Kinases » ou ERK
MAPK	« Mitogen Activated Protein Kinases »
MPA	Acétate de médroxyprogestérone
NES	« Nuclear Export Sequence »
NF-1	« Nuclear factor-1 »
NGFR	Récepteur du « Nerve Growth Factor »
NLS	« Nuclear Localization Sequence »
PDGF	« Platelet Derived Growth Factor »

PI-3 K	« Phosphatidylinositol-3 ^o -kinase »
PIAS	« Protein Inhibitors of Activated STATs »
PIT-1	« Pituitary transcription factor-1 »
PKA	« Protéin Kinase A »
PKC	« Protein Kinase C »
PL	Hormone Lactogène Placentaire
PLA ₂	« Phospholipase A ₂ »
PR	« Progesteron Receptor »
PRE	« Progesterone Response Element »
PRE/GRE	« Progesterone/Glucocorticoïd Response Element »
PRL	Prolactine
PRLR	Récepteur de la PRL
PSA	« Prostatic Specific Antigen »
PTB	« PhosphoTyrosine Binding »
PTGFβ	« Placental Transforming Growth Factor β»
PTP1B	« protein-tyrosine phosphatase 1B »
Ran	« Ras-related Nuclear Protein »
RanGAP	« Ran GTPase-Activating Protein »
Ras-MAPK	« Ras-Mitogen-Activated Protein kinase »
Rbx-1	« Ring box protein-1 »
SAPKS	« Stress Activated Protein Kinases »
SH2	« Src-Homology 2 »
SH2-B	« Src Homoly 2-B »
SH3	« Src-Homology 3 »
SHP-1	« SH2 domain containing protein Phosphatase 1 »
SHP1	« SH2-containing phosphatase 1 »
SHP2	« SH2-containing phosphatase 2 »
SIE	« SIS-inducible element »
SOCS	« Suppressor of Cytokine Signalling »
Sos	« Son Of Sevenless »
SP-1	« Somatotropin promoteur-1 »
Spi 2.1	« Serine Protease Inhibitor 2.1 »
<i>spi</i>	« serine protease inhibiteur »
SPI-GLE1-CAT	« Chloranphenicol Acetyl Transférase »
SRIF	« GH-Release-Inhibiting Factor »
SSI	« STAT induced STAT inhibitory-1 »
STAT	« Signal Transducer and Activator of Transcription »
T ₃	Tri-iodothyronine
TACE	« Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme »
TC45	« T Cell 45 » tyrosine phosphatase nucléaire »
TCF	« Ternary Complex Factor »
TGFβ	« Transforming Growth Factor »
TNFR	Récepteur du « Tumor Necrosis Factor »
TPOR	Récepteur de la Thrombopoïétine
TRE	« Thyroid hormone response element »
TRE	« Thyroïd hormone Response Elements »
Tyk2	Tyrosine kinase 2
UbE	« Ubiquitin-dependent Endocytosis »
U-P	« ubiquitin-protéasome »
USF	« Upstream stimulating region »
VEGF	« Vascular Epithelial growth factor »

I – INTRODUCTION

Depuis, 1991, date à laquelle Weigent et Blalock ont mis en évidence une synthèse ectopique d'hormone de croissance (GH) dans les organes immunitaires du rat adulte, les travaux se sont orientés vers une nouvelle biologie de l'hormone. Ainsi, un certain nombre de tissus incluant, le cerveau (Gossard *et al.* 1987, Harvey *et al.* 1993), les organes reproducteurs (Nguyen *et al.* 1996, Untergasser *et al.* 1996) et la glande mammaire (Selman *et al.* 1994, Mol *et al.* 1995a, 1996) sont considérés maintenant comme des unités autonomes de synthèse, de régulation et d'action de la GH « autocrine ». Nous ne sommes donc plus en présence d'une hormone classiquement reconnue pour ses effets sur la croissance postnatale mais d'une véritable cytokine (Waters *et al.* 1999) qui, synthétisée en faible quantité sur son lieu d'action exerce des effets pleiotropiques de type autocrine / paracrine. Sa liaison sur son récepteur membranaire (GHR) déclenche la transduction du signal faisant intervenir les voies de signalisation JAK/STAT et des MAP kinases. Elle apparaît dès lors comme un régulateur majeur de la réponse locale à une situation particulière provoquant une stimulation ou une inhibition d'événements cellulaires qui vont orienter les voies de signalisation vers les processus de prolifération, de survie et de mobilité cellulaire. C'est sous cet angle que nous avons considéré la GH extra-hypophysaire dans ce travail.

Après une revue bibliographique ciblée sur les travaux qui ont fait évoluer son concept de simple hormone à celui de cytokine, nos résultats seront présentés sous forme d'articles, organisés selon trois axes de recherche.

Dans un premier temps il nous a paru nécessaire de *visualiser et caractériser les cellules responsables de la synthèse ectopique de GH* par la mise au point de la technique de RT-PCR *in situ*. Deux situations particulières nous ont intéressés, le système immunitaire du rat adulte et du fœtus de rat de 18 jours, dont la croissance est alors indépendante de la sécrétion fœtale et maternelle de GH hypophysaire et la prolifération cellulaire tumorale accompagnée de la réaction stromale dans le carcinome canalaire mammaire humain. Dans ce dernier cas, nous montrerons comment la GH, hormone mammothrophique intervenant dans le développement normal de la glande mammaire, peut être associée à l'invasion tumorale, lorsqu'elle est synthétisée localement.

Nous présenterons ensuite nos travaux concernant le *mécanisme d'action de la GH*. Considérant que le trafic intracellulaire et la translocation nucléaire de la GH sont d'une

importance majeure pour sa réponse biologique, nous avons suivi *l'internalisation du complexe GH – GHR* dans un modèle de cellules transfectées avec le GHR entier ou délété.

Nous avons enfin abordé un des mécanismes intervenant dans *la régulation* de la synthèse de GH « autocrine » par l'étude de l'expression des protéines SOCS « Suppressor of Cytokine Signalling » et CIS « Cytokine-Inducible SH2-containing protein », responsables de la régulation négative du signal induit par les cytokines. Nous avons recherché leur expression, *in vivo*, dans les zones de prolifération tumorale du cancer de la glande mammaire où nous avons identifié la production de GH « autocrine » et *in vitro*, dans les lignées de cellules carcinomateuses mammaires et dans un modèle cellulaire surexprimant la GH, les cellules MCF-hGH.

Notre objectif final étant de mieux comprendre l'implication de la synthèse locale de GH en particulier dans le développement tumoral et de participer ainsi à la redéfinition de cette hormone multifonctionnelle.

II - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 - L'hormone de croissance (GH)

1.1 - Sa découverte

C'est en 1886 que Pierre Marie établit pour la première fois une relation entre la fonction « pituitaire » et une observation clinique d'acromégalie. Relation confirmée par la description du nanisme hypophysaire par Paltauf en 1891. Par la suite les expériences d'hypophysectomie et d'injections d'extraits hypophysaires chez le rat ou le chien ont permis d'abord à Cushing (1909 a, b, 1910, Crowe *et al.* 1910) puis à Evans et Long (1921), Smith (1927) d'établir un lien direct entre l'hypophyse et la stimulation de la croissance. Le premier test biologique d'appréciation des effets de ce facteur de croissance, initialement appelé somatotropine, a été imaginé par Evans en 1943 et baptisé : « test du cartilage épiphysaire tibial ». C'est par l'étude des réponses à ce test que Li et Evans aboutirent en 1945 à des extraits purifiés de GH bovine. L'obtention de GH humaine (hGH) purifiée et la première caractérisation biochimique de l'hormone furent annoncées par Li et Papkoff en 1956. La première séquence amino-acidique de la hGH fut présentée par Li, Liu et Dixon en 1966, ces auteurs la décrivaient alors comme une chaîne peptidique de 188 acides aminés. Après quelques retouches en 1969, le groupe de Li donna en 1971, la formule complète, aujourd'hui admise. La « vraie » hGH est une protéine de 22 kDa comportant 191 acides aminés.

Parallèlement, les premières tentatives de « colorations électives » avaient permis de découvrir l'étonnant polymorphisme des éléments antéhypophysaires et dès 1940 Romeis distinguait 5 catégories cellulaires différentes. Il faut attendre pourtant 1960 pour que Herlant déclare « la cytologie, l'histochoimie, l'histophysiologie et tout récemment la microscopie électronique concourent à démontrer qu'à chacune des hormones sécrétées correspond une forme spécifique de cellule ». Depuis, de nombreux travaux ont permis d'identifier et de caractériser les cellules somatotropes chez l'homme et de très nombreuses espèces (pour revue, Girod 1980, Horvath et Kovacs 1988). Elles constituent environ 40% des cellules antéhypophysaires chez le rat mâle adulte et 20% chez la femelle (Dada *et al.* 1984). Les études immunocytologiques en microscopie électronique ont montré l'hétérogénéité de ces cellules et trois sous-types sont décrits en fonction du diamètre des vésicules de sécrétion (Kurosumi *et al.* 1986).

Lors de la différenciation cellulaire de l'ébauche antéhypophysaire humaine, les cellules somatotropes apparaissent entre la 7^{ème} et la 8^{ème} semaine de la vie intra-utérine

(Bégeot 1976, Li *et al.* 1977). La hGH est dosable dès les 60-70^{ème} jours de la vie intra-utérine, son taux plasmatique d'abord faible, passe de 20 ng / mL à 80 ng / mL entre la 12^{ème} semaine et la 22^{ème} semaine de la grossesse puis baisse à 10 ng /mL à terme (Kaplan *et al.* 1976). Chez le rat, les cellules somatotropes sont identifiées par immunocytochimie au 19^{ème} jour de la gestation (Rieutort 1974; Chatelain *et al.* 1979) alors que l'expression du gène de la rGH peut être détectée dès le 18^{ème} jour de la gestation (Nogami *et al.* 1989).

1.2 - Son origine moléculaire

La GH présente de fortes homologues avec l'hormone lactogène placentaire (PL) puisqu'elles ont en commun 161 acides aminés (Martial *et al.* 1979). De plus, dans la chaîne des 197 acides aminés de la prolactine (PRL), 49 ont des positions identiques à ceux retrouvés dans la GH. Ces particularités biochimiques ont conduit à classer ces trois hormones dans une famille d'hormones polypeptidiques ayant une communauté d'origine au sens phylogénique du terme. Le clonage de leurs gènes respectifs a permis de confirmer que ces trois hormones proviennent probablement d'un même peptide ancestral (Niall *et al.* 1971, Wallis 1981). Il est communément admis que les gènes de la GH et de la PRL proviennent de la duplication d'un gène ancestral commun il y a 350-400 millions d'années, c'est à dire au tout début de l'évolution des vertébrés (Miller et Eberhardt 1983, Rand-Weaver *et al.* 1993). C'est une seconde duplication plus tardive, il y a 85-100 millions d'années, lors de l'évolution des mammifères et en particulier des primates, qui est à l'origine de la PL.

Ainsi chez l'homme, les gènes de la GH et de la PL ont chacun cinq exons et quatre introns et sont étroitement localisés sur le chromosome 17, alors que celui de la PRL (hPRL) est situé sur le chromosome 6 (Miller et Eberhardt 1983, Chen *et al.* 1989).

De nouveaux membres ont été proposés, selon leur caractéristiques structurales, pour rejoindre cette famille. Il s'agit de la proliférine de souris (mPLF) (Linzer *et al.* 1985), d'une protéine apparentée (mPRP), la PRL-like déciduale de rat (*rdecPRP*) (Roby *et al.* 1993) et la somatolactine (Ono *et al.* 1990).

1.3 - Son gène

Le gène de la hGH comporte environ 2600 nucléotides, il est situé sur le bras long du chromosome 17. Ce gène n'est qu'une partie d'un « *cluster* » couvrant 66500 bases et comprenant 5 gènes étroitement apparentés : le « Growth Hormone Normal gene » (*GH-N*) encore appelée vraie GH, le « chorionic somatomotropin-like gene » (*Cs-L*), le

« chorionic somatomammotropin A gene » (*CS-A*), le « chorionic somatomammotropin B gene » (*CS-B*) et le variant placentaire (*GH-V*) (Hirt *et al.* 1987) (**Figure 1**)

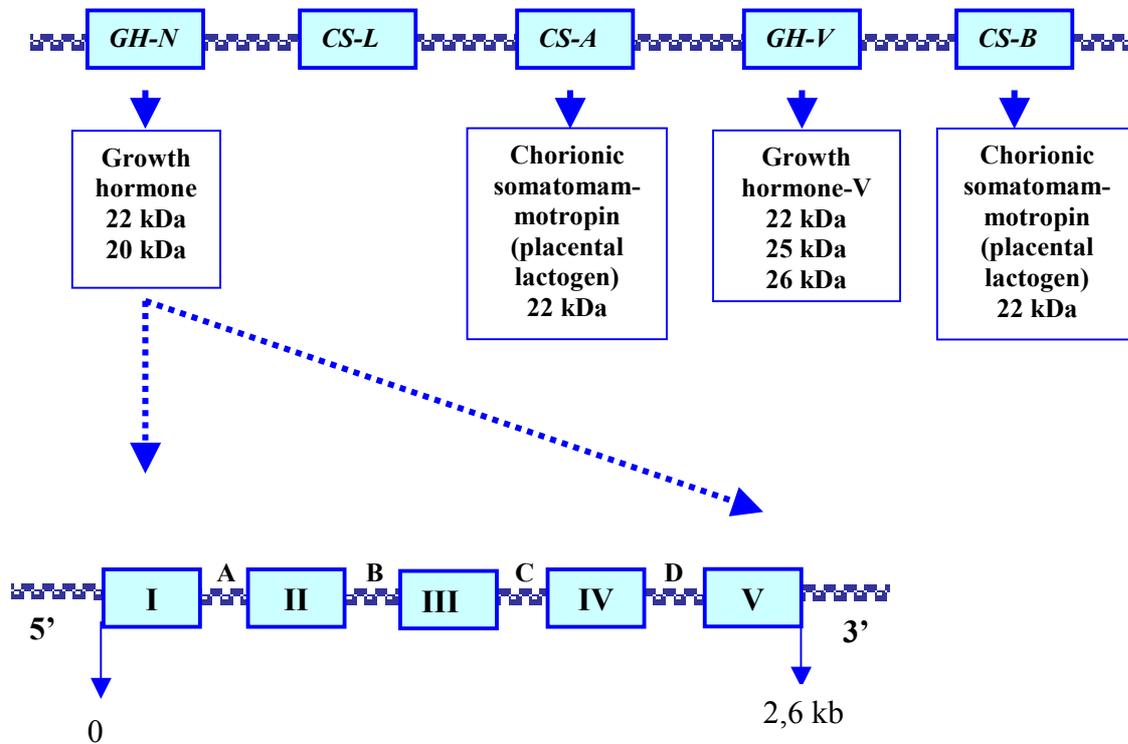


Figure 1 : Représentation schématique du « cluster » des gènes apparentés à l'hormone de croissance. Le gène de la GH a une longueur de 2,6 kb et comporte 5 exons (1 - V) et 4 introns (A - D).

Les séquences nucléotidiques de l'ADN complémentaire (ADNc) de la GH de différentes espèces, rat, poulet, porc, cheval... ont été clonées et la plupart ont été exprimées dans des bactéries (Goeddel *et al.* 1987, Martial *et al.* 1979, Miller *et al.* 1980, Seeburg *et al.* 1977, 1983). Le pourcentage d'homologies entre les séquences nucléotidiques de la GH humaine, bovine et de rat est d'environ 75 – 77%. Les GH ovine et bovine sont identiques à 99% et la comparaison des séquences de GH de rat et de souris à la séquence de GH bovine montre respectivement 95 et 92% d'homologies.

La séquence nucléotidique de l'ADNc de la rGH a été déterminée à partir d'extraits de cellules hypophysaires en culture (Seeburg *et al.* 1977). La longueur du fragment cloné est de 800 pb. Le gène de la rGH a une taille de 2,1 kb et comporte également 5 exons et 4 introns d'environ 200 pb chacun, hormis le second qui atteint une longueur de 720 pb (Chien et Thompson 1980, Page *et al.* 1981, Barta *et al.* 1981).

Le clonage de ces différents gènes explique l'hétérogénéité protéique des diverses formes de GH et protéines apparentées, il a également permis de caractériser de nombreux facteurs intervenant dans la régulation de la synthèse.

1.4 - Régulation transcriptionnelle

Le taux des ARNm codant pour la GH dans les cellules somatotropes est sous le contrôle de facteurs trans-activateurs ou trans-inhibiteurs venant se positionner sur les séquences en amont de site d'initiation de la transcription (Karin *et al.* 1990, Rousseau 1992, Theill et Karin 1993).

1.4.1 - Le facteur de transcription hypophysaire Pit-1 (ou Growth Hormone Factor 1, GHF-1)

Pit-1 est une protéine nucléaire à homéodomaine, de 33 kDa, indispensable à la différenciation hypophysaire, au développement des cellules somatotropes et à la transcription du gène *GH-N* humain et de rat (Castrillo *et al.* 1991). Elle se fixe sur deux régions spécifiques en amont du site d'initiation de la transcription (**Figure 2**). La fixation de Pit-1 sur ces deux sites active la transcription du gène *GH-N* alors qu'une mutation d'un seul site d'accrochage de Pit-1 entraîne son inhibition (Lefèvre *et al.* 1987). De même, les deux sites sont nécessaires à la fonctionnalité du promoteur dans des cellules somatotropes tumorales GH₃ et GC (Lira *et al.* 1993).

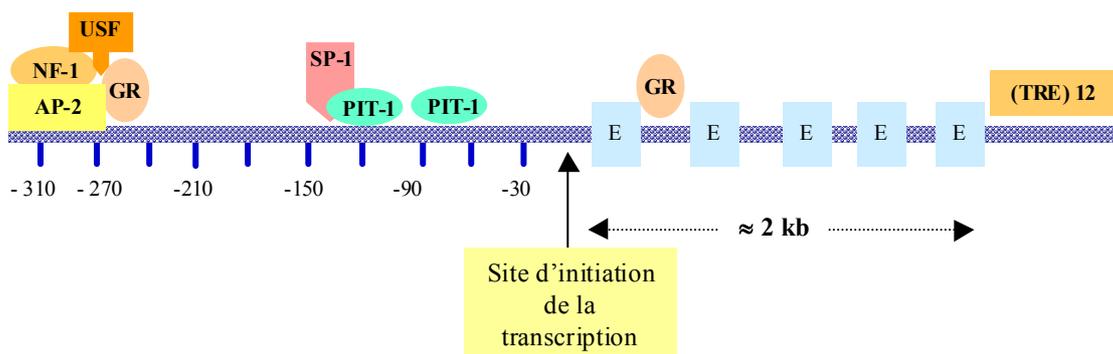


Figure 2 : Régulation transcriptionnelle du gène humain GH-N. AP-2 : « Activator protein-2 », NF-1 : « Nuclear factor-1 », USF : « Upstream stimulating region », SP-1 : « Somatotropin promoteur-1 », PIT-1 : « Pituitary transcription factor-1 », GR : « Glucocorticoid hormone-receptor complex », TRE : « Thyroid hormone response element ».

Un variant, Pit-1 β ou (GHF-2) a été isolé, il contient une séquence supplémentaire de 26 acides aminés et apparaît comme un puissant inducteur du gène de la GH bien qu'ayant perdu sa capacité à activer le promoteur de la prolactine (Konzak *et al.* 1992, Theill *et al.* 1992).

1.4.2 - Les facteurs de transcription ubiquitaires.

Ce sont des protéines qui participent à la transcription de nombreux gènes dans de multiples types cellulaires. Les sites d'accrochage des 4 facteurs de transcription principaux : SP-1, AP-2, NF-1 et USF ont été identifiés sur le gène de la GH dans sa partie 5' (**Figure 2**). SP-1 semble agir positivement sur le promoteur même s'il peut inhiber la liaison de Pit-1. Cette interaction reste un phénomène inconnu, elle aboutit cependant à l'activation de la transcription. La protéine activatrice AP-2 peut se fixer sur deux sites potentiels de fixation du promoteur, elle agit par l'intermédiaire de la production d'AMPc. Cependant, NF-1 et AP-2 peuvent se fixer sur des séquences silencieuses du promoteur et inhiber la transcription. Le rôle des deux protéines NF-1 et USF de même que les interactions entre tous ces facteurs dans la régulation de l'expression du gène de la GH restent encore imprécis (Courtois *et al.* 1990, Lemaigre *et al.* 1990).

1.4.3 - Les facteurs endocrines

- *Le GHRH ou GRF*

Un peptide hypothalamique le « Growth Hormone-Releasing Hormone » (GRRH) ou « Growth Hormone-Releasing Factor » (GRF) stimule l'expression du gène de GH après la liaison à son récepteur spécifique sur les cellules somatotropes. Ce récepteur est couplé à une protéine G_s qui intervient dans la production d'AMPc cellulaire (Mayo 1992). Or, la région promotrice du gène *Pit-1* contient des sites de fixation CREB « cAMP Response Element Binding Protein ». L'augmentation du taux d'AMPc produit par le GHRH stimule ainsi l'activité transcriptionnelle de *Pit-1* et c'est donc par l'intermédiaire de Pit-1 que le GHRH stimule l'expression du gène de GH (Strobl et Thomas 1994, Soto *et al.* 1995, Kopchick et Andry 2000).

- *La somatostatine (« GH-Release-Inhibiting Factor ») ou SRIF*

Cette hormone hypothalamique a un effet opposé au GHRH sur la fonction somatotrope. Sa fixation sur un récepteur membranaire couplé à une protéine G_i qui à son

tour, inhibe la formation d'AMPc pourrait inhiber la transcription par réduction de l'expression de Pit-1 (Tanner *et al.* 1990, Sugihara *et al.* 1993, Tentler *et al.* 1997). Cette action inhibitrice du SRIF s'accompagne d'une réduction d'ARN messagers cytoplasmiques codant pour la GH alors qu'il se produit une accumulation nucléaire de pré-ARNm dans les cellules somatotropes de rats injectés par le SRIF (Morel *et al.* 1989).

- *Les glucocorticoïdes*

Les glucocorticoïdes tels que la dexaméthasone, stimulent la transcription du gène de la GH (Slater *et al.* 1985) par l'intermédiaire de la fixation du complexe hormone-récepteur sur des séquences spécifiques du gène appelées GRE « Glucocorticoïds Response Elements ». Un site présente une plus grande affinité pour le complexe glucocorticoïde-récepteur, il est situé bien en amont du site d'initiation de la transcription, l'autre est localisé sur le premier intron (Moore *et al.* 1985, Slater *et al.* 1985) (**Figure2**).

- *L'hormone thyroïdienne (T₃)*

L'expression du gène de la GH est aussi stimulée par l'hormone thyroïdienne chez de nombreuses espèces. La transcription du gène de la GH dans les cellules somatotropes de rat est augmentée après quelques minutes de stimulation par la T₃ pour atteindre un maximum à 1 heure de stimulation (Samuels *et al.* 1988). En l'absence d'hormones thyroïdiennes, la quantité d'ARNm codant pour le gène de la GH est fortement diminuée bien que leur longueur soit augmentée de 100 à 150 nucléotides. L'allongement de l'extrémité poly(A) pourrait stabiliser le transcrit pour augmenter l'efficacité de la traduction (Farrow 1993, Narayan et Towle 1985). La demi-vie des ARNm codant pour la GH est de 10 à 12 heures chez des rats hypothyroïdiens alors qu'elle n'excède pas 5 heures chez les rats normaux (Murphy *et al.* 1992). Des études ont montré que seul Pit-1 α est capable d'interagir avec l'hormone thyroïdienne et les récepteurs de l'acide rétinoïque sur l'expression du gène de la GH (Sanchez-Pacheco *et al.* 1998, Palomino *et al.* 1998).

L'hormone thyroïdienne T₃ agit par l'intermédiaire de son récepteur (TR) qui appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires et qui interagit spécifiquement avec des séquences promotrices du gène en aval du site d'initiation de la transcription (**Figure 2**). Ces « Thyroïd hormone Response Elements » (TRE) sont disposés le long du promoteur et leur effet stimulateur de la transcription est indépendant de leur position (Brent *et al.* 1991). Cependant, Ye *et al.* (1988) identifia un TRE supplémentaire, positionné entre les nucléotides

–206 et –198 (**Figure 2**) qui requiert la présence de Pit-1 pour être actif et la synergie entre la T₃ et le taux d'AMPc qui stimule Pit-1 a été établie par Copp et Samuels en 1989.

D'autres TRE ont été identifiés mais cette fois sur la région 3' du gène, notamment une séquence située sur les 88 nucléotides immédiatement en aval du codon stop (**Figure 2**) sur laquelle la fixation du TR inhibe l'activité du promoteur (Zhang et al. 1992).

- *IGF-I (« Insulin Growth factor I »)*

L'expression du gène de la GH est fortement diminuée par une forme recombinante d'IGF-1 dans les cellules d'adénomes hypophysaires humains (Yamashita *et al.* 1987). De plus, l'expression du gène de la GH est significativement inhibée par IGF-1 dans les cellules GH3 et cette inhibition passe par la réduction du nombre de transcrits de Pit-1 (Castillo et Aranda 1997).

- *Activine et inhibine*

La transcription du gène de la GH est également modulée par l'activine et l'inhibine, membres de la famille des « Transforming Growth Factor- β » (TGF β), qui inhibent la biosynthèse induite par le GHRH (Billestrup *et al.* 1990) et diminuent l'activité transcriptionnelle induite par le promoteur du gène (Theill et Karin 1993, Struthers *et al.* 1992).

1.5 - Sa structure protéique

1.5.1- Structure primaire et secondaire

Seule la GH-N dite « vraie GH » est synthétisée dans l'hypophyse sous forme d'une chaîne polypeptidique de 191 acides aminés chez l'homme, 190 chez le rat. Cette structure primaire est très conservée chez de nombreuses espèces (Wallis 1981, Paladini *et al.* 1983). La forme sérique majoritaire a un poids moléculaire d'environ 22 kDa, et comme de nombreuses autres protéines, la GH est d'abord synthétisée sous forme d'une pré-hormone contenant un peptide signal le 26 acides aminés rapidement clivé à la fin de la traduction. (Sussman *et al.* 1976, Lingappa *et al.* 1977). La forme biologiquement active est maintenue par deux ponts disulfures intracaténaux formés par 4 résidus cystéine (Cys₅₃ ↔ Cys₁₆₅ et Cys₁₈₂ ↔ Cys₁₈₉) qui créent une grande et une petite boucle (**Figure 3**).

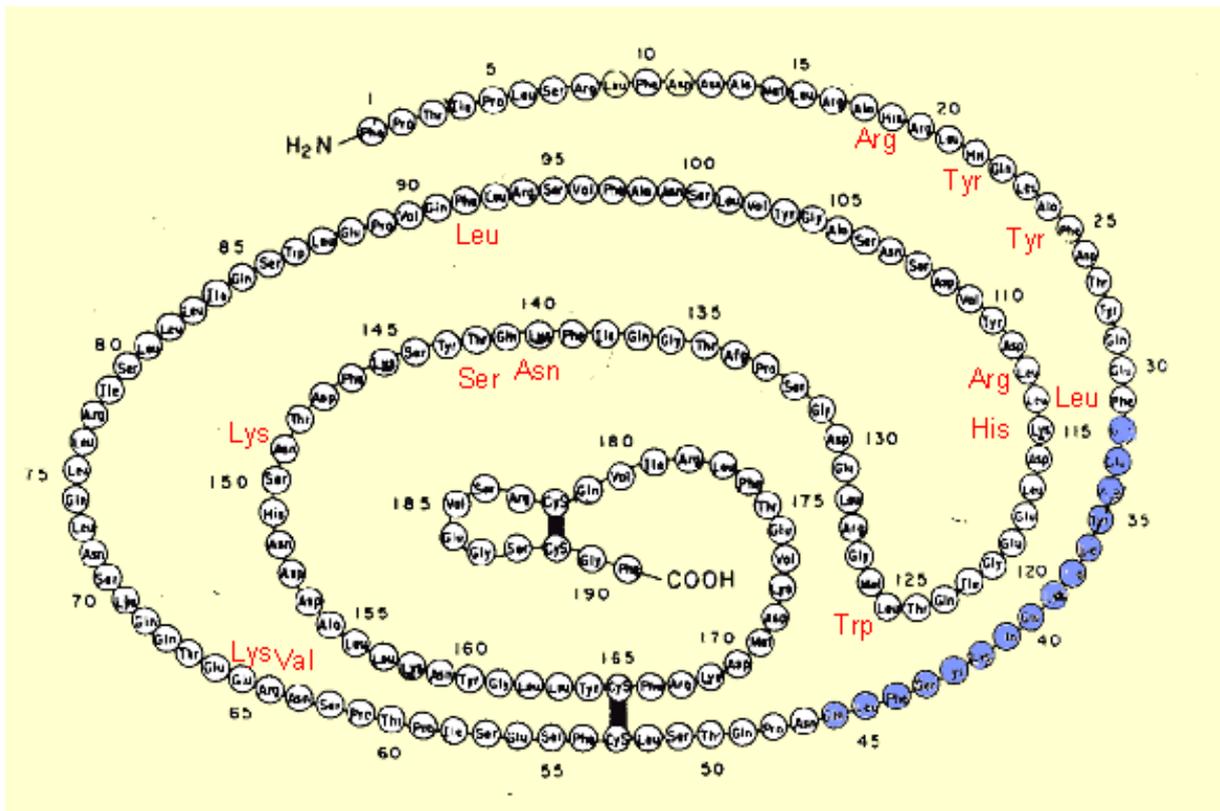


Figure 3 : Structure primaire de la GH hypophysaire de 22 kDa. La séquence 32 à 46 est déléetée dans la GH de 20 kDa. Les substitutions d'acides aminés dans la GH placentaire sont indiquées face aux résidus impliqués (d'après Chawla *et al.* 1983).

1.5.2 - Les variants de la GH

- C'est par épissage alternatif du transcrit primaire que la forme hypophysaire d'un poids moléculaire de 20 kDa est obtenue (**Figure 3**). Ce variant est tronqué de 15 acides aminés (32 à 46) et correspond à 5 – 15% de l'hormone circulante (Baumann 1991). Présent chez d'autres espèces que l'homme (Sinha et Gilligan 1984), ce variant tend à former des dimères avec la molécule de GH 22 kDa ou avec une autre molécule de GH 20 kDa (Chapman *et al.* 1981).

- La GH placentaire (GH-V) est une protéine d'un poids moléculaire de 22 kDa, contenant 191 acides aminés, et elle diffère de la GH hypophysaire par la nature de 13 acides aminés (**Figure 3**). Son point isoélectrique est plus basique et elle contient un unique site de N-glycosylation. Lorsque ce site est glycosylé, la protéine a un poids moléculaire de 25 kDa. Le gène peut aussi subir un épissage alternatif par incorporation de l'intron 4 et donner une troisième GH placentaire de 26 kDa (Cooke *et al.* 1988). Récemment deux nouveaux

transcrits de la GH placentaire ont été clonés (Boguszewski *et al.* 1998). Le premier correspond à une protéine de 20 kDa résultant de la délétion de 45 paires de bases, causée par un épissage de l'exon 3. Le deuxième est généré par épissage alternatif à partir d'un site donneur provoquant une délétion de 4 paires de bases à la fin de l'exon 4 et une protéine de 24 kDa comportant 219 acides aminés parmi lesquels les 124 premiers sont rigoureusement identiques à ceux de la hGH placentaire de 22 kDa tandis que la séquence carboxy-terminale est très différente.

- De nombreuses autres formes de GH résultant de modifications post-traductionnelles ont été identifiées. En effet, si 75% de l'hormone se trouvent sous la forme non modifiée de 22 kDa dans l'hypophyse, seulement 43% subsistent sous la forme non modifiée dans la circulation. Environ 20% de l'hormone circulante se trouvent sous la forme d'un dimère du produit du gène de 22 kDa et environ 7% se trouvent sous la forme de trimères voire de pentamères. Le reste des formes modifiées de GH dans la circulation consiste en dimères, ou oligomères du produit du gène de 20 kDa. (Strobl et Thomas 1994). Des formes glycosylées (Sinha et Lewis 1986), phosphorylées (Liberti *et al.* 1985) et acétylées (Baumann 1991) ont pu être identifiées en très faible pourcentage sans que des modifications de leur activité biologique aient pu vraiment être déterminées. Cette hétérogénéité se retrouve chez de nombreuses espèces et le rôle physiologique de ces différentes GH reste inconnu.

1.5.3 - Structure tertiaire

C'est la structure tertiaire de la GH de porc qui a d'abord été définie par cristallographie aux rayons X par Abdel-Meguid *et al.* en 1987. Depuis, de Vos *et al.* en 1992 a déterminé la structure tertiaire de la GH humaine (**Figure 4**).



Figure 4 : Représentation schématique 3D obtenue par cristallographie de la hGH (d'après de Vos *et al.* 1992)

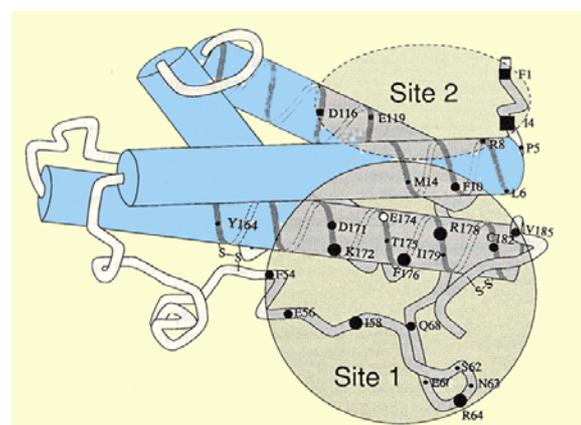


Figure 5 : Structure tridimensionnelle de la hGH et localisation des sites 1 et 2 impliqués dans la liaison à son récepteur. Les acides aminés fondamentaux pour la liaison sont indiqués (d'après Wells *et al.* 1993).

Les deux molécules apparaissent sous la forme d'une protéine globulaire asymétrique, possédant 4 hélices α antiparallèles dont les longueurs varient de 21 à 30 acides aminés (**Figure 4**). Les extrémités des hélices 1 et 4 constituent respectivement les domaines N- et C-terminaux de la GH. Ces hélices sont reliées entre elles par des segments flexibles impliqués dans la liaison aux récepteurs ou à des anticorps (**Figure 5**).

1.5.4 - Résidus de la GH impliqués dans la liaison à son récepteur (GHR)

Les relations structure / fonction de la GH ont surtout été étudiées dans les années 1980 par les méthodes de modifications enzymatiques et chimiques (Paladini *et al.* 1983, Nicoll *et al.* 1986). Kostyo *et al.* en 1974 démontre que le fragment 1-134 de la GH possède la même capacité de liaison au GHR que la GH entière. Les techniques de modifications chimiques ont montré que l'oxydation des résidus méthionine 64 et/ou 179 (Teh *et al.* 1987), ou l'acétylation des lysines 168 et 172 (Teh et Chapman 1988) entraîne une forte diminution de l'affinité de la hGH pour ses récepteurs. Les résidus précis impliqués dans la liaison au GHR ont été déterminés plus tard par mutagenèse dirigée, technique qui consiste à remplacer successivement chaque acide aminé par une alanine (acide aminé neutre qui ne modifie pas la structure tertiaire). Sur 62 modifications ponctuelles, 10 réduisent l'affinité de liaison de 2 à 4 fois, 7 de 4 à 10 fois et 5 de 10 à 100 fois, alors que la substitution du glutamate 174 par une alanine entraîne une augmentation de l'affinité de 4 fois (Wells *et al.* 1993). Ces mêmes auteurs ont montré que la hGH possède deux sites majeurs impliqués dans la liaison au GHR et que la fixation du premier site induit la dimérisation du récepteur, puis la fixation du deuxième site. Les interfaces qui interviennent dans la liaison de la GH avec son récepteur sont désignés : site 1 de haute affinité composé par les résidus des hélices 1 et 4 et site 2 composé par les résidus de l'extrémité N-terminale et des hélices 1 et 3 (**Figure 5**). Quatre vingt cinq pourcent de l'activité de liaison sont attribués au site 1 et environ 8% au site 2 (de Vos *et al.* 1992, Thomas 1998).

1.6 - Sa sécrétion

Après sa biosynthèse dans le réticulum endoplasmique et sa maturation dans l'appareil de Golgi des cellules somatotropes, la GH est stockée dans des granules sécrétoires en attente du stimulus de libération. A peu près 40% de la GH produite est stockée dans une hypophyse normale. Par exocytose, la GH est libérée de façon pulsatile dans le flux sanguin et cette

sécrétion est sous le contrôle de peptides hypothalamiques dont les principaux sont le GHRH et le SRIF.

1.6.1 - Production et rythme

Chez l'homme et toutes les espèces étudiées, la GH est sécrétée de manière épisodique dans la journée et le taux de GH plasmatique est le reflet de la fréquence, de l'amplitude et de la durée de chaque pic sécrétoire. La fréquence et l'amplitude varient considérablement en fonction de l'alimentation, de l'exercice physique, du sommeil et du stress. En moyenne, 4 ou 5 pics par jour sont observés chez l'homme, le pic des premières heures de la nuit étant le plus élevé (20 - 25 ng / mL selon les individus). Chez la femme, les concentrations moyennes sont plus élevées et les pics sont plus fréquents (jusqu'à 12 / jour). Une concentration basale de l'ordre de 1 à 5 ng / mL, entre les pics sécrétoires est considérée comme normale (Winer *et al.* 1990).

Très élevé à la naissance, le taux de GH baisse jusqu'au moment de la puberté, où étroitement lié à l'augmentation de la concentration des stéroïdes sexuels, il augmente pour atteindre son maximum. Les « pulses » plus fréquents, gagnent en amplitude (30 – 60 ng/mL) (Daughaday 1989). Au cours du vieillissement, la baisse du taux plasmatique de GH est estimée à 14% par décade et ce déclin débiterait dès l'âge de 30 ans. Cette réduction de la sécrétion serait principalement le résultat d'une diminution de l'amplitude des pics sécrétoires, leur fréquence restant inchangée (Martin *et al.* 1997).

Chez le rat male adulte, la GH est sécrétée sous forme de « pulses » toutes les 3 heures et demie en moyenne. Ces pics sont de grande amplitude puisqu'ils peuvent atteindre une valeur supérieure à 200 ng / mL, ils sont suivis par une période d'environ 2 heures pendant lesquelles la sécrétion est quasiment nulle ($[GH] < 1 \text{ ng/mL}$) (Tannenbaum *et al.* 1976). Chez la rate, les pics de rGH sont plus fréquents, de plus faible amplitude, la concentration basale entre les pics est également plus élevée : 15 à 30 ng / mL pendant 15 à 30 min après le pic de sécrétion (Eden 1979).

1.6.2 - Régulation de sa sécrétion

La sécrétion de GH hypophysaire est sous le contrôle de deux hormones hypophysiotropes, le GHRH et le SRIF, synthétisés par des neurones hypothalamiques, eux mêmes sous la dépendance de neurotransmetteurs cérébraux dont les catécholamines (dopamine, noradrénaline, adrénaline) la sérotonine, l'acétylcholine, l'histamine Associés aux interactions pulsatiles complexes entre GHRH et SRIF, les neurotransmetteurs

interagissent finement avec toute une série de neuropeptides pour assurer le caractère pulsatile de la sécrétion de GH (Tannenbaum 1993, Veldhuis *et al.* 2001).

- *Le GHRH* a été identifié grâce à sa sécrétion ectopique par les cellules de tumeurs pancréatiques associées à une acromégalie (Frohman et Szabo 1981, Guillemin *et al.* 1982, Rivier *et al.* 1982). Les deux formes : GHRH (1-44)-NH₂ et GHRH (1-40)-OH sont synthétisées par les neurones des noyaux arqués et ventro-médian de l'hypothalamus et libérés dans l'éminence médiane pour rejoindre la circulation portale hypophysaire. Ces deux peptides induisent la sécrétion de GH avec la même efficacité (Wehrenberg et Ling 1983, Spiess *et al.* 1983). En l'absence de GRRH, la synthèse et la libération de GH sont supprimées et la croissance sévèrement retardée (Locatelli *et al.* 1984, Takano *et al.* 1985). L'expression du gène du GHRH est détectée au 17^{ème} jour de gestation chez le rat, il induit la prolifération des cellules somatotropes, la synthèse et la sécrétion de rGH foetale (Baird *et al.* 1984).

Les actions du GHRH sur la fonction somatotrope passent par sa liaison à un récepteur qui appartient à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Ces récepteurs sont largement présents sur les cellules somatotropes mais aussi sur d'autres types cellulaires de l'adénohypophyse. La transcription du gène du récepteur est activé par Pit-1 et les glucocorticoïdes mais semble inhibé par les œstrogènes. Récemment, des mutations qui impliquent de sévères délétions du récepteur ont été mises en cause dans le syndrome de déficience en GH (GHD de type 1) (Gaylinn 1999, Salvatori *et al.* 2002).

Après sa fixation sur son récepteur membranaire, l'activation d'une protéine stimulatrice G_s peut agir directement sur les VSCC « Voltage-Sensitive Calcium Channels » pour changer leur sensibilité. L'activation de l'AMPc et de la protéine kinase A (PKA) provoque la dépolarisation de la cellule et l'ouverture des canaux calciques ; il est bien établi que la libération de GH par exocytose est calcium-dépendante et liée à l'augmentation de la concentration cytosolique de calcium (Barinaga *et al.* 1985).

En plus de sa fonction neuroendocrine première, le GHRH synthétisé dans l'intestin et dont les ARNm sont mis en évidence dans l'ovaire, le testicule, le pancréas, le placenta et les lymphocytes assure dans ces tissus périphériques une régulation locale de type autocrine / paracrine. Plus récemment, la découverte d'une synthèse de GHRH biologiquement actif dans les cancers mammaires, de l'ovaire et de l'endomètre suggère que cette production locale de GHRH joue un rôle dans la prolifération tumorale (Kahan *et al.* 1999, Schally *et al.* 2001).

Enfin, la mise en évidence d'une synthèse de GHRH dans l'hypophyse suggère également une régulation locale de la sécrétion de GH (Rauch *et al.* 1995).

- *Le SRIF* a été découvert en 1973 dans le laboratoire de R. Guillemin et identifié comme une neurohormone capable d'inhiber la sécrétion de GH. Il est distribué de manière ubiquitaire dans les noyaux péri- et para-ventriculaires de l'hypothalamus, dans le pancréas, le tractus gastro-intestinal (Epelbaum *et al.* 1977) et agit aussi bien en tant qu'hormone périphérique, facteur autocrine / paracrine et neuropeptide (Epelbaum et Dournaud 1998). Dans l'hypothalamus, un ARNm de 600 nucléotides code pour une présomatostatine de 116 acides aminés qui après clivage donne un tetradecapeptide, le SRIF₁₄ ou une forme allongée le SRIF₂₈ qui peut lui même être clivé en SRIF₁₄ et SRIF₂₈₍₁₋₁₂₎ (Morel *et al.* 1983). Si la forme SRIF₂₈₍₁₋₁₂₎ est biologiquement inactive, les deux autres peptides inhibent la sécrétion de GH, le SRIF₁₄ ayant une action prolongée et plus efficace que le SRIF₂₈.

L'action du SRIF sur la fonction somatotrope passe par la liaison à des récepteurs spécifiques hypophysaires et hypothalamiques qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés à une protéine G_i. L'affinité de liaison des différents SRIF à leur récepteur et leur efficacité biologique sont étroitement corrélées. Ainsi, la prédominance de l'effet inhibiteur du SRIF₂₈ sur la sécrétion de GH est liée à son affinité de liaison qui est plus importante que celle du SRIF₁₄.

Cinq récepteurs sont actuellement dénombrés (sst1-sst5), ils sont exprimés dans de nombreuses cellules normales et tumorales et sont cellules-spécifiques (Benali *et al.* 2000). Chaque sous-type de récepteur est associé à un signal de transduction qui lui est propre d'où la diversité de leur rôle biologique : sst1, 2 et 5 sont impliqués dans l'inhibition de la sécrétion de GH, sst2 dans l'inhibition de la sécrétion du glucagon et sst5 dans celle de l'insuline (Benali *et al.* 2000). Bien que des analogues du SRIF soient largement utilisés pour traiter des tumeurs endocrines et des tumeurs plus agressives, leur mode d'action reste encore imprécis. Pourtant, dans des cellules somatomotropes (GH4) de rat transfectées de manière stable avec le récepteur sst2, un analogue du SRIF (BIM23014) inhibe l'accumulation d'AMPc, l'activation de la PKA et l'activation de Pit-1 (Tentler *et al.* 1997). Le mécanisme d'action qui provoque une diminution de la concentration intracellulaire en calcium dans les cellules somatotropes implique l'activation d'une protéine G_i qui déclenche l'ouverture des canaux potassiques, hyperpolarise la membrane cellulaire, obturant ainsi les canaux calciques.

Ajouté à sa fonction de type endocrine, le SRIF synthétisé par quelques cellules du pancréas, de la muqueuse gastrique et intestinale intervient comme modulateur paracrine dans

la fonction endocrine du pancréas et du tractus gastrointestinal. Une synthèse hypophysaire de SRIF suggère comme dans le cas du GHRH une régulation locale de type paracrine / autocrine de la sécrétion de GH (Pagesy *et al.* 1989).

La sécrétion de GH hypophysaire est également régulée par d'autres peptides ou amines hypothalamiques qui possèdent une activité stimulatrice ou inhibitrice non spécifique puisqu'elles jouent un rôle important dans la sécrétion de la plupart des hormones hypophysaires.

- *Les peptides « GHRH like »*

Ce sont des neuropeptides dont la structure ressemble à celle du GHRH, ils agissent par l'intermédiaire de récepteurs hypophysaires spécifiques. Ils incluent la famille des VIP « vasoactive intestinal peptide » : la secretine, le GIP « Gastrin-Inhibiting peptide », le glucagon et le CRF « Corticotropin-Releasing Factor » et les PACAP « Pituitary Adenylate Cyclase-Activating polypeptide » (Montero *et al.* 2000). La plupart a une action positive sur la libération de GH, soit par leur action antagoniste vis à vis du SRIF, soit en favorisant la prolifération des cellules somatotropes et leur capacité de synthèse. Seul le glucagon inhibe la sécrétion de GH par un mécanisme qui stimule la libération du SRIF (Katakami *et al.* 1984).

- *Les peptides non-apparentés* comme le TRH « Thyrotropin-Releasing Hormone », le GnRH « Gonadotropin-Releasing Hormone », le NPY (Neuropeptide Y), la bombésine, la neurotensine, la substance P, la galanine, la vasopressine et l'ocytocine modulent la sécrétion de GH soit directement, soit indirectement en interagissant avec le GHRH ou le SRIF.

- *Une autre famille de molécules synthétiques appelés GHRP (GH- releasing peptides)* est également capable de stimuler la sécrétion de GH. Ces séquences synthétiques de 6 ou 7 acides aminés se lient à un récepteur hypophysaire spécifique GHS-R (GH secretagogue receptor) à 7 domaines transmembranaires, couplé à une protéine G. L'activation du récepteur déclenche les mêmes actions que le GHRH : un GHRP synthétique (MK-677) stimule la sécrétion de GH d'une manière pulsatile pendant 24 heures chez l'homme (Thorner *et al.* 1997). La découverte de ce récepteur avait fait suspecter la présence d'un ligand endogène. Ce ligand, appelé ghréline a été isolé de l'estomac de rat. Il contient 28 acides aminés et une n-octanoylation sur le résidu 3 sérine est indispensable à son activité biologique (Kojima *et al.*

1999, Dieguez et Casanueva 2000). La ghréline humaine diffère de celle de rat par deux acides aminés, elle est présente dans le plasma humain en quantité considérable et c'est *via* le flux sanguin qu'elle agit sur l'hypophyse pour exercer une action stimulatrice sur la sécrétion de GH. Plus récemment, un second ligand a été également mis en évidence dans l'estomac de rat, la des-gln14 ghréline (Hosoda *et al.* 2000), l'existence de plusieurs GHS-R est dès lors, fortement suspectée (Chen 2000). Par RT-PCR, les ARNm codant pour la ghréline ont été mis en évidence dans le cerveau. La présence de ghréline à la fois dans l'estomac et le cerveau donne une autre dimension à la régulation de la sécrétion de GH d'autant plus que Garcia *et al.* 2001 ont montré sa capacité à réguler Pit-1. La découverte récente de récepteurs de la ghréline dans certaines tumeurs en particulier dans le cancer mammaire (Cassoni *et al.* 2001) lui donne toute son importance.

- La GH apparaît comme un régulateur essentiel des grandes fonctions métaboliques de l'organisme et ce point de vue global aide à expliquer pourquoi et avec quelle signification physiologique les substrats métaboliques comme le glucose, les lipides et les acides aminés agissent d'une manière complexe, aux niveaux hypothalamique et hypophysaire, sur la régulation de GH.

- *Le Glucose sanguin* : une diminution ou une augmentation du taux de glucose sanguin agit rapidement sur la sécrétion de GH et cette réponse dépend de l'espèce étudiée. Par exemple, l'hypoglycémie stimule la sécrétion de GH chez les primates, le chien, le porc, le poulet, le poisson alors qu'elle est inefficace chez le chat et la souris. Inversement, l'hyperglycémie inhibe la sécrétion de GH chez les primates et le porc mais non chez le chat, la souris et le poulet. Chez l'homme, la chute du taux de glucose sanguin provoque une libération de GH surtout si cette diminution restaure le taux normal à partir d'un état hyperglycémique. Ainsi, les variations du taux de glucose ont un impact plus important que les taux eux mêmes sur la sécrétion de GH et ceci par l'intermédiaire d'une stimulation de la sécrétion de GHRH (Press *et al.* 1984, Shibasaki *et al.* 1985, Delitala *et al.* 1990).

- *Les acides gras non estérifiés (FFA : « Free fatty acids »)* inhibent la sécrétion de GH chez l'homme. Si une augmentation associée du SRIF a été constatée, le mécanisme qui induit cette diminution de la sécrétion de GH dans le cas d'adiposité relative et d'obésité absolue reste mal connu (Veldhuis *et al.* 1995, Weltman *et al.* 1995, Vahl *et al.* 1997). La découverte récente de la leptine, un polypeptide sécrété par les cellules adipeuses permet des hypothèses plausibles (Campfield *et al.* 1995). Les récepteurs de la leptine sont présents dans les neurones hypothalamiques et l'action directe de la leptine sur le SRIF et le GHRH est

fortement suggérée (Carro *et al.* 1997) ainsi qu'une action sur le peptide hypothalamique NPY, puissant orexigène et inhibiteur de la GH (Schwartz *et al.* 1996). Les deux isoformes du récepteur de la leptine ont été récemment découvertes dans l'hypophyse humaine ce qui permet d'envisager une action directe de la leptine sur l'hypophyse (Lloyd *et al.* 2001). Le récepteur de la leptine présente beaucoup d'homologies avec les récepteurs de la classe 1 de la famille des récepteurs des cytokines et des propriétés « cytokine-like » sont récemment attribuées à la leptine. La transduction du signal induit par la leptine dans les cellules hypophysaires implique l'activation des « Janus protein-Tyrosine Kinase » (JAK) / « Signal Transducer and Activation of Transcription » (STAT) / « Suppressor of Cytokine Signalling » (SOCS) (Lloyd *et al.* 2001). Les cellules hypophysaires sont de surcroît, capables de synthétiser la leptine, 70% des cellules corticotropes, 21% des cellules somatotropes, 29% des cellules gonadotropes, et seulement 3% des cellules à prolactine montrent une expression de leptine conférant à cette protéine un rôle paracrine / autocrine (Popovic *et al.* 2001).

- *Les acides aminés* : Une diète protéique entraîne une diminution de l'amplitude des pics de GH et une diminution de la concentration moyenne. En revanche, de nombreux auteurs ont montré que l'administration de L-arginine, chez l'homme, favorise la sécrétion de GH en réponse à une stimulation par le GHRH (Parker *et al.* 1967, Ghigo *et al.* 1990).

- Autres régulateurs hormonaux impliqués dans la sécrétion de GH

- *Les facteurs de croissance IGF-I et IGF-II* : les IGF sont synthétisés par le foie et d'autres tissus périphériques en réponse à la stimulation par la GH et agissent par l'intermédiaire de récepteurs hypothalamiques et hypophysaires pour inhiber la sécrétion de GH (Goodyer *et al.* 1984, Yamasaki *et al.* 1991). IGF-I stimule la synthèse et la libération du SRIF tandis qu'il inhibe la synthèse et la libération du GHRH (Sato et Frohman 1993) et inhibe directement la transcription hypophysaire du gène de la GH (Yamashita et Melmed 1986, Namba *et al.* 1989). IGF-II inhibe également l'induction de la sécrétion de GH par le GHRH mais d'une manière moins efficace (Ceda *et al.* 1987).

- *Les hormones pancréatiques* : induite par la GH, l'insuline agit par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques pour inhiber la sécrétion basale de cellules hypophysaires de rat (Melmed 1984) et la transcription du gène (Ivarie *et al.* 1981). Le glucagon, inversement, stimule la sécrétion de GH (Sugase *et al.* 1976).

- *Les glucocorticoïdes* jouent un rôle significatif dans la régulation de la sécrétion de GH d'autant plus que 70% des cellules somatotropes possèdent leurs récepteurs spécifiques (Kononen *et al.* 1993). Des études *in vitro* ont montré l'inhibition de la sécrétion de GH par la

suppression de l'expression du GHRH après traitement par les glucocorticoïdes (Fife *et al.* 1996). *In vivo*, les effets des glucocorticoïdes sur la sécrétion de GH sont biphasiques et dépendent de la durée et des doses injectées. L'administration aiguë d'une faible dose de glucocorticoïdes stimule généralement la sécrétion de GH, l'effet est obtenu après plusieurs heures suite à une stimulation du GHRH et une inhibition du SRIF (Martul *et al.* 1992, Popovic *et al.* 1993). Inversement, une forte dose ou une corticothérapie à long terme inhibe la sécrétion de GH (Muruais *et al.* 1991).

- *Les hormone thyroïdiennes* : l'hypothyroïdisme induit chez le rat adulte provoque une augmentation de l'expression du GHRH hypothalamique alors que l'hyperthyroïdisme entraîne une diminution de son expression (Jones *et al.* 1990). Chez l'homme, comme chez de nombreuses espèces, l'hypothyroïdisme altère considérablement la croissance postnatale (Giustina et Wehrenberg 1995). En effet, le pic nocturne de sécrétion de GH qui est le reflet de la production physiologique de GH est alors fortement diminué et s'accompagne d'une réduction des taux d'IGF-I circulants (Chernausk et Turner 1989).

- *Les hormones sexuelles* : des études par hybridation *in situ* ont montré que l'expression des ARNm codant pour le GHRH est environ deux à trois fois plus importante dans le noyau arqué des rats mâles que dans celui des femelles (Maiter *et al.* 1991). Bien que ce dimorphisme sexuel existe chez de nombreuses espèces, le rôle spécifique des stéroïdes sexuels dans la régulation de la sécrétion de GH n'est pas clair. Par exemple, l'expression du GHRH n'est pas modifiée après castration du rat adulte (De Gennaro *et al.* 1989). Chez la femelle le taux de GHRH reste constant tout au long du cycle sexuel et n'est pas modifié lors de la gestation (Wehrenberg *et al.* 1987).

• *Les rétrocontrôles régulateurs de la sécrétion de GH (Figure 6).*

La somatostatine, le GHRH, la GH elle même et son médiateur ubiquitaire IGF-I sont maintenus en parfaite homéostasie dans l'hypothalamus, l'hypophyse ou la circulation sanguine par un jeu d'interactions et rétrocontrôles qui impliquent les 4 (poly-)peptides. L'auto-régulation de la GH est démontrée chez le sujet normal chez qui une injection intrapéritonéale de GH réduit la sécrétion de GH hypophysaire induite par une stimulation du GHRH et ceci bien avant que le taux plasmatique d'IGF-I augmente (Nakamoto *et al.* 1986).

Les données cliniques tendent à montrer que l'auto-rétrocontrôle négatif de la GH stimule la libération du SRIF (Vehrenberg *et al.* 1992, Friend *et al.* 1997).

Au niveau hypothalamique, le GHRH et le SRIF peuvent réguler négativement leur propre sécrétion. Plus précisément, le GHRH inhibe sa propre sécrétion mais induit la

libération du SRIF *in vitro* (Aguila et Mc Cann 1985), tandis que le SRIF inhibe à la fois sa propre sécrétion et celle du GHRH *in vitro* (Tannenbaum 1994).

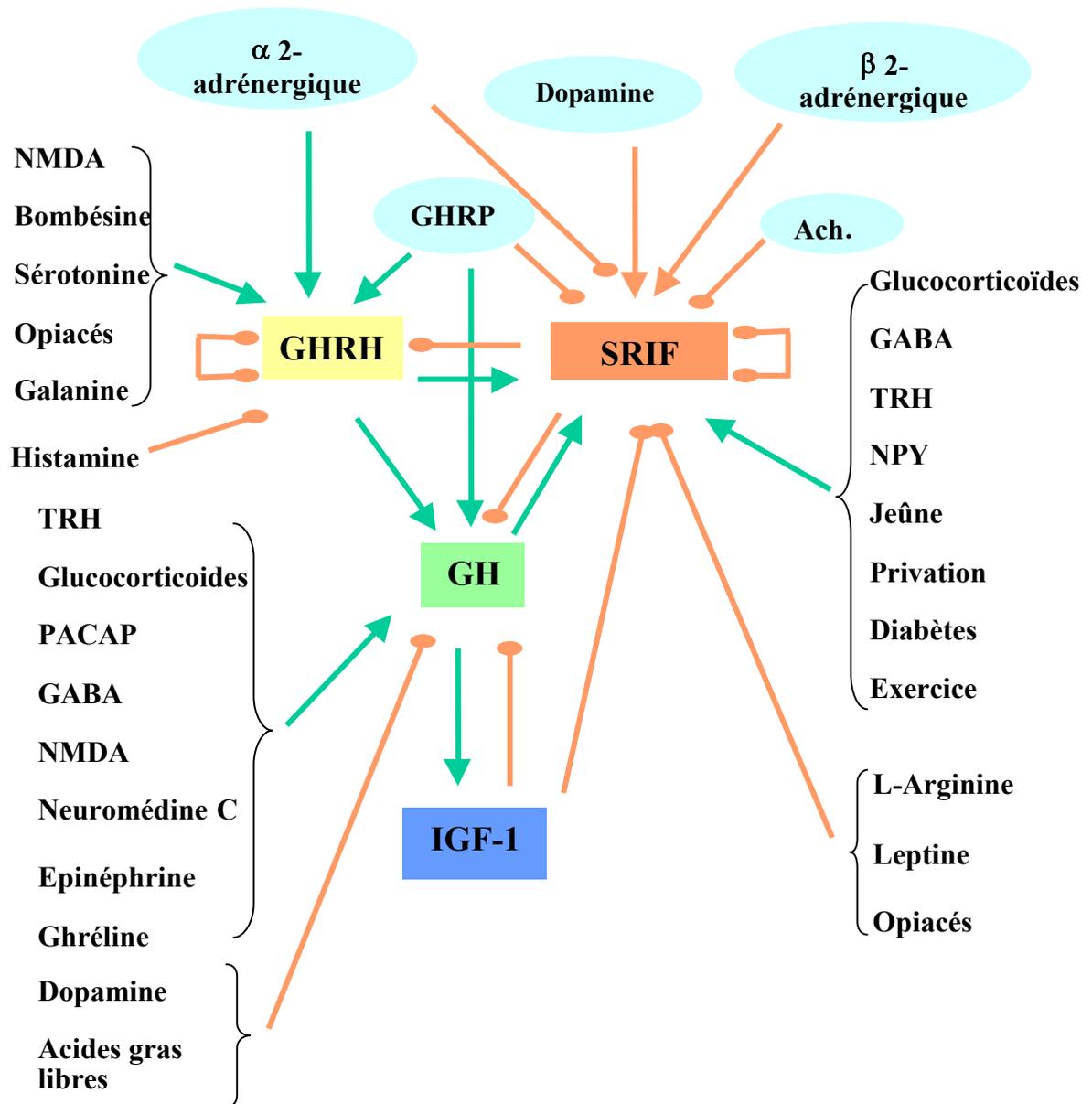


Figure 6 : Schéma de la régulation de la sécrétion de GH (d'après Gustina et Veldhuis 1998).

—▶ Activation —● Inhibition

Bien que controversée pendant longtemps, l'utilisation des formes recombinantes d'IGF-I et d'IGF-II montrent que, séparément, leur action inhibitrice sur l'axe somatotrope n'est pas très importante ni après administration centrale ni *in vitro* sur des cultures

hypothalamiques. Par contre la co-exposition à IGF-I et IGF-II inhibe complètement l'axe somatotrope (Harel et Tannenbaum 1992, Korbonits *et al.* 1996).

Ainsi la sécrétion de GH dépend d'un nombre considérable de stimuli, d'interactions diverses et de rétro-contrôles positifs ou négatifs résumés dans le schéma proposé (**Figure 6**).

1.6.3 - Transport et catabolisme

Par phénomène d'exocytose, la GH est libérée des granules sécrétoires des cellules somatotropes, traverse les capillaires fenêtrés et entre dans la circulation générale. Sa demi-vie dans l'organisme est estimée entre 2 et 3 heures. Les actions de la GH dépendent donc de sa distribution extrapituitaire dans les milieux extracellulaires, principalement le sang et la lymphe. Elles dépendent également de son interaction avec des protéines de liaison spécifiques, dont son récepteur membranaire (GHR) semble le plus important. Nombreux sont les organes-cibles de la GH et la plupart des cellules de l'organisme expriment le GHR. Nous reviendrons plus en détail sur ce sujet dans les chapitres ultérieurs mais signalons dès maintenant que l'étude des mécanismes de liaison GH-GHR, de la structure du récepteur, de la cascade des signalisations induites a permis une meilleure compréhension des actions de la GH. La protéine de liaison trouvée dans le sérum, « Growth Hormone Binding Protein » (GHBP), correspond à la forme soluble du domaine extracellulaire du récepteur de la GH et sa signification biologique n'est pas encore aujourd'hui, complètement élucidée.

- La présence de la GHBP dans le sérum humain a été rapportée en 1964 (Hadden et Prout 1964). Elle ne fut pourtant isolée qu'en 1977, à partir du sérum de souris en gestation (Peeters et Friesen 1977), puis isolée et caractérisée chez l'homme et le lapin (Baumann *et al.* 1986, Spencer *et al.* 1988). C'est une glycoprotéine soluble de 255-273 acides aminés et d'un poids moléculaire de 55 kDa qui se lie préférentiellement avec la GH 22 kDa avec une forte affinité ($K_a \approx 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) (Baumann 1991).

La GHBP provient de deux mécanismes différents selon l'espèce considérée :

- Chez le rat, la souris et le singe, elle provient de l'épissage alternatif du pré-ARNm du GHR (Baumbach *et al.* 1989, Talamantes 1994).

- Chez l'homme, le lapin, le singe, le poulet et d'autres espèces, elle provient d'une protéolyse limitée du GHR en un site proche de la membrane plasmique (Dastot *et al.* 1998, Vleurick *et al.* 1998). Ce site (M236-D244) est identifié comme une zone de transition entre le domaine extracellulaire et le domaine transmembranaire. La délétion de 3 acides aminés (242-244) dans cette zone inhibe la protéolyse (Conte *et al.* 2002).

Le singe est le seul exemple où la GHBP peut provenir indifféremment des deux mécanismes.

Les lymphocytes humains IM-9 ont été utilisés *in vitro* pour démontrer qu'une métalloprotéase est responsable du clivage du GHR (Alete *et al.* 1998). C'est la métalloprotéase TACE « Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme » qui est impliquée mais le point précis de clivage reste imprécis (Baumann 2001).

La GHBP est produite en grande quantité dans le foie où son taux est 10 fois supérieur à celui trouvé dans le muscle ou le tissu adipeux.

La GHBP a une signification physiologique puisque environ 60% de la GH circulante lui est liée. Elle assure sans doute la disponibilité de la GH entre les pics de sécrétion d'autant plus qu'il a été démontré qu'elle augmente la demi-vie de l'hormone en réduisant son élimination rénale. *In vitro*, les études montrent que la GHBP entre en compétition avec les GHR membranaires inhibant ainsi l'action de la GH. Cet effet antagoniste n'est pas retrouvé *in vivo*, probablement compensé par l'allongement de la demi-vie de l'hormone.

D'autres GHBP de poids moléculaires différents (100 à 174 kDa) spécifiques de la GH ont été identifiées dans le plasma humain. Elles possèdent une moins grande affinité ($K_a \approx 10^5 M^{-1}$) pour la GH 22 kDa et seulement 10 à 15% de l'hormone sont liés à ces protéines dans le plasma. Une GHBP de 100 kDa, de faible affinité, lierait plus spécifiquement la GH 20 kDa. En effet 80% de la GH 20 kDa complexée dans le plasma est liée à cette protéine, mais elle ne représente que 10-15% de la totalité de la GH plasmatique qui circule sous forme liée à une protéine de liaison (Baumann 1991). Elles sont également produites dans le foie et leur concentration est augmentée dans certaines pathologies du foie, les troubles rénaux ou l'acromégalie.

- Bien qu'une certaine quantité d'hormone soit dégradée directement dans l'hypophyse et la circulation sanguine, la majorité est dégradée dans les organes d'élimination, principalement le foie et le rein et dans ses tissus-cibles.

- Dans l'hypophyse, la dégradation de la GH est assurée par des protéases lysosomiales dont l'action est étroitement liée aux facteurs régulateurs de la libération de GH. Ainsi, le SRIF, fortement impliqué dans l'inhibition de la sécrétion de GH, agit en plus sur le volume cytoplasmique des lysosomes dans les cellules somatotropes augmentant ainsi la dégradation intracytoplasmique de l'hormone stockée (Rene 1982, Stachura 1986).

- La dégradation protéolytique de la GH sécrétée a lieu essentiellement dans le foie et le rein (Baumann 1991). Dans le foie, la GH est incorporée dans les cellules de Kupffer et concentrée dans les mastocytes et macrophages péritonéaux. Dans les endosomes ou les lysosomes, les protéases dégradent complètement la GH en composés amino-acidiques ou en fragments plus petits qui peuvent retourner dans la circulation pour augmenter l'hétérogénéité

« des GH circulantes » (Mittra 1984, Beaumann 1991). Dans le rein, les cellules des tubules rénaux réabsorbent la GH et la dégradent dans les lysosomes. La thrombine et des protéases «collagénase-like» clivent la GH en deux fragments de 14 et 15 kDa qui peuvent également retourner dans le plasma (Baumann 1991).

- Dans ses cellules-cibles, la fixation de la GH sur son récepteur entraîne des modifications dans l'arrangement des protéines membranaires et le complexe GH-GHR est rapidement internalisé par phénomène d'endocytose avant d'arriver dans les lysosomes où la majorité de l'hormone internalisée (75%) est dégradée par des endopeptidases (Roupas et Herington 1987). La dégradation n'est cependant pas concomitante de la translocation puisque seule la GH intacte est retrouvée dans les fractions subcellulaires de foie de rat dans les 15 premières minutes qui suivent l'administration de GH exogène (Bullier Picard *et al.* 1989). Le clivage protéolytique implique une « sérine protéase » qui génère un fragment de 15 kDa capable de se lier au GHR membranaire et dont l'efficacité à induire certains effets biologiques reste importante (Lewis 1984). Ainsi, la protéolyse n'est pas seulement essentielle à l'élimination de l'hormone mais à son activité biologique ; l'activité de la GH exogène est en effet fortement réduite en présence d'inhibiteur de la « sérine protéase » (Schepper *et al.* 1984).

Dans les adipocytes et probablement dans d'autres tissus, une petite quantité de GH internalisée (25%) ne subit pas le processus de dégradation et son externalisation rapide sous une forme intacte confirme l'existence de deux voies distinctes d'internalisation (Roupas et Herington 1989).

1.6.4 - Cas particulier des variants de la GH

- Le taux métabolique de clairance plasmatique de la GH 20 kDa est 2 à 3 fois plus faible que celui de la GH 22 kDa. Une étude pharmacocinétique a été menée récemment par Hashimoto *et al.* (2000) pour étudier les fonctions physiologiques et pharmacologiques de la GH 20 kDa. L'administration de l'hormone à des sujets normaux montre que la régulation de sa sécrétion est physiologiquement la même que celle de la GH 22 kDa.

- La GH placentaire est sécrétée par les cellules du syncytiotrophoblaste et les cellules épithéliales du placenta, dans la circulation maternelle, de façon non pulsatile et n'est pas détectée dans le sang du fœtus. Cette sécrétion continue peut modifier le métabolisme du foie maternel et a des implications importantes dans la régulation physiologique de la gestation, plus particulièrement dans le « turnover » du glucose et de la gluconéogénèse (Kalhan *et al.*

1997). Contrairement à la GH hypophysaire dont le taux de sécrétion dépend de nombreux stimuli, la synthèse et le taux plasmatique de GH placentaire augmente avec la croissance du placenta (Macleod *et al.* 1991). La sécrétion est inhibée par le glucose *in vivo* et *in vitro* (Patel *et al.* 1995). Une concentration de glucose de 1 mg / l sur des cellules du trophoblaste en culture inhibe de 50% leur synthèse de GH. Ceci suggère que le syncytiotrophoblaste qui baigne dans le sang maternel, répond aux variations des taux de glucose maternel par des modifications de GH placentaire.

2 - Le récepteur de l'hormone de croissance (GHR)

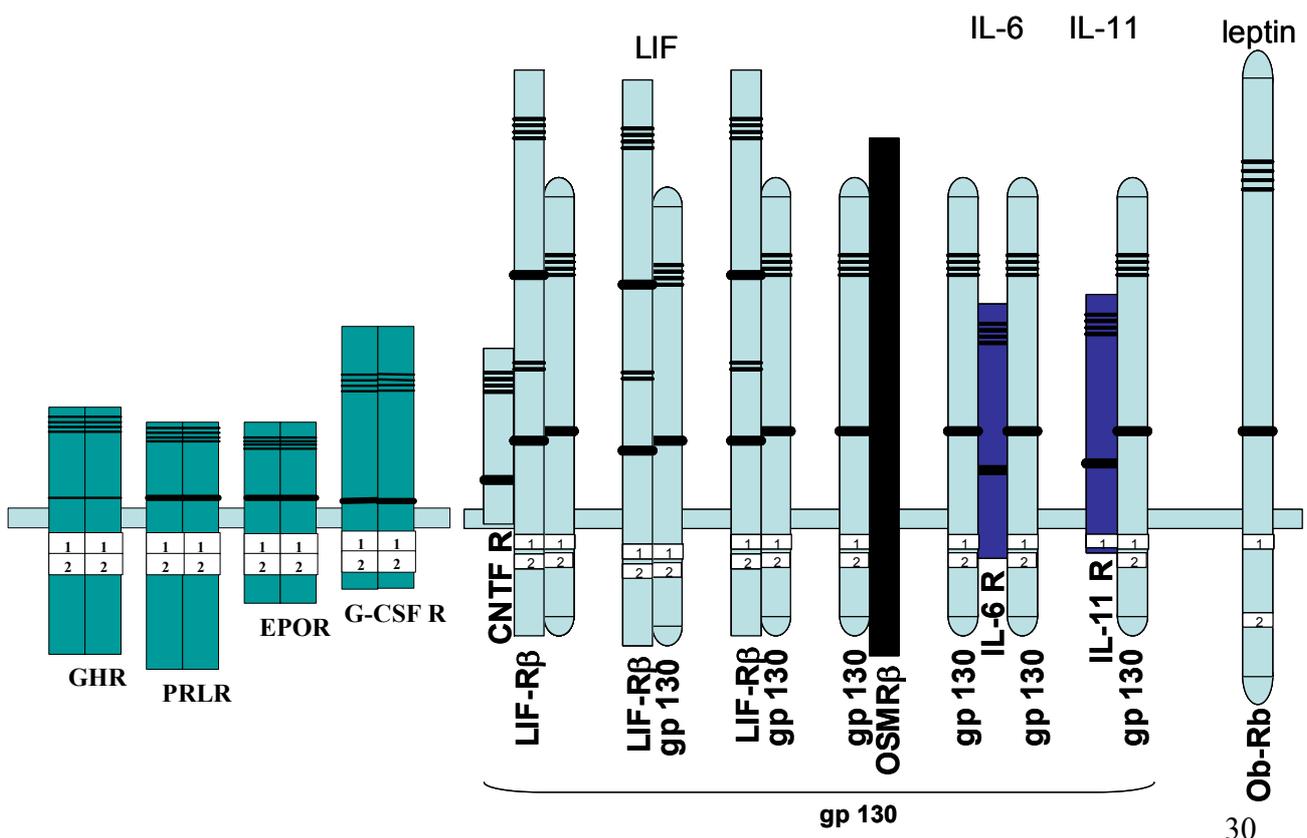
La corrélation entre l'effet biologique de la GH et la liaison à son récepteur a été démontrée dès 1983 dans des cultures d'adipocytes (Grichting *et al.* 1983). Dès 1999, l'équipe de Waters dénombrait plus de 450 actions spécifiques de la GH dans 84 types cellulaires différents. Ces effets dépendent étroitement de la liaison de l'hormone à des protéines spécifiques dont le GHR est l'élément essentiel. Il appartient au sous-type 1 de la superfamille des récepteurs des cytokines (Bazan 1989) dont il est le premier à avoir été cloné (Leung *et al.* 1987). Depuis, de très nombreuses études sur le GHR, la régulation de son gène et son mécanisme d'action, ont été publiées.

2.1 - Le GHR appartient à la super famille des récepteurs des cytokines

La classification de la famille des récepteurs des cytokines ou hématopoïétiques a été établie sur l'existence de domaines structuraux communs dans les régions extracellulaire (NH₂) et intracellulaire (COOH) des différents récepteurs (**Figure 7**). Le sous-type I regroupe les récepteurs qui ne possèdent qu'un seul domaine transmembranaire, ils ont en commun, 14 - 44% d'homologies dans le domaine extracellulaire, deux paires de résidus cystéine et un motif conservé, tryptophane-sérine (WSXWS, où X est un acide aminé quelconque) dans la partie C-terminale du domaine extracellulaire (Bazan 1990 ; Cosman *et al.* 1990 ; Mertani *et al.* 1999). Ce motif est présent sur tous les membres de cette super famille excepté sur le GHR où il est remplacé par le motif YXXFS (où X est une glycine, sérine, lysine ou un acide glutamique selon l'espèce considérée) (Argetsinger et Carter-Su 1996). Leur domaine intracellulaire est caractérisé par la présence de deux motifs conservés riches en proline, appelés boîtes 1 et 2 qui sont impliquées dans la liaison directe des protéines Janus Kinases (JAK) (O'Neal et Yulee 1993). La boîte 1 est constituée de 8 acides aminés (ψ -X-X-X-AL-P-

X-P, où ψ représente un résidu hydrophobe, X un acide aminé quelconque, AL, un résidu aliphatique et P une proline). Sur le GHR cette séquence se lit ILPPVPVP (Argetsinger et Carter-Su 1996). L'autre motif appelé boîte 2, constitué d'une séquence d'acides aminés hydrophobes, terminée par un ou deux résidus positivement chargés, est présent dans la plupart de ces récepteurs. Sur le GHR, cette boîte 2 est approximativement localisée à 30 acides aminés de la boîte 1 et recouvre 15 acides aminés. Une autre particularité importante du domaine intracellulaire de ces récepteurs est l'absence d'une séquence consensus tyrosine kinase.

Ce sous-type I comprend une vingtaine de membres : les récepteurs de la GH (GHR), de la PRL (PRLR), de l'Erythropoïétine (EPOR), de la Thrombopoïétine (TPOR), du « Granulocyte Colony Stimulating Factor » (G-CSFR), « du Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor » (GM-CSFR), du « Ciliary Neutrophic Factor » (CNTFR), de la chaîne β du « Leukemia Inhibitory Factor » (LIFR) de la leptine et des interleukines (IL- 2-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15) (Cosman 1993, Kitamura et al. 1994). Dans le sous type II, les récepteurs identifiés sont l'IFN- α R, l'IFN- γ R et le facteur tissulaire (TF), cofacteur membranaire du facteur VII de coagulation. Deux autres sous-types incluent des récepteurs de cytokines apparentés d'une manière plus lointaine, dont les récepteurs du TNF « Tumor Necrosis Factor » et du NGF « Nerve Growth Factor » (Taniguchi 1995).



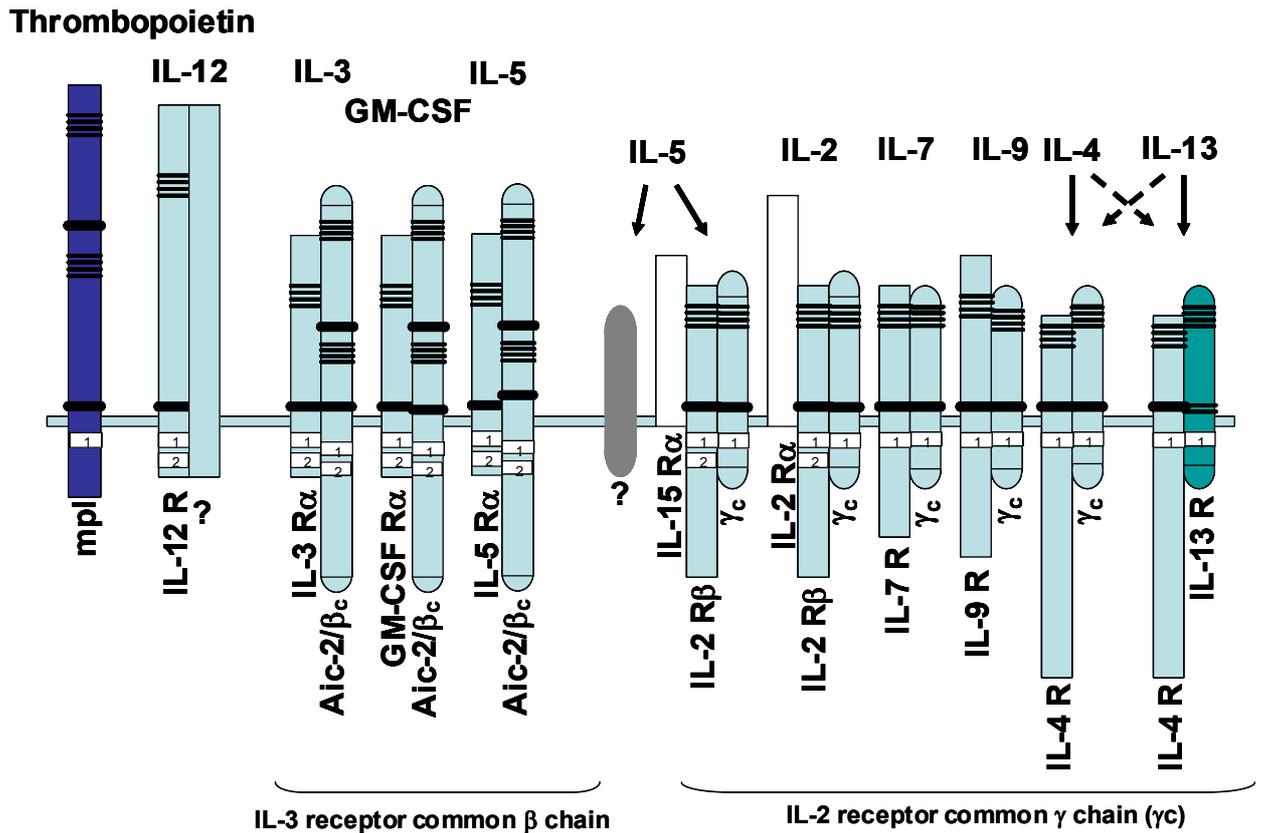


Figure 7 : Représentation schématique des différents membres de la superfamille des récepteurs des cytokines. Growth Hormone (GH) ; Prolactin (PRL) ; Erythropoietin (EPO) ; Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) ; Ciliary neutrophilic factor (CNTF) ; Leukemia-inhibitory factor (LIF) ; Oncostatin M (OSM) ; Leptin (Ob-rb) ; Thrombopoietin (mpl) ; Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ; Interleukins (IL 2-7, 9-13 et 15) ; Interferon (IFN- γ et α). Les résidus cystéine extracellulaires sont représentés par 4 traits fins, le motif WSXWS par une boîte noire. Les boîtes blanches correspondent aux boîtes 1 et 2 du domaine intracellulaire (d'après Smit *et al.* 1999).

2.2 - Son gène

Le GHR (**Figure 8**) a été cloné et caractérisé d'abord chez l'homme et la souris (Talamantes 1994). Chez l'homme il est situé sur la partie proximale du bras court du chromosome 5 dans la région p13.1-p12 et chez la souris sur le chromosome 15 (Barton *et al.* 1989). Le gène du GHR humain s'étend sur une longueur supérieure à 87 kb, il est composé de 10 exons dont la taille varie de 66 à 3400 bp (Godowski *et al.* 1989). Une analyse par RT-PCR suivie du séquençage de l'ARNm du GHR ont d'abord permis de mettre en évidence 8 régions 5'UTRs « untranslated regions », V1 à V8 dont 4 ont été clonés : V1, V4, V7 et V8.

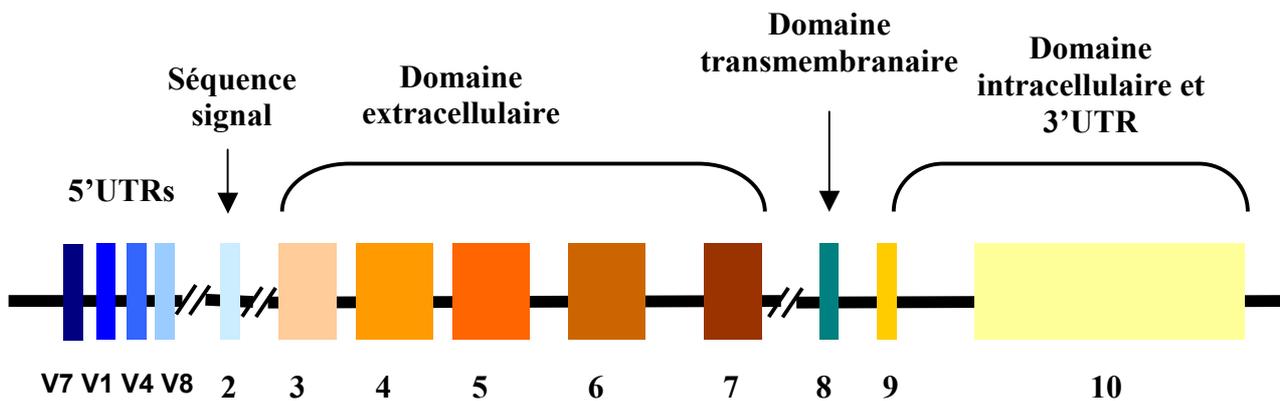


Figure 8 : Structure génomique du GHR humain. La ligne horizontale noire représente les introns. Les rectangles représentent les exons numérotés de 2 à 10 avec leur taille approximative (d'après Edens et Talamantes 1998).

Ces exons alternatifs sont suivis de 9 exons codants (2 à 10). L'exon 2 code pour les 11 pb finales de la séquence 5'UTR, les 18 acides aminés de la séquence signal, les 5 premiers acides aminés du domaine extracellulaire. Les exons 3 à 7 codent pour la majeure partie du domaine extracellulaire. L'exon 8 code pour les 3 acides aminés qui terminent le domaine extracellulaire, les 24 acides aminés du domaine transmembranaire et les 4 premiers acides aminés du domaine intracellulaire. Les exons 9 et 10 codent pour les 346 acides aminés restant du domaine intracellulaire (Edens et Talamantes 1998).

Tout récemment, 9 régions 5'UTR (V1–V9) ont été cartographiées chez l'homme dans la région 5' du GHR de 40 kb (Goodyer *et al.* 2001a) (**Figure 9**). Un « *cluster* » de 3 exons, V2-V9-V3, appelé module A se trouve dans la partie la plus éloignée de la région 5' tandis qu'un autre « *cluster* » de 4 exons, V1, V4, V7, V8 appelé module B est situé plus en aval. L'exon V6 est situé à mi-chemin entre ces deux modules et l'exon V5 est adjacent à l'exon 2. La régulation de ces exons 5'UTR peut affecter le niveau d'activité du hGHR. Ces mêmes auteurs ont en fait démontré que la transcription à partir des exons V1, V4, V7 et V8 est sous le contrôle d'une régulation spécifique dans de nombreux tissus. C'est ainsi que ces transcrits sont uniquement présents dans le foie postnatal alors qu'ils sont quasiment absents du foie fœtal et dans les tumeurs hépatiques (Zogopoulos *et al.* 1996, Goodyer *et al.* 2001a). A l'opposé, les transcrits dérivés de V2, V3, V5 et V9 sont aussi bien détectés dans le foie fœtal que dans le foie postnatal. Ces observations suggèrent l'intervention de plusieurs promoteurs dans la régulation de l'expression du gène du hGHR.

Deux nouveaux variants V3 ont été identifiés en plus de l'exon V3 situé dans le module A. L'exon V3a/b est situé entre le module B et l'exon 2, l'exon V3b, quant à lui, se trouve en amont du module A à une distance encore inconnue. Ils possèdent en commun des

séquences homologues aux éléments Alu. Les transcrits hGHR issus de ces exons sont largement exprimés dans les tissus fœtaux et postnataux et semblent spécifiques de l'homme et des primates (Goodyer *et al.* 2001b).

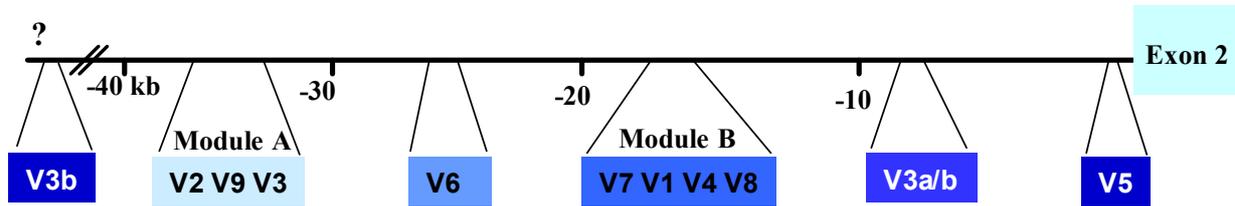


Figure 9 : Représentation schématique des positions relatives des 9 séquences 5'UTR connues sur la région 5' du gène du hGHR (d'après Goodyer *et al.* 2001b).

2.3 - Régulation de l'expression du gène du GHR

De nombreux facteurs incluant le développement, l'état hormonal et nutritionnel agissent sur la régulation de l'expression du gène du GHR tant au niveau transcriptionnel que traductionnel.

2.3.1 - Effets de la GH sur l'expression du GHR

- *In vivo*, il existe effectivement une régulation dynamique du nombre des GHR corrélée aux fluctuations plasmatiques de GH mais les études des effets de la GH sur l'expression du GHR présentent souvent des résultats contradictoires. Les divergences résultent à la fois des conditions d'études, *in vivo vs in vitro*, de la durée du traitement par la GH, chronique ou aiguë et le type cellulaire étudié. Ainsi, un traitement chronique par la GH augmente sa liaison dans le foie de rat, de porc et de mouton (Gluckman *et al.* 1990). Le nombre de récepteurs décroît rapidement après hypophysectomie chez le lapin et le mouton suggérant que la GH régule positivement l'expression du GHR (Posner *et al.* 1980). Un traitement aigu par une seule injection de GH à des rats hypophysectomisés provoque en 1 heure, une augmentation du taux de GHR, mais ce taux diminue de 53% après 6 heures et revient à la normale 12 heures après l'injection (Maiter *et al.* 1988).

Les souris transgéniques surexprimant la bGH ont une augmentation significative des sites de liaison GH-spécifiques dans le foie par rapport aux souris contrôles (non transgéniques) montrant que l'expression du GHR est bien stimulée par la surexpression de GH. Cette régulation est tissu-spécifique puisque chez ces mêmes animaux, l'expression du GHR est régulée négativement dans le rein (Chen *et al.* 1997).

De la même façon, chez le porc nouveau-né un traitement par de la GH exogène pendant 7 jours, produit une augmentation importante de l'expression des GHR et d'IGF-I dans le foie alors que dans le muscle seulement le taux d'IGF-I est augmenté supposant des régulations post-transcriptionnelles ou des mécanismes de signalisation cellulaire différents (Lewis *et al.* 2000).

Chez l'homme, la mesure *in vivo* de l'expression du hGHR est difficile pour des raisons évidentes d'éthique. Néanmoins, plusieurs travaux ont montré que le taux de GHBP plasmatique est le reflet précis de la quantité de GHR hépatique. Cette relation est généralement acceptée dans la mesure où l'on admet que la majorité de la GHBP est d'origine hépatique et que son mode de production résulte du clivage protéolytique du hGHR. Elle est confortée par l'absence de GHBP dans le sérum de patients atteints du syndrome de Laron, maladie autosomique récessive caractérisée par un retard de croissance sévère dû à des délétions plus ou moins complexes du gène du GHR produisant des formes plus ou moins tronquées réduisant ou inhibant ainsi la liaison de la GH (Meacham *et al.* 1993). Toutes les variations d'expression de la GHBP sont mesurées dans des conditions pathologiques de traitement substitutif chez des enfants atteints du syndrome de type I de déficience en GH. Chez ces enfants, le traitement par la GH entraîne une augmentation du taux de GHBP sérique (Postel-Vinay *et al.* 1991). Ce résultat est contraire à celui de Mandel *et al.* 1995 qui affirme que 1 an de traitement par la GH n'entraîne pas de variations significatives du taux plasmatique de GHBP chez des enfants déficients en GH. De la même façon, chez des patients dont l'hypophyse tumorale a été en partie irradiée ou excisée, la diminution du taux de GH n'a aucune influence sur le taux basique de GHBP (Davila *et al.* 1994).

• ***In vitro***, les études divergent également selon les cellules utilisées. Certains auteurs ont montré que la GH régule négativement l'expression du hGHR dans les fibroblastes et les lymphocytes IM-9 (Murphy et Lazarus 1984, Lesniak et Roth 1976). D'autres affirment que l'adjonction de GH à une concentration de 50 ng/mL à des cultures de chondrocytes épiphysaires provoque une nette augmentation du taux d'ARNm codant pour le GHR (Nilsson *et al.* 1990). Plus récemment, Mullis *et al.* 2000 montrent que le GHR est fonctionnel dans des cultures primaires de cellules thyroïdiennes et que l'addition de GH augmente la transcription de son gène dès la concentration de 25 ng/mL. Ils précisent de surcroît que la TSH n'a pas un impact majeur sur la régulation du gène du GHR / GHBP.

Les cellules d'hépatocarcinome humain (HuH 7) traitées par la hGH recombinante à des doses physiologiques (50 ng/mL) présentent une augmentation maximale de l'expression du GHR en 3 ou 4 heures et ce taux est maintenu pendant 48 heures (Mullis *et al.* 1991). Ces

résultats sont retrouvés par Nuoffer *et al.* (2000) qui, sur cette même lignée, démontrent par PCR quantitative que la régulation de la transcription du gène du hGHR, est identique après stimulation par des concentrations physiologiques de GH 22 kDa et de GH 20 kDa. Ils précisent cependant qu'à des concentrations supraphysiologiques (150 ng/mL) la diminution de la transcription observée est moins importante après stimulation par la GH 20 kDa. D'une manière comparable, une récente étude de l'impact de différents variants de GH sur cette lignée HuH 7 a montré que l'addition de la GH 22 kDa (50 ng/mL) augmente d'une manière significative l'expression du GHR en 1 heure alors qu'une concentration supra-physiologique de 500 ng/mL l'inhibe dans les 3 premières heures ; l'addition de R183H, une forme mutée de GH, responsable du syndrome de type II de déficience en GH et dont l'Arg₁₈₃ est mutée en His montre paradoxalement la même bioactivité (Deladoëy *et al.* 2002). Deux autres causes sont alors évoquées pour expliquer la pathologie : cette mutation provoque une diminution de l'expression du gène de GH ou bien, située à l'extrémité de l'hélice 4, elle pourrait affecter l'affinité de liaison du site 1 (Deladoëy *et al.* 2002).

La GH et certains de ses variants auraient donc *in vitro* et à des concentrations physiologiques un effet stimulateur sur la transcription de son propre récepteur, l'effet inhibiteur résultant d'une concentration élevée serait plus ou moins important selon le variant considéré impliquant alors une diminution de la capacité de l'hormone à former le complexe 1 : 1 avec le GHR et / ou la GHBP.

La GHBP a également un effet sur la régulation du GHR. Trois différentes formes de GHBP humaine (recombinante non glycosylée, recombinante glycosylée et la forme extraite de sérum humain) ont été ajoutées à différentes concentrations à des cellules HuH 7. Les trois formes utilisées donnent le même résultat. A des concentrations physiologiques (50 pmol/L), une augmentation significative du taux d'ARNm codant pour le GHR est montrée par PCR quantitative. A l'opposé, une concentration élevée (500 pmol/L) diminue considérablement ce taux (Mullis *et al.* 1997).

2.3.2 - Effets des stéroïdes sur l'expression du GHR

Un traitement par les œstrogènes augmente l'expression du GHR chez le rat (Bennet *et al.* 1996). Les corticostéroïdes et la dexaméthasone provoquent une augmentation du taux de GHR hépatique tandis que la testostérone inhibe son expression chez la souris (Camarillo *et al.* 1998). En revanche, *in vitro*, sur des cultures primaires d'hépatocytes de rat, une diminution de l'expression du GHR est détectable 6 heures après l'adjonction de fortes concentrations de dexaméthasone (10^{-6} M). Dans les fibroblastes 3T3-F442-A, la

dexaméthazone entraîne une diminution de 50% du nombre de GHR après une stimulation de 6 heures (King *et al.* 1996). Ces mêmes auteurs montrent dans les cellules CHO (« Chinese Hamster Ovary ») transfectées avec des formes mutées du GHR que les acides aminés 455-506 et les tyrosines 333 et 338 sont indispensables pour que la dexaméthazone produise une inhibition maximale de la liaison GH / GHR. Cette inhibition de la synthèse ou de la capacité de liaison du GHR est principalement responsable du retard de croissance observé chez les enfants traités par les glucocorticoïdes (Beauloye *et al.* 1999).

La souris gestante présente une expression du GHR hépatique 6 fois plus importante que la souris non gestante. Cette régulation positive est attribuée à une augmentation significative de l'activité transcriptionnelle du promoteur 5'UTR L1 spécifique du foie (Ilkbahar *et al.* 1999).

2.3.3 - Impact de la nutrition sur l'expression du GHR

Les taux de GHR sont en parfaite corrélation avec l'état nutritionnel. Chez les mammifères, la sous-nutrition et le jeûne conduisent à un état de résistance à la GH caractérisée par une augmentation des taux de GH circulante et une diminution de la concentration en IGF-I (Bornfeldt *et al.* 1989). Des études chez le rat ont confirmé la diminution du nombre des GHR hépatiques après une période de jeûne (Strauss et Takemoto 1990). Les résultats sont identiques chez l'homme où la malnutrition entraîne une sévère réduction du taux de GHR en particulier chez le sujet âgé (Shuto *et al.* 1999).

Un modèle *in vitro* a été utilisé pour contrôler les effets du glucose et de certains acides aminés sur l'expression du gène du GHR. Sur une culture primaire d'hépatocytes, la suppression du glucose du milieu de culture pendant 40 heures provoque une réduction de plus de 45% de l'expression du GHR en présence de GH. La suppression de différents acides aminés comme l'arginine, la proline, le tryptophan ou la valine ne fait qu'altérer faiblement le taux d'ARNm codant pour le GHR (Brameld *et al.* 1999).

2.4 - Sa structure protéique

La masse moléculaire calculée à partir de la séquence amino-acidique est de 70 kDa alors qu'expérimentalement, sa masse se situe entre 100 et 130 kDa (Harding *et al.* 1994, Zhou *et al.* 1994). Les modifications post-transcriptionnelles comme les glycosylations et les ubiquitinations sont probablement responsables des différences constatées. Il est en effet déterminé qu'une glycosylation ajoute environ 10 kDa au récepteur.

Le séquençage des ADNc codant pour le GHR de l'homme, du rat et de bien d'autres espèces a permis de préciser les séquences exactes de ces protéines. Le hGHR a une séquence primaire de 638 acides aminés, incluant un peptide signal de 18 acides aminés, un domaine transmembranaire de 24 acides aminés et deux domaines extra et intracellulaire, de 246 et 350 acides aminés respectivement (**Figure 10**).

Le domaine extracellulaire est constitué de deux domaines, qui s'étendent, l'un des acides aminés 1 à 123 et l'autre des acides aminés 128 à 238. Ils sont reliés par 4 résidus (124-127) de la chaîne polypeptidique (de Vos *et al.* 1992). Chaque domaine contient 7 brins β arrangés de manière à former deux feuillets β anti-parallèles. Cette structure secondaire est également trouvée dans la fibronectine, les immunoglobulines et le CD4. Trois ponts disulfures sont situés entre les acides aminés Cys₃₈₋₄₈, Cys₈₃₋₉₄, Cys₁₀₈₋₁₂₂ (Fuh *et al.* 1990).

Le GHR contient, dans sa portion extracellulaire, 5 sites potentiels de N-glycosylation. Des études de mutagenèse dirigée ont montré l'importance de ces sites chez le porc par le remplacement des résidus asparagine en position, 28, 97, 138, 143 et 182 par les résidus glutamine. Plus précisément, une seule altération n'induit aucun changement dans la liaison de la GH à son récepteur, alors que lorsque les 5 asparagine sont mutées en glutamine, la liaison de la GH est réduite de 20 fois (Harding *et al.* 1994). Les mutations des alanines du domaine extracellulaire du GHR ont permis d'identifier parmi les 33 résidus situés à l'interface avec le site I de l'hormone, 9 résidus essentiels pour son affinité de liaison (Clackson et Wells 1995, Wells 1996). Le rôle du motif YGEFS du GHR (**Figure 10**) a été également étudié par mutagenèse dirigée : les mutations de Y₂₂₂ et S₂₂₆ diminuent l'affinité de liaison et supprime la transduction du signal tandis que la substitution des G₂₂₃, E₂₂₄ et F₂₂₅ n'a aucun effet (Baumgartner 1994).

Dans sa partie intracellulaire, le GHR possède 19 sites potentiels d'ubiquitination qui sont impliqués dans la liaison et l'internalisation du complexe GH-GHR (Strous *et al.* 1997). Un domaine spécifique du GHR appelé « ubiquitin-dependent endocytosis » (Ube) dont la séquence amino-acidique, DSWVEFIELD, régule le phénomène d'internalisation par un nouveau système de conjugaison à l'ubiquitine (Govers *et al.* 1999). Tout récemment, Kerkhof et Strous (2001) ont montré que la mutation en alanine de la Phe₃₂₇ du motif Ube empêche l'ubiquitination et l'internalisation du GHR et que le système ubiquitine-protéasome est non seulement impliqué dans l'endocytose mais dans la dégradation lysosomale du complexe GH-GHR. La même équipe confirme que la voie ubiquitine-protéasome régule le nombre de GHR membranaires en contrôlant son internalisation constitutive et sa disponibilité pour la signalisation (van Kerkhof *et al.* 2002).

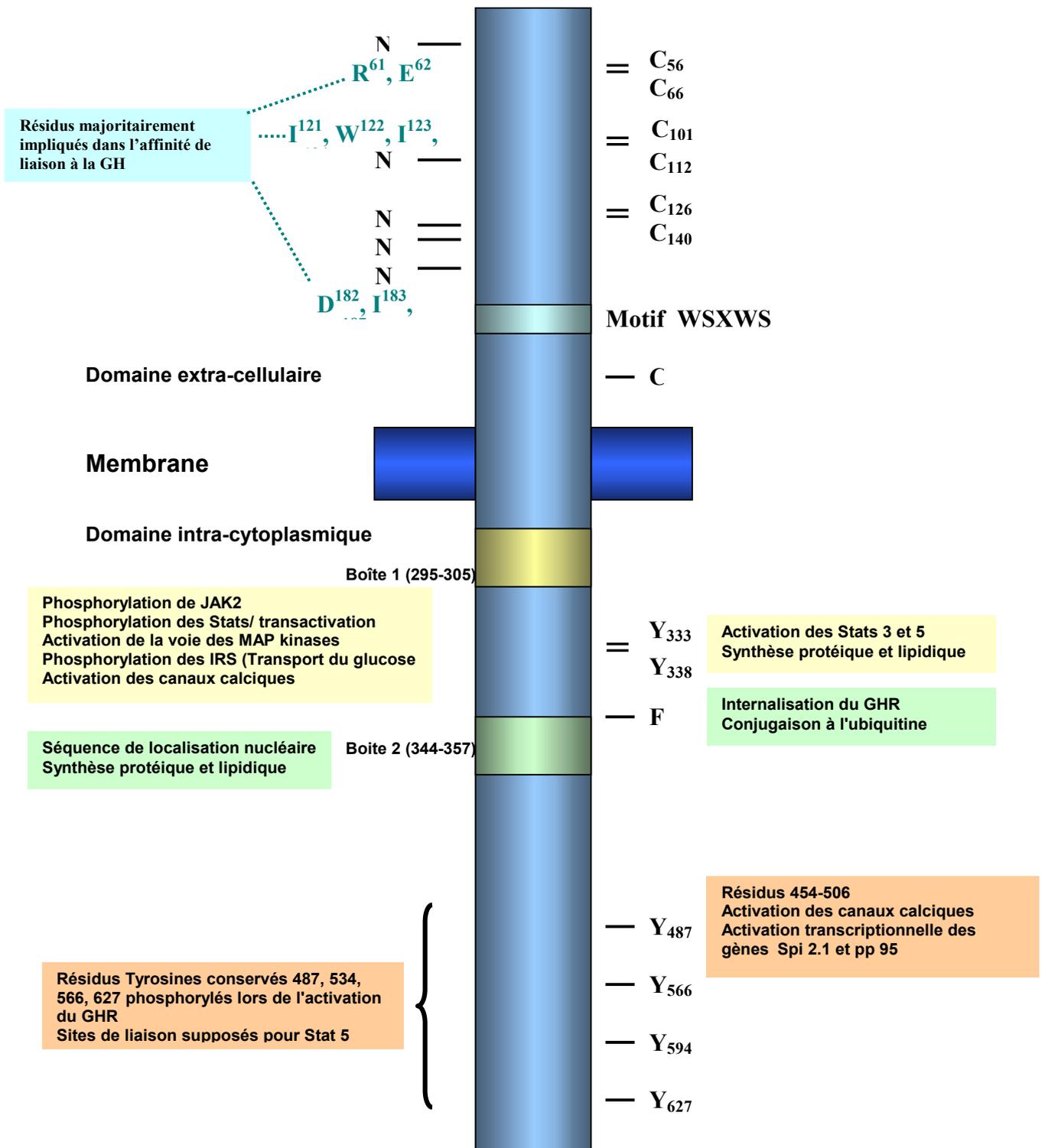


Figure 10 : Schéma du récepteur de l'hormone de croissance avec ses divers sites fonctionnels

2.5 - Sa distribution dans l'organisme

2.5.1 - Localisation tissulaire

Si initialement, le foie représentait le site essentiel de liaison de la GH compte tenu de l'abondance de ses récepteurs, les travaux de ces dix dernières années ont montré la présence du GHR dans de nombreux tissus et chez de nombreuses espèces. Ainsi chez le rat, Mertani et Morel (1995), détectent l'expression du GHR, par hybridation *in situ*, dans la plupart des tissus. La plus forte expression est mesurée dans le foie, les lobes antérieur et intermédiaire de l'hypophyse, la zone médullaire externe du rein, l'épiderme de la peau, la corticosurrénale, le cœur et le muscle (**Figure 11**).

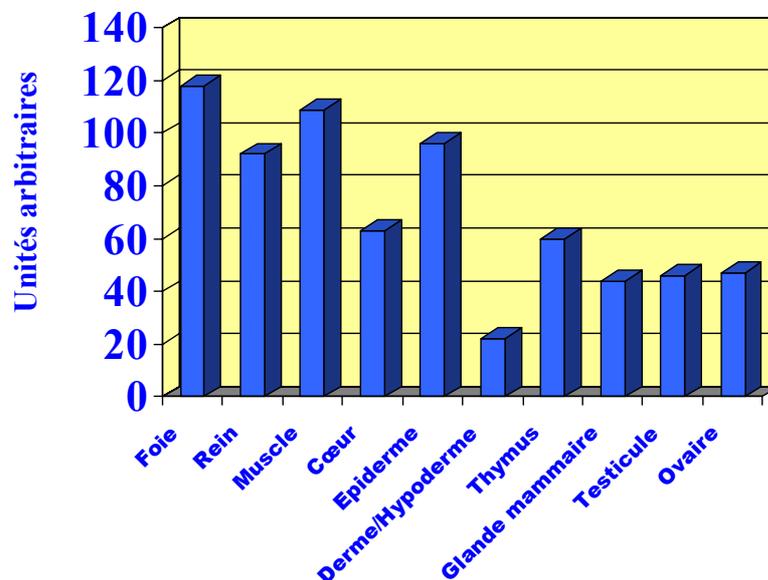


Figure 11 : Quantification des ARNm codant pour le GHR dans divers organes humains (d'après Mertani *et al.* 1995).

Malgré sa nature ubiquitaire, sa localisation intratissulaire est totalement spécifique et définit pour la GH des sphères d'activité soit directe soit indirecte via IGF-I.

- Plusieurs auteurs, (Garcia Aragon *et al.* 1992, Pantaleon *et al.* 1997), ont montré la présence du GHR (protéine et ARNm) dès la première division (stade 2 cellules), récepteur que l'on retrouve au stade morula et tout au long du développement embryonnaire. La synthèse hépatique est détectable dès le 19^{ème} jour de la gestation puis augmente régulièrement pendant le développement postnatal pour atteindre les niveaux exprimés chez

l'adulte. A ce stade de développement, une synthèse de GHR est également mise en évidence dans le rein, l'iléon et le poumon (Walker *et al.* 1992). Chez le fœtus humain de 15 à 20 semaines, une expression du GHR est détectée dans les chondrocytes de la plaque osseuse et dans les fibroblastes dermiques suggérant, contrairement au dogme de l'époque, l'intervention de la GH ou d'un peptide apparenté dans le développement et la différenciation des tissus fœtaux (Werther *et al.* 1993). Une étude de l'ontogénèse du GHR dans l'hypothalamus de rat montre son apparition dès le 15^{ème} jour de développement embryonnaire, sa synthèse est maximale au 7^{ème} jour post natal et décroît à partir du 35^{ème} jour post-natal (Hasegawa *et al.* 1993). Ces résultats ont été en évidence par immunohistologie et hybridation *in situ*, par Lobie *et al.* (1993) qui montrent, en plus, la présence du GHR dans les feuilletts du cortex cérébral, dans les neurones du thalamus et de l'hypothalamus, chez le rat nouveau né.

- *Dans le tissu osseux*, la présence du GHR semble limitée à la période du développement. En effet chez le jeune enfant et le lapin nouveau-né, l'immunoréactivité pour le GHR est très importante dans les zones prolifératives de la plaque osseuse (Barnard *et al.* 1988, Werther *et al.* 1990). L'expression du gène du récepteur est mise en évidence dans les ostéoblastes de calvaria de rats nouveau-nés (Morel *et al.* 1993). La fin de la croissance épiphysaire chez le lapin s'accompagne d'une forte diminution du nombre des récepteurs suggérant que le rôle de la GH est plus important dans la différenciation des préchondrocytes en chondrocytes matures que dans le maintien de la masse osseuse (Werther *et al.* 1990).

- *Dans le système digestif*, Lobie *et al.* 1990a détectent par immunohistochimie, chez le rat, la présence du GHR dans les glandes sublinguales et sous-maxillaires, dans l'œsophage, l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le colon ainsi que dans le foie, le pancreas exocrine et endocrine. Quelques années plus tard, les ARNm codant pour le GHR sont localisés par hybridation *in situ*, northern blot et PCR liquide dans les mêmes organes chez l'homme (Delehay-Zervas *et al.* 1994).

- *Dès 1992, l'expression du GHR était mise en évidence chez le rat, dans différentes régions du cerveau* incluant le thalamus, la région septale, l'hippocampe et l'hypothalamus (Burton *et al.* 1992). Ces auteurs montrent également une co-expression du GHR et du SRIF dans certains neurones des noyaux péri- et para-ventriculaires suggérant que la GH agit directement sur le cerveau et qu'elle participe à la régulation de sa propre sécrétion par une action directe sur les neurones hypothalamiques à SRIF. La GH ¹²⁵I se fixe dans l'hypothalamus et l'hippocampe à des taux relativement faibles, cependant, dans le plexus

choroïde le taux de fixation est deux fois plus important que dans l'hypothalamus (Nyberg et Burman 1996).

- *Dans l'hypophyse de rat et dans l'hypophyse humaine*, trois populations endocrines expriment le GHR au niveau transcriptionnel et traductionnel. Ce sont les cellules somatotropes, gonadotropes et les cellules à prolactine. Ni l'ARNm ni la protéine du GHR n'ont été détectés dans les cellules corticotropes et thyrotropes, ce qui suppose que ces types cellulaires ne sont pas des cibles directes de la GH (Mertani *et al.* 1994, Mertani *et al.* 1995).

- *Dans les organes immunitaires*, l'expression du gène du GHR a été mise en évidence dans les cellules B et T, et les monocytes à la fois chez l'homme et la souris (Hull *et al.* 1996). Cette expression est facilement détectable dans les thymocytes bovins aussi bien au stade embryonnaire tardif que chez l'adulte (Chen *et al.* 1998). Chez la souris toutes les lignées hématopoïétiques de la moelle osseuse expriment le GHR tandis que seules les sous populations CD4+ et CD8+ l'expriment dans le thymus. Cinquante pour cent des splénocytes et 20% des lymphocytes circulants l'expriment également avec une prédominance de cellules B positives (Dardenne *et al.* 1998).

- *Dans la glande mammaire*, une augmentation de l'immunoréactivité du GHR a été primitivement observée, chez la rate gestante, dans les cellules épithéliales ductales et alvéolaires prolifératives et dans les cellules myoépithéliales qui bordent l'épithélium glandulaire (Lincoln *et al.* 1990). L'immunocytochimie révèle la présence du GHR dans la glande mammaire canine normale et pathologique, avec une distribution hétérogène en particulier dans l'adénocarcinome (van Garderen *et al.* 1999).

2.5.2 - Localisation cellulaire

La présence intracellulaire de sites de liaison spécifiques de la GH a été préalablement décrite dans des fractions microsomales, incluant l'appareil de Golgi (Bick *et al.* 1989), les mitochondries et les corps lysosomaux (Bergeron *et al.* 1978, Postel-Vinay *et al.* 1982, Gorin *et al.* 1984). De plus, l'appareil de Golgi contient de grande quantité de GHR nouvellement synthétisé sous l'induction de la GH (Vleurick 1999).

La notion qu'un récepteur transmembranaire puisse passer de la surface cellulaire au noyau a été largement controversée puis admise et largement étudiée depuis une quinzaine d'années. La mise au point d'anticorps monoclonaux dirigés contre le GHR et en particulier contre sa partie extracellulaire, par le groupe de Waters, a permis de définir la distribution cellulaire de ce récepteur (Barnard *et al.* 1984, 1989). C'est ainsi que Lobie *et al.* (1990b)

visualisèrent le GHR aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau de diverses cellules de nombreux organes et qu'ils caractérisèrent ce GHR nucléaire comme identique sur les plans antigénique et physicochimique au GHR cytosolique (Lobie *et al.* 1991). Ils montrèrent ensuite que le domaine intracellulaire du GHR était indispensable à sa translocation nucléaire, translocation, par ailleurs, ligand-dépendante (Lobie *et al.* 1994).

2.6 - Formation du complexe GH-(GHR)₂

La première étape consiste en l'interaction physique du domaine extracellulaire du GHR avec les deux interfaces de la molécule de GH (Cunningham *et al.* 1991, de Vos *et al.* 1992, Clackson et Wells 1995). Nous avons mentionné précédemment (§ 1.3.3.4) les résidus impliqués dans la liaison de l'hormone à son récepteur. Nous précisons ici que le site 1 présente une interface légèrement concave ($\approx 12,30 \text{ nm}^2$) et composée des résidus des hélices 1 et 4 et de la région inter-hélicoïdale entre les hélices 1 et 2. La substitution d'une alanine a révélé un épitope fonctionnel au point de contact du site 1, une séquence où 8 des 31 résidus qui la composent possèdent 85% de l'activité de liaison (Wells 1996). Le site 2 présente une interface moins importante et plus plate ($\approx 9 \text{ nm}^2$) composée des résidus situés sur les hélices 1 et 3 et de la région N-terminale. Seulement 8% de l'activité totale de liaison lui sont attribués. Une chaîne de 6 résidus (P₆₁, R₆₄, K₁₇₂, T₁₇₅, F₁₇₆ et R₁₇₈) de la molécule de GH intervient dans le maintien de la liaison aux récepteurs (Wells 1996).

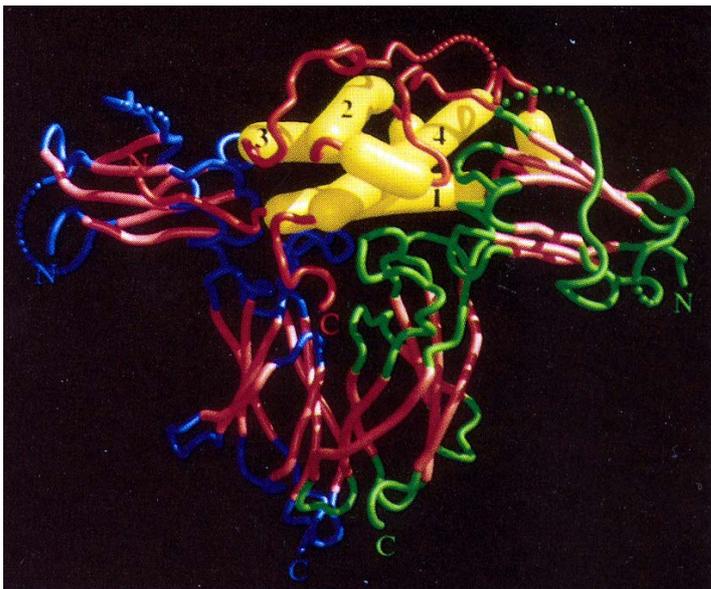


Figure 12 : Structure du complexe GH-(GHR)₂, l'hormone est représentée en jaune tandis que les boucles de liaison de chaque molécule de récepteur sont représentées les unes en bleu, les autres en vert (d'après de Vos *et al.* 1992).

Les analyses par cristallographie aux rayons X ont démontré qu'une seule molécule de GH se lie aux domaines extracellulaires de 2 molécules de GHR. La GH induit la dimérisation de son récepteur par un phénomène séquentiel qui implique la fixation initiale de son site 1 suivie par la fixation de son site 2 sur un deuxième récepteur aboutissant ainsi à la formation d'un complexe GH-(GHR)₂, prérequis qui garantit la réponse biologique (Fuh *et al.* 1992, Chen *et al.* 1997). Toute mutation dans le site 1 de la GH inhibe la formation du complexe, alors qu'une mutation dans le site 2 n'empêche pas la formation du complexe initial GH-GHR (Wells *et al.* 1993). C'est le cas d'un certain nanisme dû à la mutation D₁₅₂H du site 1 qui empêche la dimérisation du récepteur entraînant ainsi un syndrome de résistance à la GH ou syndrome de Laron (Duquesnoy *et al.* 1994). Le même phénomène se produit lorsqu'un excès de GH *in vitro* se lie à tous les GHR par son site 1 bloquant ainsi la dimérisation avec un second GHR sur le site 2 (Ilondo *et al.* 1994).

La réalisation d'un antagoniste de la GH, le G₁₂₀R, dont l'affinité de liaison du site 1 est fortement augmentée alors que celle du site 2 est diminuée, par mutation de G₁₂₀ par R est alors d'un grand intérêt (Fuh *et al.* 1992). Le modèle de souris transgénique exprimant le G₁₂₀R a une taille réduite (Chen *et al.* 1994) ; bien que le G₁₂₀R permette à un moindre degré la dimérisation et l'internalisation, il n'induit pas l'activation des STAT (Harding *et al.* 1996).

D'une manière intéressante, Chen *et al.* (1997) ont également montré que certaines mutations dans le domaine impliqué dans la dimérisation peuvent augmenter la sensibilité à la GH. Il est aussi possible d'activer le récepteur par un anticorps bivalent (mAb 263) et cet anticorps a une bioactivité *in vivo*, renforçant l'idée que la dimérisation est indispensable à la signalisation (Rowlinson *et al.* 1998). La formation du complexe GH-(GHR)₂ apparaît donc comme le garant de la réponse biologique qui implique l'internalisation du complexe formé et l'activation des différentes voies de signalisation.

3 - Internalisation du complexe GH-(GHR)₂

Lorsque de la GH bovine radioactive est injectée à un rat, le marquage apparaît au niveau des membranes plasmiques hépatiques, des endosomes et des lysosomes (Husman *et al.* 1988). Ces mêmes études montrent que la concentration de GH est 40 à 50 fois plus importante dans les fractions endosomales que dans l'appareil de Golgi.

Chez le poulet adulte, Vleurick *et al.* (1998), établissent une corrélation entre la GH circulante et le taux de GHR dans la fraction golgienne, 10 minutes après une injection

intraveineuse de cGH. Ils montrent ainsi que le GHR est internalisé suite à la liaison du ligand sur son récepteur. Ces mêmes auteurs ont étudié par immunofluorescence le trafic intracellulaire de la GH et de son récepteur, sur des cellules COS-7 transfectées avec le gène du cGHR. En l'absence de GH, le GHR est détecté sur la membrane plasmique et dans la région périnucléaire. L'addition de cGH provoque l'internalisation du complexe ligand-récepteur d'abord dans les endosomes puis dans de larges vésicules lysosomales et contrairement à Lobie *et al* (1994), qui avaient montré une translocation nucléaire sur des cellules CHO transfectées avec le gène du GHR de rat, ils précisent que dans leurs conditions expérimentales et chez le poulet, ni le récepteur ni le ligand ne sont transférés dans le noyau (Kühn *et al.* 2002). Des taux importants de cGHBP sont détectés dans le milieu de culture indiquant par ailleurs que le processus d'internalisation pourrait servir aussi à la production de GHBP par protéolyse du GHR dans les lysosomes (Vleurick *et al.* 1999).

Endocytose et d'une manière plus générale le trafic intracellulaire des complexes ligand-récepteur font appel à des mécanismes aussi différents que complexes. La conjonction des travaux actuels dessinent les voies principales qui font intervenir des systèmes d'organites spécifiques et des molécules régulatrices. Les molécules internalisées par pinocytose, « cell drinking », par opposition au processus de phagocytose, « cell eating », empruntent 4 mécanismes de base :

- l'endocytose faisant intervenir la clathrine dans la formation de vésicules, phénomène essentiel et commun à tous les types cellulaires (Kirchhausen 2000) ;
- l'endocytose faisant intervenir les caveolae ou potocytose (Anderson 1998), qui jouerait un rôle dans l'internalisation des récepteurs et seulement dans certaines cellules (Seto *et al.* 2002) ;
- la macropinocytose qui implique la formation de larges vésicules qui englobent le fluide extracellulaire ;
- l'endocytose complètement indépendante des systèmes clathrine, cavéoline, dynamine (molécule impliquée dans les 3 mécanismes précédents), processus soupçonné mais non encore décrit (Dautry-Varsat 2001).

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux deux premières voies impliquées dans le transport de complexe GH-(GHR)₂.

3.1 - La voie des vésicules à clathrine

Ce sont des vésicules mantelées, découvertes dans les années 70 (Pearse 1975). Elles sont présentes dans toutes les cellules nucléées de la levure à l'homme. La clathrine est une

molécule à 3 « jambes » qui partent d'un même centre pour former un triskelion. De par cette inhabituelle organisation moléculaire, les triskelions s'organisent en treillis, ils s'assemblent en hexagone ou pentagone pour former des « cages » (**Figure 13**). D'autres protéines tapissent ces vésicules, les plus importantes font partie des protéines adaptatrices (complexes AP) (Hirst et Robinson 1998).

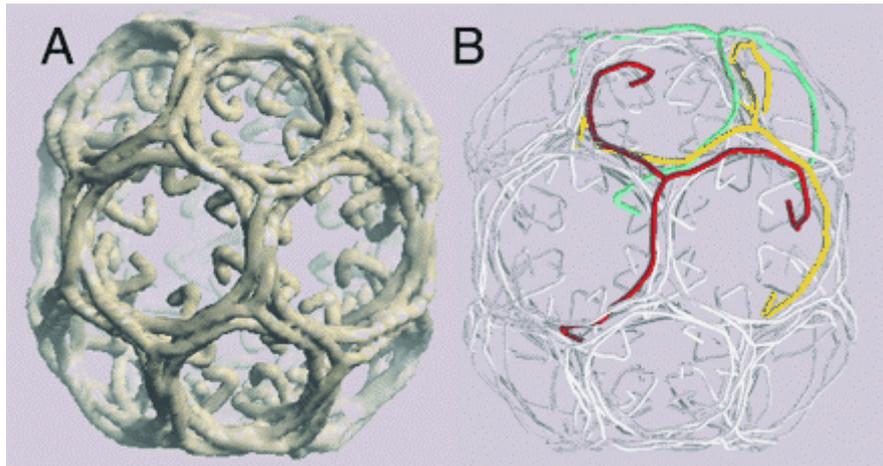


Figure 13 : Position des triskelions dans le manteau de clathrine. **A :** résultat obtenu par cryomicroscopie électronique à une résolution d'environ 2,1nm. **B :** les triskelions vert, jaune et rouge sont représentés sur un calque. Ils forment une unité asymétrique du treillis en forme de « cage » (d'après Kirchhausen 2000).

L'internalisation médiée par la clathrine est initiée par la redistribution des protéines membranaires en « clathrin coated pits » (Brodsky *et al.* 2001) (**Figure 14**). Le récepteur transmembranaire s'associe directement ou indirectement à une protéine adaptatrice AP-2 pour former un complexe qui va se lier à la clathrine (Kirchhausen *et al.* 1997) et déclencher sa polymérisation. La polymérisation participe à l'invagination de la membrane dont la courbure dépend d'une transformation de sa composition phospholipidique. L'Endophiline, une « lysophosphatidic acid acyltransferase » semble jouer un rôle important dans l'altération de la courbure membranaire (Verstreken *et al.* 2002). Lorsque l'invagination de la membrane est complète, les interactions entre la protéine AP-2 et la dynamine permettent la séparation de la vésicule formée. De récents travaux suggèrent que la dynamine peut elle-même s'organiser en tubules, elle peut ainsi former des anneaux qui enserrant le col de la vésicule pour faciliter son détachement de la membrane. A ce changement conformationnel s'ajoute

son activité GTPase qui joue un rôle important dans le recrutement d'autres protéines impliquées dans la formation des vésicules (Marks *et al.* 2001).

Lorsque les protéines sont internalisées, le manteau de clathrine se désorganise par l'action concertée de diverses protéines dont l'Auxilin, les HSP « Heat Shock Proteins » et la synaptojanine (Holstein *et al.* 1996, Newmyer et Schmid 2001). Cette petite vésicule primaire fusionne ensuite avec un endosome précoce qui lui-même fusionne avec un autre endosome (Stenmark et Zerial 2001). Les mécanismes de fusion sont complexes et leur étude sort du cadre de notre travail. Nous retiendrons simplement que les endosomes sont dirigés soit vers une voie de dégradation, soit vers une voie de recyclage (**Figure 14**).

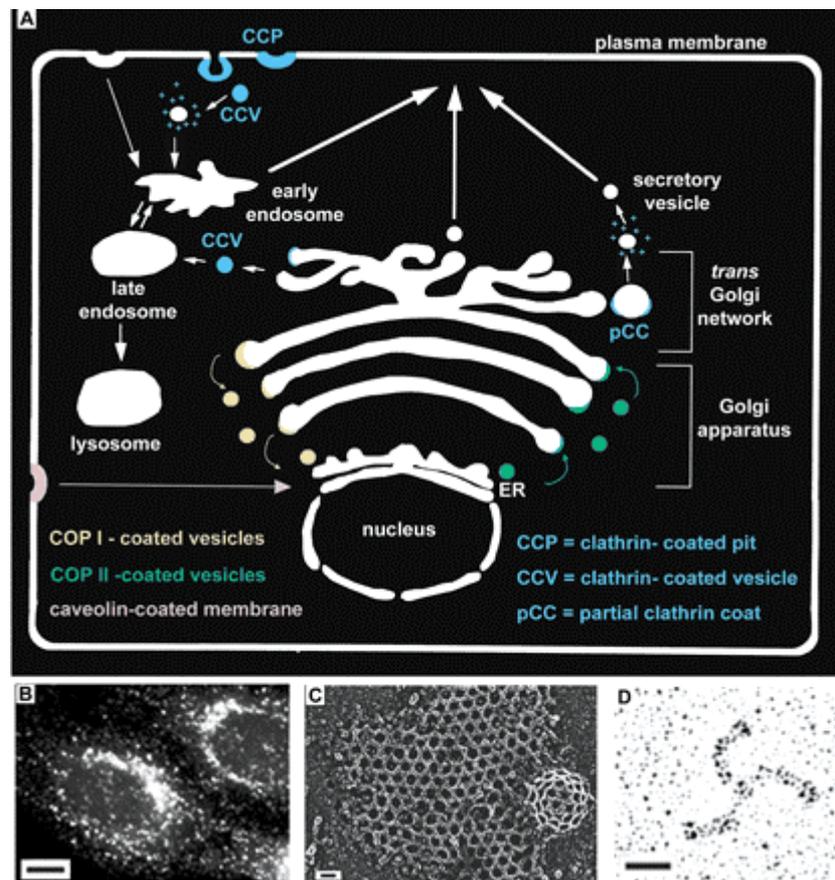


Figure 14 : Localisation intracellulaire et morphologie des vésicules à clathrine (CCV). **A** : les différentes étapes du trafic intracellulaire, endocytose et sécrétion sont soulignées en bleu. Les autres vésicules de transport sont définies par une couleur spécifique. **B** : distribution des CCV marquées par un anticorps anti-clathrine dans une cellule HeLa. **C** : treillis de clathrine associé à la membrane et formation d'une « clathrin coated pit » (CCP) (d'après Heuser *et al.* 1987). **D** : un triskelion de clathrine purifié à partir de cerveau bovin et observé par « platinum shadowing » (Liu *et al.* 2001). L'échelle indique les dimensions suivantes : B : 5 μ m, C : 33 nm, D : 20 nm (d'après Brodsky *et al.* 2001).

Dans les vésicules d'endocytose, le pH légèrement acide est suffisant pour dissocier la GH de son récepteur, cependant, leur colocalisation constante suggère qu'ils transitent dans les mêmes compartiments cellulaires. La dégradation implique un endosome tardif et la fusion avec un lysosome et c'est dans le lysosome que la GHBP peut être générée par protéolyse du GHR entier (Vleurick 1999, Kühn *et al.* 2002). Les endosomes destinés au recyclage retournent directement à la membrane stockés dans la zone golgienne.

3.2 - La voie des caveolae

Bien que découverte par Palade (1953), le rôle des caveolae dans le trafic intracellulaire n'a été évoqué que bien plus tard avec les travaux de Anderson (1992) et Lamaze et Schmid (1995). Les caveolae sont de petites invaginations de la membrane plasmique de 50 à 70 nm de diamètre, différentes des vésicules à clathrine par leur taille et leur morphologie.

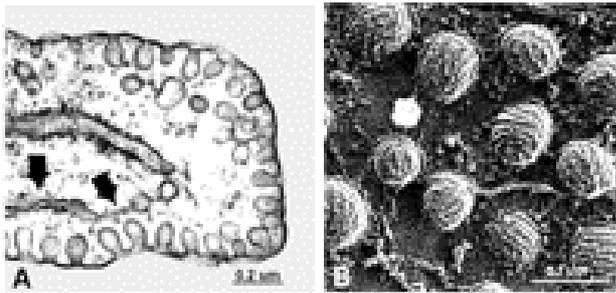


Figure 15 : Caveolae sur la membrane plasmique d'un fibroblaste. **A** : image en microscopie électronique ; Les pointes de flèche indiquent la présence de réticulum endoplasmique près des caveolae. **B** : image de la face cytoplasmique de la membrane plasmique obtenue par cryodécoupage (d'après Anderson, 1998).

Elles sont recouvertes d'une protéine spécifique d'une masse moléculaire de 22 kDa identifiée et nommée cavéoline (Anderson 1992, Lamaze et Schmid 1995). Chez les mammifères, 4 gènes codent pour 4 protéines, cavéoline 1 α , 1 β , 2 et 3. Chaque molécule est constituée d'un domaine hydrophobe de 33 acides aminés, permettant l'insertion dans la membrane plasmique et des portions N- et C-terminales situées à l'extérieur de la vésicule, dans le cytoplasme. Une autre caractéristique des caveolae est leur composition en cholestérol membranaire, indispensable à leur intégrité structurale (Lamaze et Schmid 1995). Une interaction directe entre le cholestérol et la cavéoline-1 en est probablement la cause. Ainsi, les agents de liaison stérol qui suppriment le cholestérol membranaire détruisent l'intégrité structurale des caveolae et empêchent spécifiquement l'internalisation *via* les caveolae (Schnitzer *et al.* 1994). Utilisant cette caractéristique, Lobie *et al.* (1999) ont démontré par des techniques morphologiques et biochimiques qu'en plus de la voie classique des vésicules à

clathrine, le complexe GH-(GHR)₂ emprunte la voie des caveolae pour son internalisation dans des cellules CHO transfectées avec l'ADNc du GHR.

La biogénèse des caveolae est fondamentalement différente de celle des vésicules à clathrine puisqu'elles proviennent de l'appareil de Golgi et transitent ensuite vers la surface cellulaire où elles peuvent, en particulier dans les cellules endothéliales, fusionner pour former des canaux trans-cellulaires capables d'acheminer de petites molécules (Simionescu *et al.* 1975) (**Figure 16D**). Les molécules internalisées par les caveolae suivent l'une des 4 voies proposées par Anderson (1998) : de la surface, elles transitent dans le cytoplasme (**Figure 16A**), dans le reticulum endoplasmique (**Figure 16B**), jusqu'à la surface cellulaire opposée (**Figure 16C**), ou bien elles sont stockées dans les structures tubulaires dérivant de la fusion des caveolae.

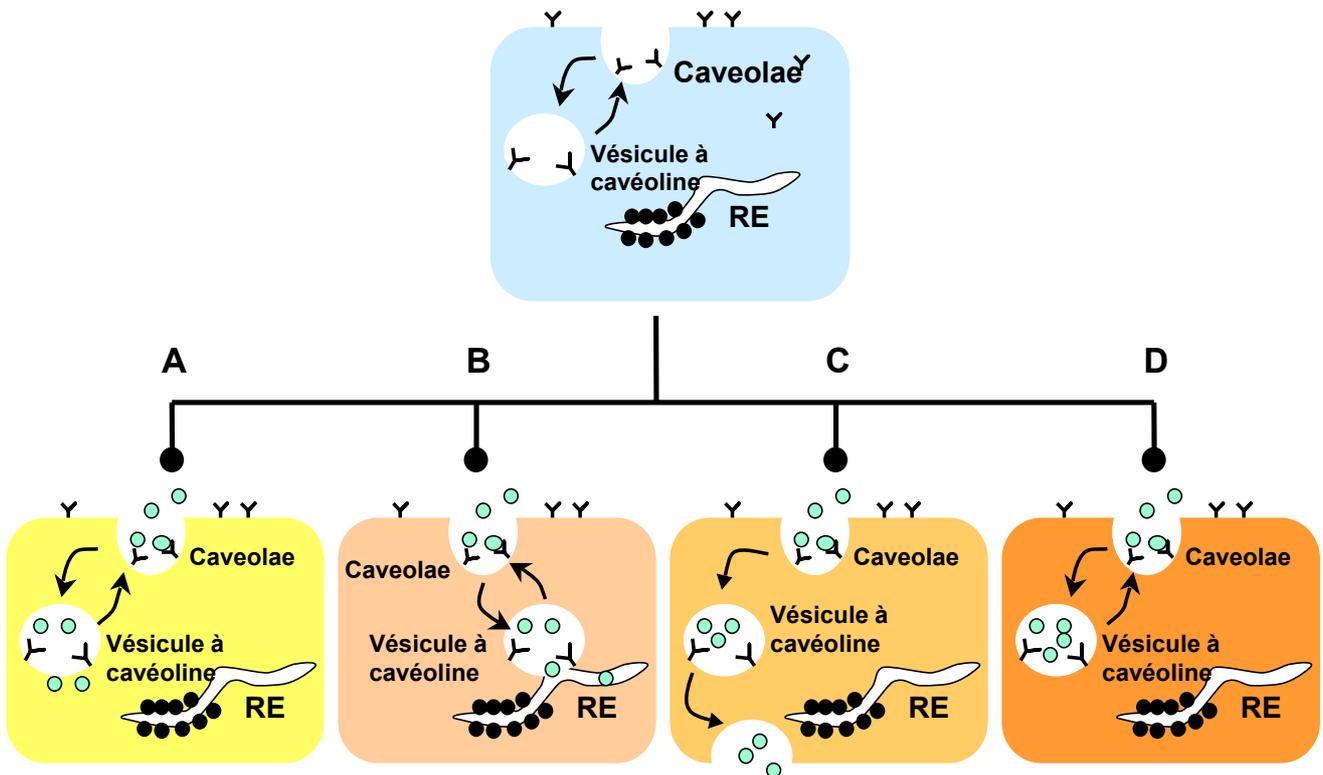


Figure 16 : Les ligands et les récepteurs internalisés par les caveolae empruntent l'une des 4 voies de potocytose. **A** : le ligand (O) est libéré dans le cytoplasme alors que le récepteur (Y) est recyclé à la surface cellulaire. **B** : le ligand est libéré dans le reticulum endoplasmique (RE) alors que le récepteur est recyclé à la surface. **C** : le ligand est véhiculé au travers de la cellule, le récepteur est recyclé. **D** : ligand et récepteur sont séquestrés dans les vésicules (d'après Anderson 1998).

Quelle fonction spécifique assurent les caveolae ? la réponse est encore très floue bien que de nombreuses molécules de signalisation leur soient associées et font de cette voie un scénario alternatif pour la transduction du signal (Lisanti *et al.* 1995, Anderson 1998, Okamoto *et al.* 1998, Schlegel et Lisanti 2001).

3.3 - La translocation nucléaire

Il apparaît de plus en plus évident qu'une partie des complexes facteurs de croissance-récepteurs internalisés s'échappent des endosomes ou lysosomes pour rejoindre le noyau (Keresztes et Boonstra 1999). La GH subit, en effet, une translocation nucléaire via les endosomes et sa concentration nucléaire peut être significativement augmentée après addition d'inhibiteurs lysosomaux, indiquant une voie d'échappement à partir des lysosomes (Lobie *et al.* 1994). Les protéines entrent et sortent du noyau au travers du complexe du pore nucléaire, une constellation élaborée d'au moins 30 constituants différents dont les nucléoporines ou Nups qui jouent un rôle important dans les échanges nucléocytoplasmiques (Rout et Aitchison 2001).

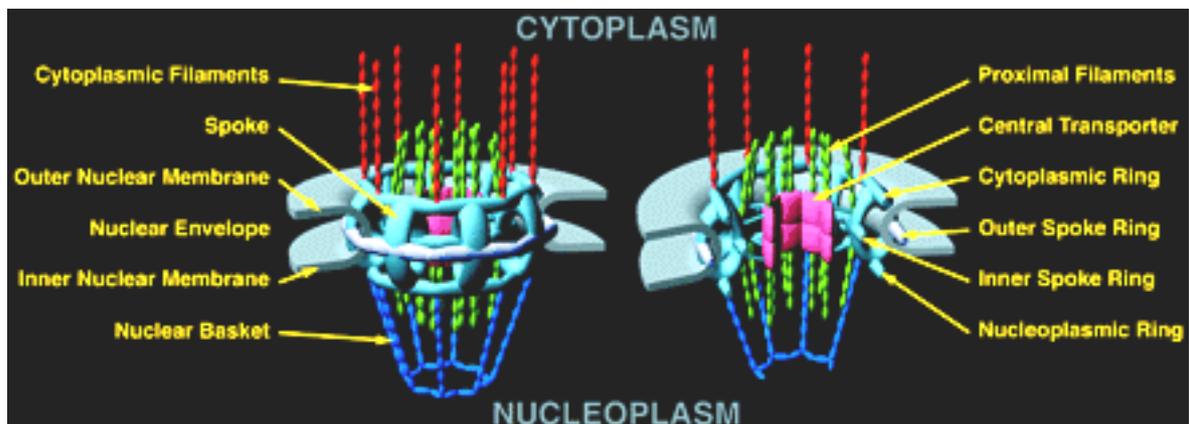


Figure 17 : Structure du pore nucléaire. Chaque complexe du pore nucléaire est un assemblage de protéines enveloppé dans la membrane nucléaire dont les deux feuillettes internes et externes fusionnent autour de 8 rayons qui s'organisent autour d'un axe appelé « central transporter ». Les éléments périphériques se projettent, à partir de cette partie centrale, vers la cytoplasme d'un côté, vers le noyau de l'autre (d'après Rout et Aitchison 2001).

Les nucléoporines sont des macromolécules d'un poids moléculaire compris entre 50 et 360 kDa, présentes en multiples copies sur les rayons du complexe du pore nucléaire (Figure 18).

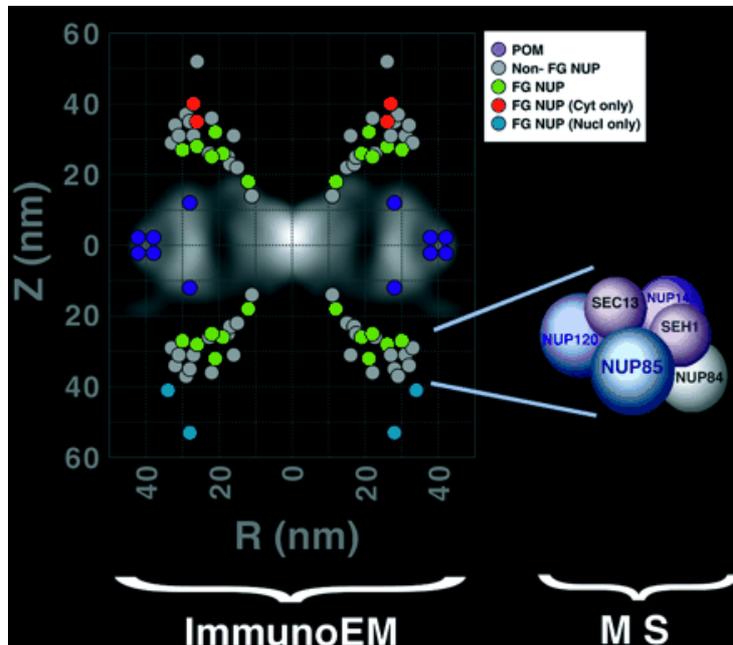


Figure 18 : L'immunocytologie en microscopie électronique (immunoEM) permet de cartographier la position des nucléoporines à l'intérieur du complexe du pore nucléaire. La spectrométrie de masse (MS) est l'une des nouvelles techniques employées pour cartographier les interactions entre les différentes nucléoporines (d'après Rout et Aitchison 2001).

Le mécanisme par lequel les protéines trafiquent au travers du pore nucléaire fait l'objet de nombreuses études et quelques aspects du transport nucléaire ont été clarifiés ces dernières années. Il est communément admis que les petites molécules d'un poids moléculaire inférieur à 50 kDa diffusent librement au travers du pore nucléaire. Pour accéder au noyau, les plus grosses protéines doivent présenter une séquence NLS « Nuclear Localization Sequence ». Cette NLS est constituée d'une courte séquence d'acides aminés basiques riche en résidus lysine et arginine et bordée de résidus proline et glycine (Dingwall et Laskey 1991). Ces deux derniers acides aminés induisent une configuration spatiale en coude qui permet une meilleure reconnaissance de la NLS par une famille de récepteurs solubles qui vont assurer le transport jusque dans le noyau. Ces protéines sont appelées karyopherines (kaps) qui regroupent les importines, les exportines et les transportines (Mattaj et Englmeir 1998, Wozniak *et al.* 1998). De même, pour sortir du noyau, les grosses protéines doivent comporter une NES « Nuclear Export Sequence » qui a une affinité de liaison particulière pour une autre karyopherine, l'exportine.

Environ la moitié des nucléoporines présentent un motif FG (Phe-Gly) répété séparé par des séquences de longueur variable (Rout *et al.* 2000). Ces protéines FG sont positionnées d'une manière stratégique dans le complexe, pour interagir avec les karyophérines, facilitant ainsi leur mouvement en même temps que les protéines transportées (« cargo ») (Ryan et Wentz 2000, Marelli *et al.* 2001). Ces interactions sont sous le contrôle de la GTPase Ran, « Ras-related Nuclear Protein », protéine G probablement la mieux représentée dans les cellules de tout type (Bischoff et Ponstingl 1991). Sa structure tridimensionnelle dépend, comme celle de toutes les protéines G, de l'état de phosphorylation du nucléotide guanine auquel elle est liée et c'est le changement réversible GDP-GTP qui lui permet de jouer un rôle de commutateur. La transformation des GDP-Ran en GTP-Ran est catalysée dans le noyau par une protéine GEF qui fonctionne comme un « Guanine nucleotide Exchange Factor », tandis que la protéine RanGAP « Ran GTPase-Activating Protein » provoque la réaction inverse dans le cytoplasme (**Figure 19**). Cet arrangement de la majorité des RanGEF dans le noyau et des RanGAP dans le cytoplasme joue un rôle déterminant dans la direction du transport nucléaire en créant un gradient de GDP-Ran dans le cytoplasme et de GTP-Ran dans le noyau (Moore 1998, Cole et Hammel 1998). Une autre observation clé pour la compréhension du mécanisme consiste en ce que la karyophérine β se lie spécifiquement à la GTP-Ran et non à la GDP-Ran (Mattaj et Englmeier 1998). La translocation nucléaire est un phénomène complexe d'importance majeure pour la propagation du signal du cytoplasme vers le noyau, la réponse impliquant une localisation nucléaire des facteurs de transcription ou des kinases qui une fois transloquées activent les facteurs de transcription dans le noyau (Cyert 2001).

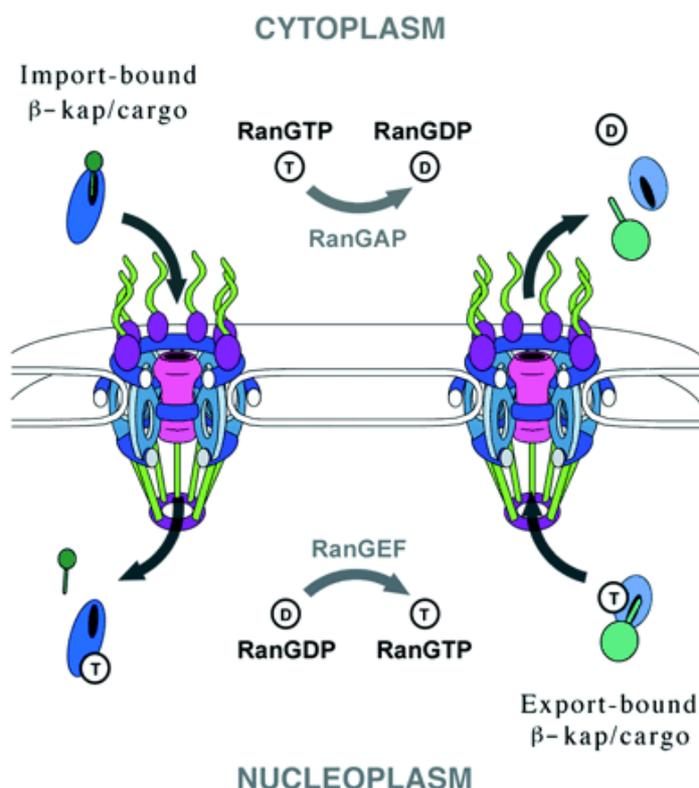


Figure 19 : Les différentes formes de Ran induisent la direction du transport nucléocytoplasmique en dictant où les karyophérines doivent se lier et déverser les protéines transportées (d'après Rout et Aitchison 2001).

3.4 – Le système ubiquitine-protéasome, passage obligé

Nous avons vu dans le paragraphe 2.4 que le GHR est une protéine ubiquitinée et que son motif intracellulaire UbE avec, en particulier la présence de la Phe₃₂₇, est indispensable à son internalisation (Govers *et al.* 1999). Lorsque la formation du treillis à clathrines par l'assemblage de clathrines sous la membrane plasmique est bloquée par une déplétion en K⁺, l'ubiquitination du GHR est inhibée (van Kerkhof *et al.* 2001). De plus, lorsque ce treillis à clathrine se forme normalement et que seulement la formation des vésicules à clathrine est supprimée par une déplétion en cholestérol ou avec une forme de dynamine mutante, l'ubiquitination du GHR se produit, indiquant que cette ubiquitination a lieu d'une manière très précoce, à la surface cellulaire (van Kerkhof *et al.* 2001) et qu'il existe un lien étroit entre l'ubiquitination et le recrutement des GHR vers les systèmes membranaires recouverts de clathrine « clathrin coated lattices ».

Sachse *et al.* (2001), ont essayé d'élucider le rôle du système ubiquitine dans les stades précoces d'endocytose de la GH, dans des cellules CHO transfectées avec le GHR-F_{327A}, présentant donc un système UbE d'endocytose inactivé. Une étude quantitative de la distribution de GH après immunomarquage en microscopie électronique, révèle l'absence de GH dans les « clathrin-coated pits » et les vésicules à clathrines (**Figure 14**) tandis qu'elle est bien présente dans le treillis de membranes à clathrine. Considérant que la GH est internalisée complexée à son récepteur et que ce complexe est stable dans les endosomes, la quantification de la GH reflète la présence du récepteur muté GHR-F_{327A} et les auteurs concluent que l'incorporation du GHR dans le treillis sous-membranaire à clathrine est indépendante du motif UBE contrairement à l'incorporation dans les « clathrin-coated pits » qui nécessite la présence du motif UbE.

Pour expliciter le rôle propre de l'ubiquitination du récepteur, ces mêmes auteurs ont analysé l'internalisation de la GH dans des cellules transfectées avec un mutant du GHR dont la partie cytoplasmique est tronquée après l'acide aminé 399 et où toutes les lysines ont été remplacées par des arginines. Comme les résidus lysines sont les sites de liaison de l'ubiquitine, le GHR-_{399K} ne peut être ubiquitiné, pourtant la GH est alors internalisée comme dans les cellules contrôles transfectées avec un GHR entier et dans les mêmes proportions. Ces résultats montrent que l'ubiquitination du récepteur n'est pas indispensable au recrutement des « clathrin-coated vesicles » ni à l'endocytose consécutive, bien que l'internalisation du GHR-_{399K} dépende de la présence du motif UbE intact. Il faut alors imaginer un autre mécanisme responsable de l'incorporation du GHR (**Figure 20**).

Mécanisme qui ferait intervenir une protéine adaptatrice (AP), comme protéine d'ancrage entre le motif UBE du GHR et les complexes enzymatiques E2/E3 qui initient la machinerie d'ubiquitination et ciblent ainsi les protéines vers une dégradation dans les lysosomes (Govers *et al.* 1999). Le puzzle se complique puisque de nouvelles molécules comme la protéine adaptatrice tyrosine kinase, Cbl « Cobalamin », pourrait se fixer sur certaines tyrosines phosphorylées avant de se lier au complexe enzymatique E2 pour ubiquitiner le GHR et accélérer son endocytose tout en réduisant sa capacité de signalisation comme Oved et Yarden (2002) l'ont décrit pour l'EGFR « Epidermal Growth Factor Receptor ».

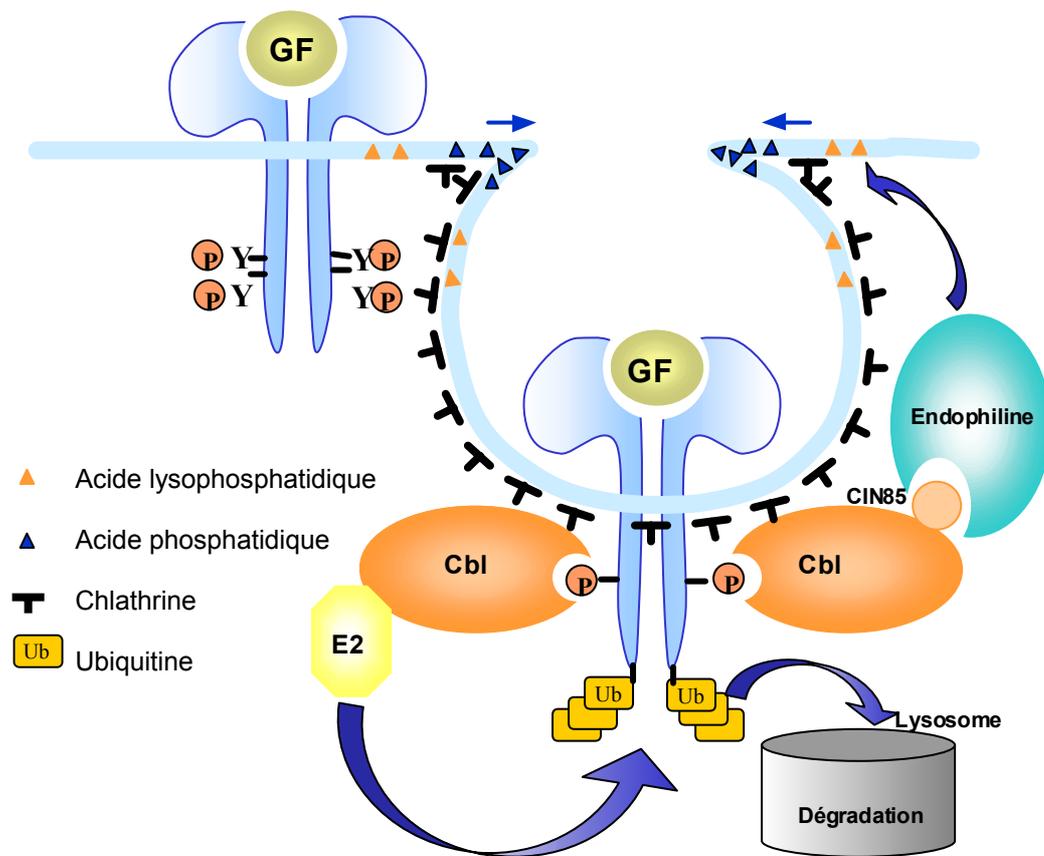


Figure 20 : Double rôle de la protéine Cbl « Cobalamin ». C'est une protéine de signalisation qui se fixe sur des tyrosines phosphorylées du récepteur activé d'un facteur de croissance et qui permet son internalisation par le biais des vésicules à clathrine. Elle utilise deux mécanismes : 1) elle recrute un complexe enzymatique E2 qui induit l'ubiquitination du récepteur qui ainsi marqué est identifié pour être internalisé ; 2) elle attire un complexe endophiline-CIN85 qui participe à la formation de l'invagination puis de la vésicule à clathrine. Le récepteur complexé est alors transporté jusque dans le lysosome où il est dégradé (d'après Oved et Yarden 2002).

Tout récemment Petrelli *et al.* (2002), Soubeyran *et al.* (2002), montrent par des études *in vitro* que les récepteurs des facteurs de croissance en particulier l'EGFR recrutent pour leur internalisation, un complexe comprenant la Cbl, l'endophiline et une nouvelle protéine interagissant avec l'endophiline, la CIN85 « Cbl interacting protein of 85 kDa ». L'endophiline catalyse la transformation de l'acide lysophosphatidique en acide phosphatidique permettant ainsi au feuillet interne de la membrane plasmique d'adopter une courbure propice à la formation de l'invagination puis de la scission (**Figure 20**).

Ainsi, l'internalisation des récepteurs des facteurs de croissance est contrôlée par deux mécanismes réversibles, la phosphorylation et l'ubiquitination. Comme Di Fiore et De camilli (2001) nous le suggèrent, l'endocytose et la signalisation constituent maintenant un solide partenariat. Une altération de l'ubiquitination du récepteur retarde sa dégradation lysosomale et peut prolonger l'activation des différentes voies de signalisation. Un seul exemple, les mutations qui empêchent la Cbl d'induire l'ubiquitination des récepteurs des facteurs de croissance ont des effets oncogéniques (Levkowitz *et al.* 1998, Nishio *et al.* 2002).

4 - La transduction du signal

Après sa dimérisation qui semble être la première étape indispensable au déclenchement de la transduction du signal, le GHR induit la réponse biologique de la GH et ses effets cellulaires par un mécanisme qui implique une cascade de réactions, objet de nombreux travaux actuellement. Le GHR, comme les autres récepteurs de la superfamille des récepteurs des cytokines, n'a pas d'activité kinase propre. Il doit donc recruter et activer des tyrosines kinases cytoplasmiques qui vont s'autophosphoryler et phosphoryler les résidus tyrosines du GHR. La famille des JAK est la plus impliquée dans la transduction du signal induit par la GH (Foster *et al.* 1988, Argetsinger *et al.* 1993, Silva *et al.* 1993).

4.1 - Les Janus kinases

Cette famille de protéines regroupe 4 membres : JAK1, JAK2, JAK3 et (Tyrosine kinase 2) Tyk2 (Ihle *et al.* 1995). Protéines de 125 à 130 kDa, elles sont largement exprimées dans toutes les cellules, hormis JAK3 qui est exprimée préférentiellement dans les cellules hématopoïétiques (Leonard et O'Shea 1998).

4.1.1 - Structure

Les Janus kinases présentent une structure commune dont la caractéristique est l'absence des domaines SH2 et SH3 « Src-Homology 2 and 3 » et la présence de 7 domaines conservés JH (JAK homology) JH1-JH7, parmi lesquels JH1 représente le domaine catalytique fonctionnel et JH2 le domaine pseudokinase qui régule négativement l'activité de JAK2 et en particulier maintient son inactivité en l'absence de stimulus (Saharinen *et al.* 2000).

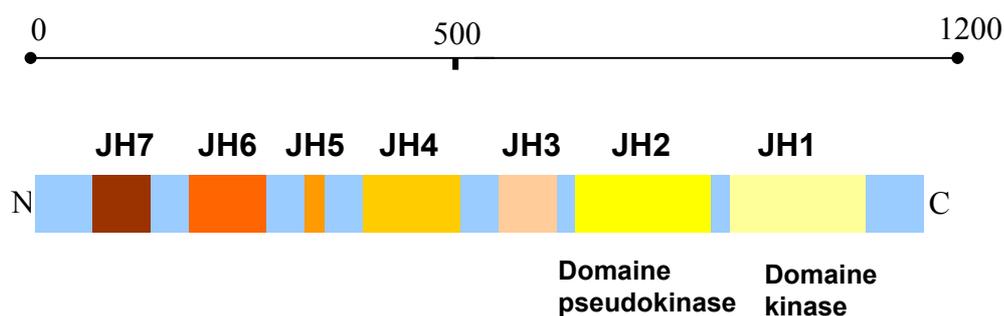


Figure 21 : Représentation schématique de la protéine kinase JAK2 majoritairement activée par la GH (d'après Zhu *et al.* 2001)

La partie N-terminale des JAK recouvre 550 acides aminés et semble jouer un rôle important dans leur spécificité de liaison (Leonard et O'Shea 1998, Ihle 2001). Les régions JH6 et JH7 seraient spécifiquement impliquées dans la liaison de JAK2 et JAK3 (Chen *et al.* 1997). Des études plus récentes (Girault *et al.* 1998) ont démontré que les domaines JH3-JH4 présentent une certaine homologie avec les domaines SH2 et que les domaines JH4-JH7 constituent un domaine FERM « Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin » connu pour initier les interactions protéines-protéines. Le domaine FERM d'abord considéré comme un élément indispensable à l'interaction des JAK avec les autres kinases se voit actuellement attribué d'un rôle important dans l'interaction des JAK avec la portion cytoplasmique du récepteur gp130 (Hilkens *et al.* 2001).

Le domaine tyrosine kinase JH1 comporte des tyrosines qui constituent un maillon essentiel dans la boucle d'activation : Y₁₀₃₈/Y₁₀₃₉ dans JAK1, Y₁₀₀₇/Y₁₀₀₈ dans JAK2, Y₉₈₀/Y₉₈₁ dans JAK3 et Y₁₀₅₄/Y₁₀₅₅ dans Tyk2 (Leonard et O'Shea 1998). La phosphorylation du couple de tyrosine conduit à un changement conformationnel qui facilite la liaison du substrat (Hubbard et Till 2000).

La présence du domaine pseudokinase distingue les JAK des autres protéines tyrosine kinases (Ihle 2001), mais son rôle n'est pas clair.

4.1.2 - Janus kinases et signalisation induite par la GH

JAK2 est la Janus kinase principalement utilisée par le GHR (Argetsinger *et al.* 1993) bien que la GH puisse induire la phosphorylation de JAK1 (Smit *et al.* 1996) et de JAK3 (Johnston *et al.* 1994) et que l'association de Tyk2 avec le GHR dans les cellules du foie humain (Hellgren *et al.* 1999) suggère que la GH peut également utiliser cette kinase pour exercer ses effets.

Par ailleurs, bien que la même JAK puisse être activée par de nombreuses cytokines, l'importance et la durée de l'activation produite est propre à chacune. En effet, dans les fibroblastes 3T3-F442A, la GH stimule la phosphorylation de JAK2 d'une manière 15 fois plus importante que le LIF ou l'IFN γ . En revanche, le LIF et la GH provoquent un effet plus rapide mais plus transitoire que la stimulation par l'IFN γ sur ces mêmes cellules (Argetsinger *et al.* 1995). Ainsi, le GHR n'est pas l'unique récepteur qui active JAK2, pourtant, la réponse qu'il induit se distingue par son intensité et son caractère transitoire, du moins dans certains types cellulaires.

Les études *in vitro* qui utilisent des constructions génétiques avec des GHR tronqués ou délétés ont montré que la boîte 1 (motif riche en proline) (**Figure 10**) est indispensable à l'association et l'activation de JAK2 (Vanderkuur *et al.* 1994, Sotiropoulos *et al.* 1994). Les travaux de Wang *et al.* (1995) précisent qu'une seule mutation d'une proline ou d'une lysine en alanine inhibe totalement la capacité de la GH à induire la phosphorylation de JAK2. Pourtant les JAK ne possèdent pas de domaine SH3 (qui se lie spécifiquement aux régions riches en proline), il est alors probable que l'association des JAK sur le GHR passe par une protéine adaptatrice intermédiaire qui contiendrait un domaine SH3 (Finidori 2000).

Les JAK activées phosphorylent alors la partie intracytoplasmique du GHR avec laquelle elles constituent des sites d'ancrage pour diverses molécules de signalisation qui contiennent un domaine SH2 ou des motifs de liaison phosphotyrosine (PTB « Phosphotyrosine-Binding motifs »). C'est ainsi que différentes voies de signalisation peuvent être activées en réponse à l'induction provoquée par la GH (**Figure 22**) et le seul effet qui ne dépend pas de JAK2 est l'entrée du calcium par les canaux calcium de type-L (Billestrup *et al.* 1995).

Il faut signaler également qu'une protéine contenant un domaine SH2, appelée SH2-B en raison de sa découverte dans les lymphocytes B, est capable d'augmenter l'activité kinase

de JAK2 et par conséquent l'activation des protéines en aval dans les différentes voies de signalisation (Rui *et al.* 1997). Les mêmes auteurs précisent que c'est la forme SH2-B β qui est la plus active et qu'il en résulte une activation toute particulière de STAT-5b (Rui et Carter Su 1999). La colocalisation de SH2-B avec les filaments d'actine des replis membranaires des cellules 3T3-F442A stimulées par la GH ou le PDGF suggère son rôle dans l'organisation du cytosquelette et le mouvement cellulaire (Herrington *et al.* 2000). Cette protéine SH2-B servirait à « booster » le complexe GHR-JAK2 et apparaîtrait comme un régulateur positif de la signalisation induite par GH (Herrington et Carter Su 2001).

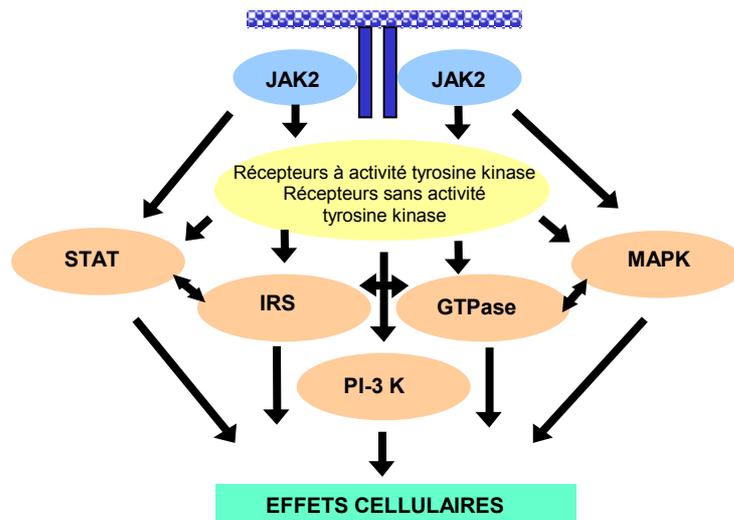


Figure 22 : Représentation simplifiée de la transduction du signal induit par la GH. La liaison de la GH entraîne la dimérisation du GHR et l'association de JAK 2. JAK2 liées, s'autophosphorylent et phosphorylent le GHR induisant l'activation consécutive de différents groupes de molécules de signalisation : 1) d'autres récepteurs qui ont une activité kinase ; 2) la famille des MAPK « Mitogen Activated Protein Kinases »; 3) les facteurs IRS « Insulin Receptor Substrates » qui agissent comme protéines d'ancrage pour les futures molécules de signalisation activées incluant la « Phosphatidylinositol-3'-kinase » (PI-3 K) ; 4) des petites « Ras like GTPases » ; 5) la famille des STAT « Signal Transducers and Activators of Transcription » qui constitue le mécanisme majeur impliqué dans la régulation transcriptionnelle induite par la GH (d'après Zhu *et al.* 2001).

4.2 - Activation de la voie des Ras-MAPK « Ras-Mitogen-Activated Protein kinase » (Figure 23)

Les MAPK sont rapidement activées en réponse à une stimulation par la GH. Ce sont des protéines kinases et plus d'une douzaine de membres ont été identifiés chez les mammifères comme faisant partie de cette famille (Cobb 1999). Les MAPK p44/42, appelées

aussi « Extracellular Signal-regulated Kinases » ou ERK, les *c-jun* N-terminal Kinases dont les SAPKS « Stress Activated Protein Kinases » et la p38 MAPK sont les mieux caractérisées et susceptibles d'être activées par la GH (Campbell *et al.* 1992, Winston et Bertics 1992, Zhu *et al.* 1998a, Zhu et Lobie 2000).

La première étape de la voie de signalisation des MAPK (**Figure 23**) implique la liaison d'une protéine adaptatrice SHC sur les résidus tyrosine phosphorylés du récepteur et/ou de JAK. Une seconde protéine adaptatrice Grb2 « Growth factor Receptor-Binding protein 2 » peut alors s'associer par son domaine SH2 sur la protéine SHC.

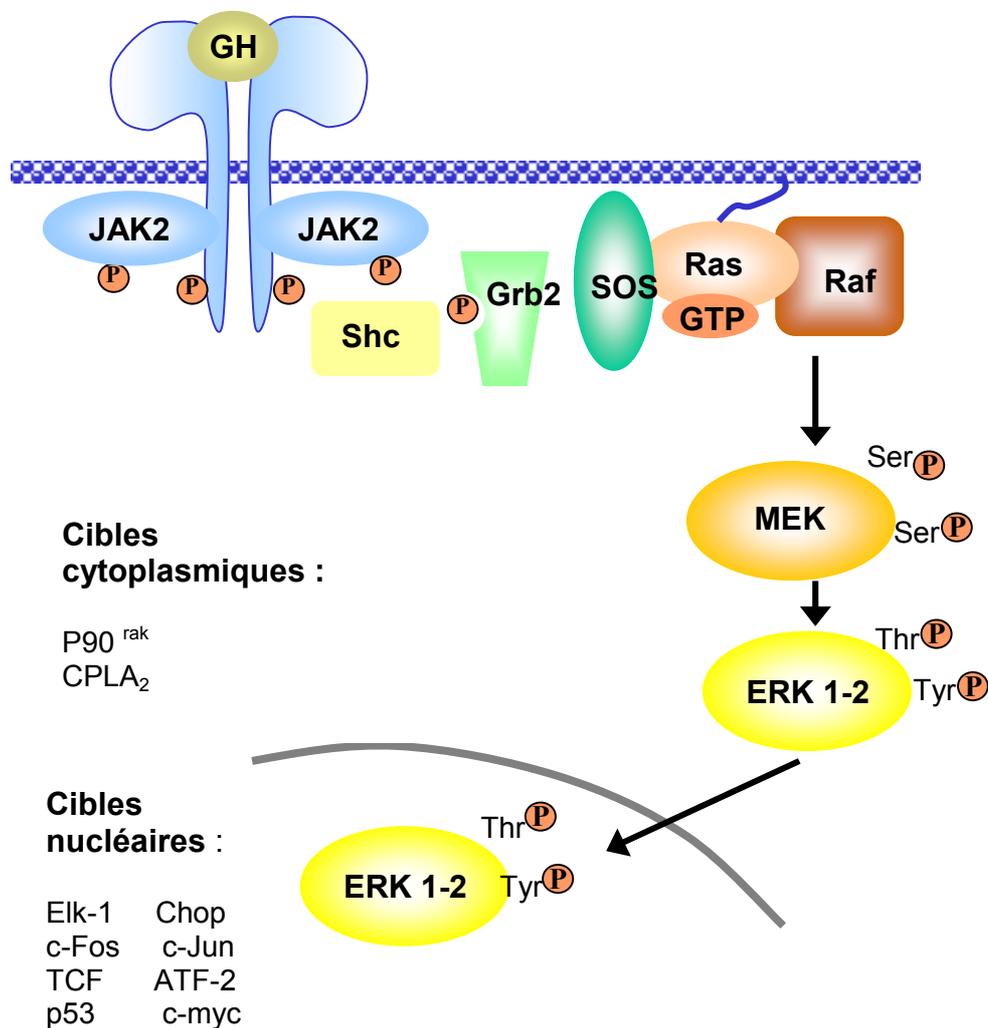


Figure 23 : Activation par la GH de la voie de signalisation des « Extra-cellular Signal-Regulated Kinases » (ERKS 1 et 2 ou MAPK p44-42) montrant les différentes molécules activées, cibles nucléaires et cytoplasmiques atteintes : la P90^{rak}-S6 kinase ; PLA₂ « Phospholipase A₂ » ; TCF « Ternary Complex Factor » (d'après Smit *et al.* 1999).

Cette liaison entraîne le recrutement et l'activation de la protéine Sos « Son Of Sevenless » de la membrane dont le rôle est d'activer la protéine Ras GDP insérée dans la membrane en protéine Ras GTP. Par une cascade de phosphorylations, Ras peut alors activer la protéine kinase Ser/Thr Raf qui active la protéine kinase Ser/Thr/Tyr MEK « Mitogen-activated / extracellular signal-regulated kinase » qui, à son tour active ERK1 et 2 (Smit *et al.* 1999) (**Figure 23**).

Zhu et Lobie (2000) ont montré que la GH peut également phosphoryler et activer la MAPK p38 dans des cellules CHO transfectées de manière stable avec le cDNA du récepteur de la GH. Après stimulation par la GH, l'activation de la transcription induite par CHOP « C/EBP Homologous Protein » et ATF-2 « Activator of Transcription Factor-2 » passe par l'activation de la MAPK p38 ; cette même kinase est également mise en jeu pour la réorganisation de l'actine du cytosquelette et l'activité mitotique induites après une stimulation par la GH. Il est intéressant de noter que la production de GH autocrine par les cellules issues de cancer de la glande mammaire correspond à une activation du gène *chop* et à l'augmentation de l'expression de la protéine CHOP (Mertani *et al.* 2001). Ces travaux montrent que pour exercer certains de ses effets, la GH déclenche l'activation de voies de signalisation qui passent d'une manière spécifique soit par la phosphorylation de ERK1 et 2 (MAPK p44/42) soit par celle de la MAPK p38 qui semble jouer un rôle d'intermédiaire important pour ses effets sur la prolifération et la motilité cellulaire.

4.3 - La voie des IRS-1, -2, -3 « Insulin Receptor Substrates » et de la PI-3 kinase « phosphatidylinositol-3'-kinase » (Figure 24)

La GH a des effets rapides semblables à ceux de l'insuline sur des cellules ou des tissus qui ont été privés de GH : stimulation du transport du glucose, des acides aminés, synthèse protéique, lipogénèse, activité mitotique et prévention de l'apoptose (Eisenhauser *et al.* 1995). La GH et l'insuline activent donc certaines voies de signalisation communes. C'est ainsi que la GH stimule la phosphorylation d'un résidu tyrosine de l'IRS-1 dans les cultures primaires d'adipocytes de rat (Ridderstrale *et al.* 1995), et l'IRS-2 et -3 dans les fibroblastes 3T3-F442A et les cellules CHO transfectées avec le rGHR (Argetsinger *et al.* 1995). Initialement identifiées comme des molécules de signalisation spécifiques de l'insuline et de l'IGF-I, IRS-1 et -2 sont de grosses protéines cytoplasmiques de 160 et 190 kDa qui ne présentent pas d'activité enzymatique connue. Après stimulation, les récepteurs à activité tyrosine kinase de l'insuline et d'IGF-I forment un complexe transitoire avec les IRS qui sont alors phosphorylés et peuvent servir de sites d'ancrage pour diverses molécules de

signalisation (Myers *et al.* 1996). La phosphorylation des IRS en réponse à une stimulation par la GH est aussi rapide dans les adipocytes en culture primaire que dans les fibroblastes 3T3-F442A : de l'ordre de 1 min à une concentration de GH de 500 ng / mL. Cependant contrairement à l'activation prolongée et constante obtenue après stimulation par l'insuline, des pics d'activation sont observés entre 15 et 30 min, suivis d'un retour à l'état basal entre 60 et 120 min après stimulation par la GH (Argetsinger *et al.* 1995, 1996, Ridderstrale *et al.* 1995).

Le mécanisme par lequel la GH induit la phosphorylation des protéines IRS est encore inconnu. Les régions du GHR qui semblent nécessaires à la phosphorylation des IRS-1 et -2 sont identiques à celles qui sont nécessaires à la phosphorylation de JAK2 ce qui suggère que la phosphorylation des IRS dépend de l'activation de JAK2. D'ailleurs, les divers ligands, dont l'insuline, qui activent JAK2, activent aussi les IRS. Pourtant, la phosphorylation maximale des IRS en réponse à l'insuline, IGF-I ou IL-4 nécessite la liaison de la protéine à une tyrosine phosphorylée d'une séquence consensus NPXY présente sur les récepteurs respectifs (Keegan *et al.* 1994). Or, ni le GHR, ni JAK2 ne présente cette séquence consensus, ce qui laisse penser que les interactions des protéines IRS avec les complexes GH-(GHR)₂-JAK2 sont différentes de celles qui se produisent avec les récepteurs de l'insuline, d'IGF-I et de l'IL-4 et les travaux actuels ne conduisent qu'à des hypothèses (White 1998, Thirone *et al.* 1999). La plus plausible implique une protéine adaptatrice comme Grb2 ou CrkII qui permettrait l'association de JAK2 avec les protéines IRS (Finidori *et al.* 2000). La protéine CrkII possède un domaine SH2 et deux domaines SH3 capables d'interagir avec de nombreuses molécules effectrices dont la protéine CAS « Crk Associated Substrate ». Cette dernière est impliquée dans la migration cellulaire et augmente la potentialité d'invasion des cellules tumorales *in vivo* (Klemke *et al.* 1998).

Les protéines IRS-1 et -2 phosphorylées en réponse à l'insuline fournissent des sites de liaison pour des protéines spécifiques qui contiennent un domaine SH2. Ce sont, entre autres, la sous-unité p85 de la PI-3 kinase (Sun *et al.* 1995), la « tyrosine phosphatase » SHP2, la protéine adaptatrice Grb2 qui contient les domaines SH2 / SH3. Le rôle de la liaison avec ces protéines est encore obscure même s'il est admis que la liaison de la sous-unité p85 au motif YXXM des IRS augmente l'activité enzymatique de la sous unité P110 de la PI-3-kinase (Sun *et al.* 1995).

Une stimulation par la GH provoque également l'association de la sous-unité p85 de la PI-3 kinase avec les protéines IRS-1, -2 ou -3 et l'augmentation de l'activité enzymatique de la PI-3-kinase (Ridderstrale *et al.* 1995, Argetsinger *et al.* 1995, 1996).

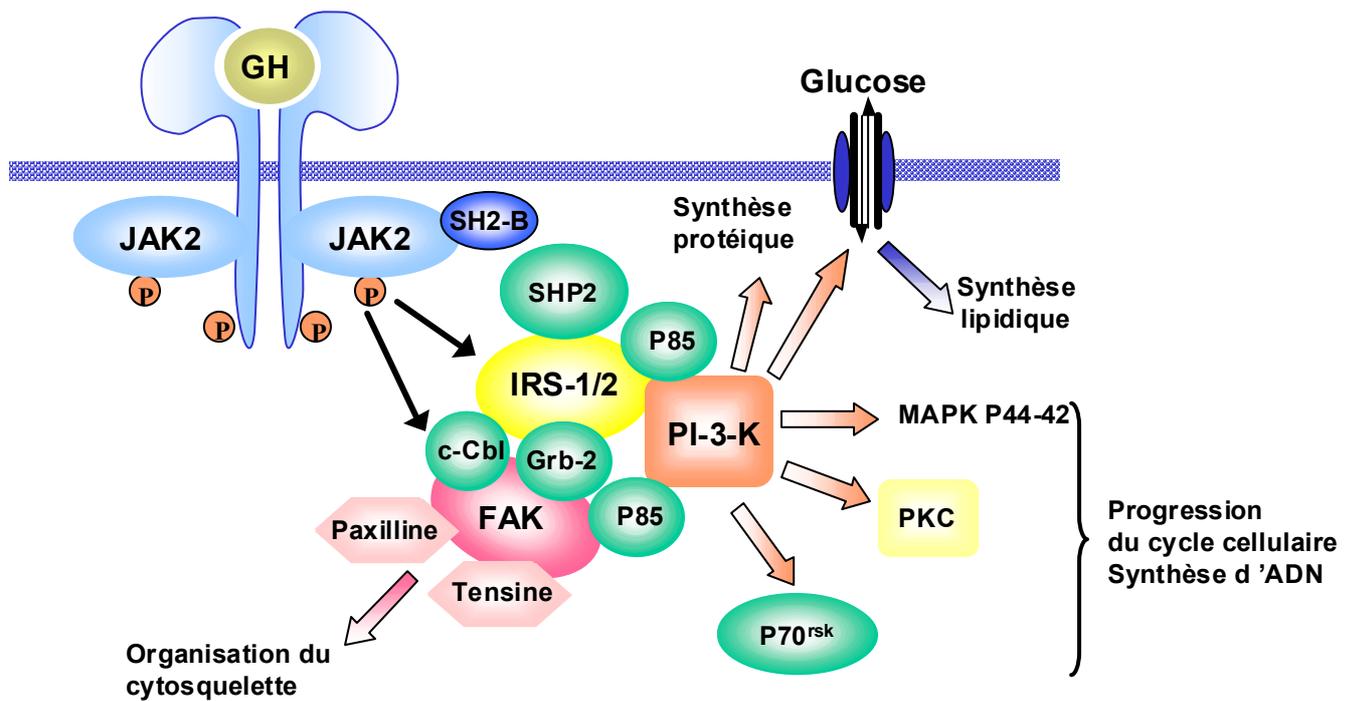


Figure 24 : Voies de signalisation utilisant les protéines IRS-1 et –2 ou la protéine kinase FAK. L’activation de JAK2 induit la formation d’un complexe multiprotéique qui aboutit à l’activation de la PI-3 kinase impliquée dans le transport du glucose, la synthèse protéique et lipidique, dans l’activation de la PKC « Protein Kinase C », la p70^{rsk} et la voie des MAPK P44/42 qui contribuent à la progression du cycle cellulaire. La protéine SH2-B « Src Homology 2-B » peut potentialiser l’activation de JAK2 et augmenter ainsi le signal induit.

Il est d’autre part évident que l’activation par la GH de la voie des MAPK p44/42 *via* la protéine IRS-1 passe par l’activation de la PI-3-kinase, l’activation de Ras étant PI-3-kinase dépendante (Liang *et al.* 2000). Cependant, l’activation de la PI-3-kinase induite par la GH est maintenue dans les cellules déficientes en protéines IRS-1 (IRS-1^{-/-}) alors que dans ces cellules, l’IGF-I n’a plus d’effet sur la PI-3-kinase (Bruning *et al.* 1997). La GH peut donc utiliser d’autres voies indépendantes de celle des IRS pour activer la PI-3-kinase. L’intervention d’autres molécules signal est d’ores et déjà démontrée (Goh *et al.* 2000), faisant de la PI-3-kinase une protéine « pivot » dont l’activation en réponse à une stimulation par la GH est impliquée dans la prolifération et le métabolisme cellulaire (Yenush et White. 1997, White 1998) ou dans la réorganisation du cytosquelette (Goh *et al.* 1997). En effet, la protéine FAK « Focal Adhesion protein Kinase » est une protéine tyrosine kinase de 125 kDa colocalisée avec les intégrines aux points de contacts inter-cellulaires. Elle a un rôle central dans les interactions cellules / matrice extra- cellulaire (ECM) (Schlaepfer *et al.* 1999). Goh *et*

al. ont démontré dès 1997, que la GH stimule la dépolarisation de l'actine et la réorganisation du cytosquelette. Simultanément, ils précisent que la GH active la protéine FAK et par cascade provoque la phosphorylation de deux substrats, la paxilline et la tensine. Les protéines FAK et paxilline sont associées d'une manière constitutive à l'état basal non stimulé, la tensine phosphorylée s'associe à ce complexe après stimulation par la GH (Zhu *et al.* 1998b) (**Figure 24**). La boîte 1 du GHR et l'activité de JAK2 étant nécessaires à l'activation de FAK (Zhu *et al.* 1998b).

L'activation de cette protéine FAK par la GH constitue donc une voie alternative de la transduction du signal. Elle entraîne la phosphorylation de la sous-unité p85 de la PI-3 kinase et la formation de phosphatidylinositol 3', 4', 5'-triphosphate (IP3) au même titre que la voie des IRS. Nous pouvons dès lors imaginer que la GH emprunte la voie des IRS pour ses actions métaboliques comme la lipogénèse et la voie FAK - PI-3 kinase pour réguler l'organisation du cytosquelette (Zhu *et al.* 2001), ce qui permettrait à la cellule de répondre spécifiquement, selon son type et son état de différenciation.

4.4 - La voie de la protéine kinase C (PKC) (Figure 25)

L'étude des effets insulino-mimétiques de la GH sur des adipocytes de rat en culture a montré que l'inhibition de la PKC par un inhibiteur, la sphingosine, supprime l'activation de la lipogénèse par la hGH (Smal et De Meyts 1987). De même, dans la lignée de pré-adipocytes de souris Ob1771, l'expression de l'oncogène *c-fos* en réponse à une stimulation par la GH nécessite l'activation de la PKC (Doglio *et al.* 1989), suggérant que certaines actions de la GH peuvent être, du moins dans ces cellules, modulées par la PKC.

La famille des PKC comporte au moins 12 isoformes capables de phosphoryler les résidus sérine et thréonine de nombreuses protéines (Dekker et Parker 1994). Chaque isoforme a une expression, une régulation, une localisation et des substrats spécifiques. Leur activation implique le Ca^{2+} et / ou le diacylglycerol (DAG) (**Figure 25**). L'activation des isoformes α , β et γ nécessite la présence des ions Ca^{2+} tandis que l'activation des isoformes δ , ϵ , ξ , ν et θ est Ca^{2+} indépendante. La voie d'activation des différentes isoformes de la PKC (Ca^{2+} ou DAG ou Ca^{2+} + DAG) conditionne la réponse cellulaire à un stimulus hormonal tel que celui de la GH. Il faut ajouter également que la PI-3-kinase activée *via* les protéines IRS produit des IP3 responsables de l'augmentation de la concentration des ions Ca^{2+} intracellulaire et de l'activation des isoformes δ , ϵ et ν de la PKC (Toker *et al.* 1994). Comme la voie de signalisation IRS-PI-3-kinase est activée par la GH (Ridderstrale *et al.* 1995), il est probable que l'activation des isoformes δ , ϵ , ν passe par cette voie. Il a été également rapporté

que la PKC- δ est nécessaire à l'activation de la voie de signalisation des MAPK p44/42 par la GH, dans les cellules 3T3-F442A (MacKenzie *et al.* 1997), montrant l'intrication complexe des différentes voies de transduction du signal.

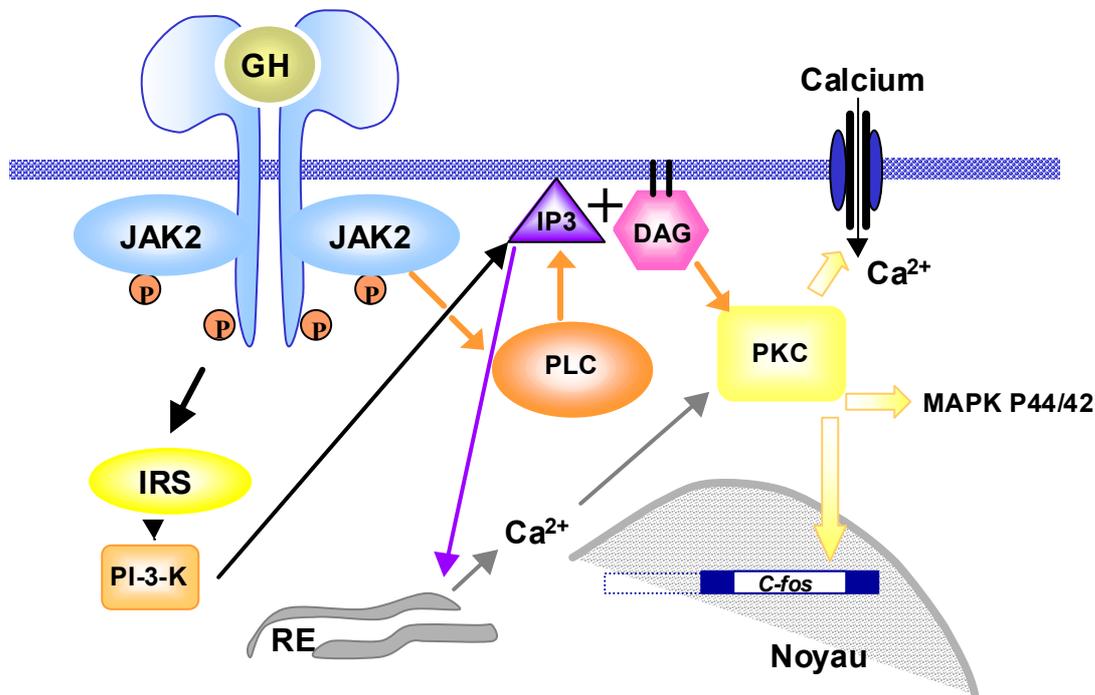


Figure 25 : Voies de signalisation de la protéine kinase C (PKC). La stimulation par la GH induit une activation de la phospholipase C (PLC) et une augmentation de la production de diacylglycerol (DAG) nécessaire à l'activation des différentes isoformes de la PKC. Il en résulte alors une augmentation du Ca²⁺, l'activation des MAPK ou de *c-fos*. L'activation des protéines IRS conduit à l'activation de l'inositol 1, 4, 5 triphosphate (IP3) via la phosphatidylinositol-3' kinase (PI-3 K). RE : Reticulum endoplasmique.

4.5 - Activation des protéines STAT « Signal Transducer and Activator of Transcription ».

Cette année marque le dixième anniversaire de la découverte des STAT, facteurs de transcription en situation latente dans le cytoplasme jusqu'à ce qu'un signal induit par une cytokine ou un facteur de croissance extra-cellulaire provoque la phosphorylation de diverses protéines intra-cellulaires et par cascade leur propre activation. Les protéines STAT activées subissent une translocation vers le noyau où elles contrôlent la transcription de nombreux gènes.

4.5.1 - La famille des STAT

La famille des protéines STAT constitue une nouvelle classe de facteurs de transcription (Ihle 1996). Sept membres ont été identifiés, d'un poids moléculaire d'environ 100 kDa, leur longueur est comprise entre 750 et 850 acides aminés. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine SH2, d'un domaine « linker » et d'un domaine de transactivation dans la partie C-terminale ; un résidu tyrosine situé aux environs de l'acide aminé 700 est indispensable à l'activation des STAT ; les acides aminés compris entre les résidus 400 et 500 déterminent la spécificité de liaison sur l'ADN (Horvath *et al.* 1995) (**Figure 26**) ; la partie N-terminale joue un rôle d'intermédiaire pour des liaisons sur de multiples sites d'ADN (Xu *et al.* 1996).

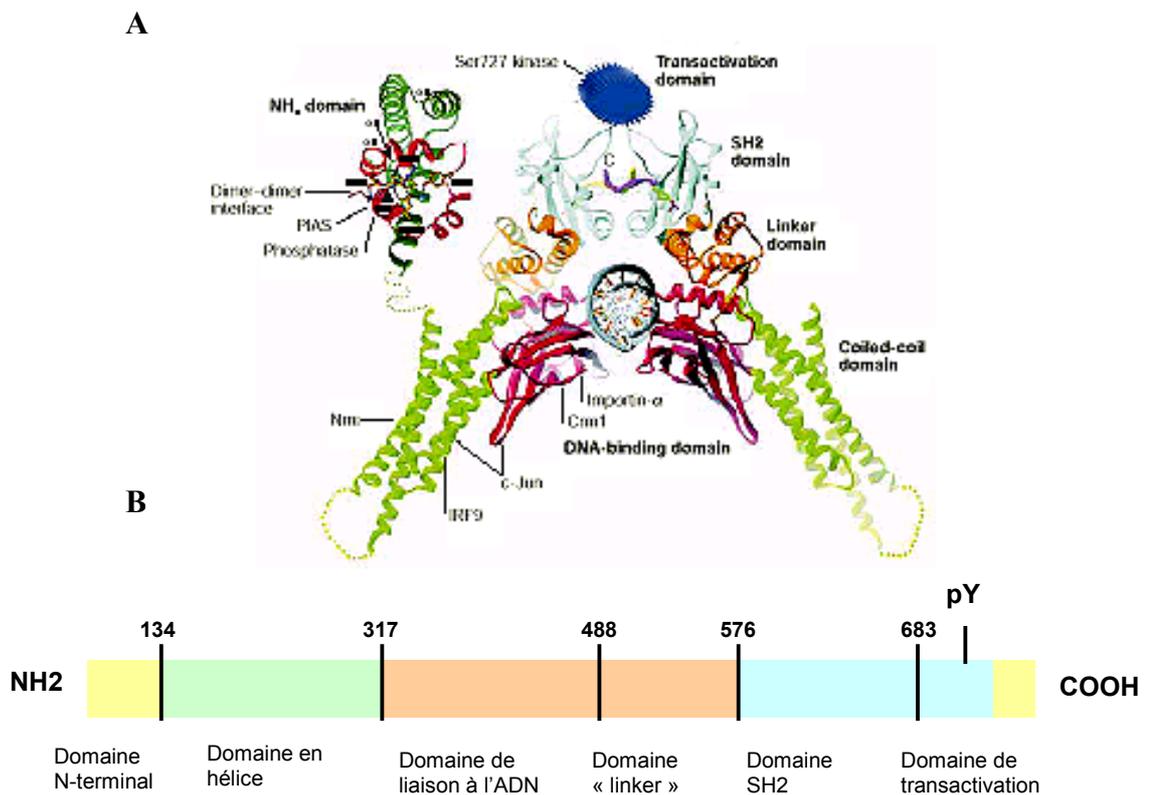


Figure 26 : Structure des protéines STAT montrant l'organisation spécifique de leurs différents domaines. **A** : structure cristalline du dimère de STAT1 qui montre les sites d'accrochage sur l'ADN (au centre). **B** : représentation schématique de la structure générale des STAT. Le résidu tyrosine pY en position 694 est impliqué dans l'activation de STAT 5 par la GH (d'après Levy et Darnell 2002).

4.5.2 - La voie de signalisation JAK-STAT (Figure 27)

Comme les protéines STAT1 et STAT2 qui furent découvertes en tant que protéines-cibles de l'activation induite par l'interferon (Darnell *et al.* 1994), toutes les STAT peuvent être activées en réponse à une stimulation par une ou plusieurs cytokines. La voie de signalisation implique la phosphorylation du domaine intra-cellulaire des récepteurs des cytokines par les protéines JAK activées. Les STAT interagissent alors avec les résidus tyrosine phosphorylés du récepteur par l'intermédiaire de leur domaine SH2. Ainsi phosphorylées sur l'unique résidu tyrosine situé aux environs du 700^{ème} acide aminé (694 pour STAT5), les STAT se dissocient du récepteur et forment des homo ou hétérodimères qui subissent une translocation nucléaire.

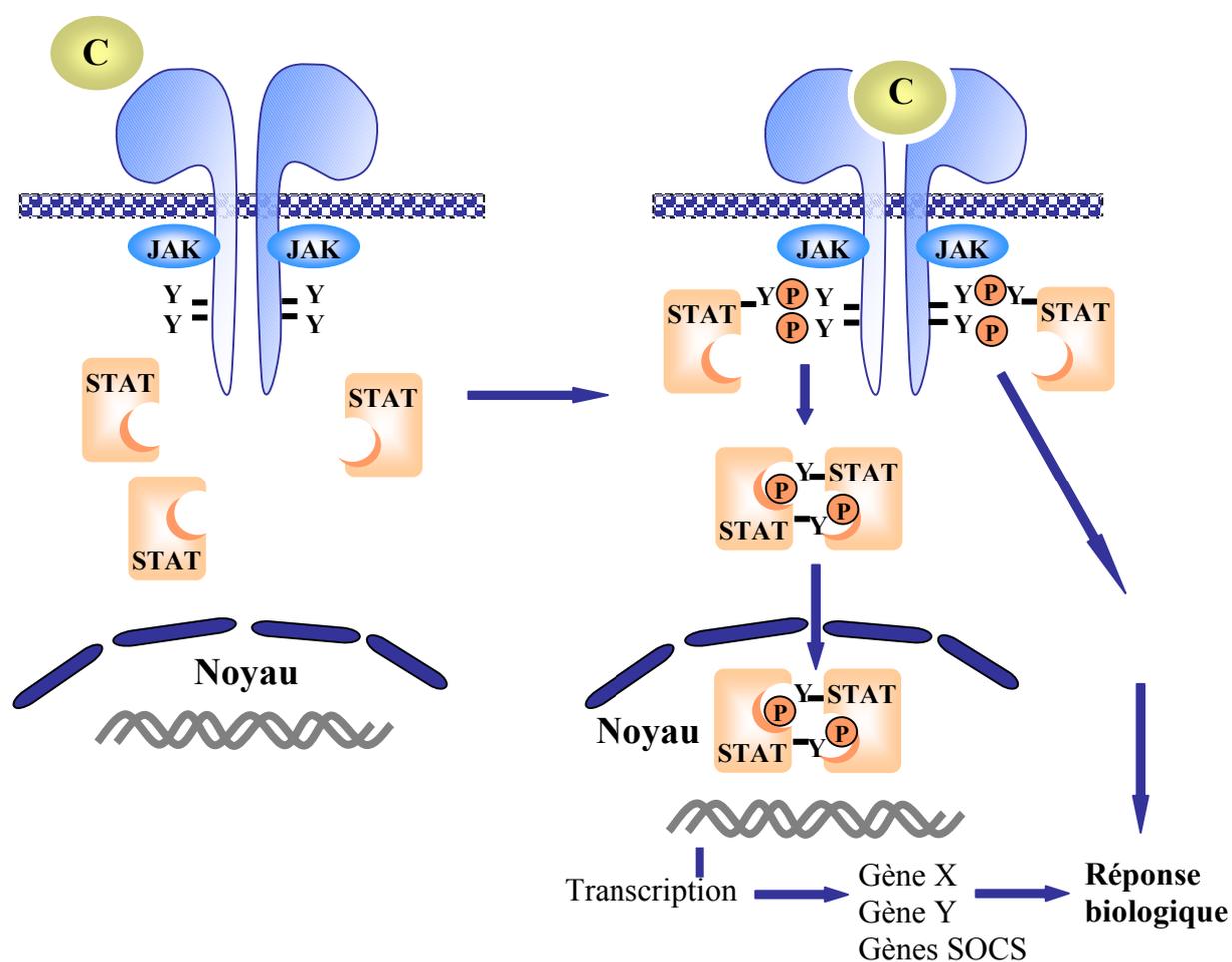


Figure 27 : La liaison de la cytokine (C) à son récepteur entraîne la formation du complexe récepteur dimérisé activé suivie de l'association des JAK qui se phosphorylent. Les STAT se phosphorylent à leur tour et se dimérisent. Leur translocation dans le noyau induit la transcription des gènes cibles. La transcription des gènes SOCS contribue à la réponse biologique (d'après Alexander 2002).

Après fixation sur les « DNA response element » appropriés, elles activent la transcription des gènes-cibles. La fixation d'un dimer STAT sur des sites d'ADN adjacents forme un complexe de liaison tétramérique STAT-ADN (**Figure 27**). De nombreuses revues sont consacrées à la voie de signalisation JAK-STAT, nous n'en citerons que quelques une (Ihle *et al.* 1995, Shuai 1999, Herrington *et al.* 2000, Zhu *et al.* 2001, Kisseleva *et al.* 2002, Levy et Darnell 2002).

Depuis 1994, les auteurs ont démontré que la GH utilise plus précisément STAT1, STAT3 (Meyer *et al.* 1994, Campbell *et al.* 1995, Sotiropoulos *et al.* 1995), STAT5a et STAT5b (Choi et Waxmann 2000, Waxman 2000) pour réguler toute une variété de gènes. Il a été également démontré que la GH stimule la formation des homodimers STAT3, des homodimers STAT1 et des hétérodimers STAT1/STAT3, tous se liant sur la séquence SIE « SIS-inducible element » du gène *c-fos* (Meyer *et al.* 1994, Campbell *et al.* 1995).

L'activation de STAT1 et STAT3 en réponse à une induction par la GH a été observée dans les cellules 3T3-F442A (Meyer *et al.* 1994), dans le foie provenant de rats hypophysectomisés (Gronowski *et al.* 1995) et dans les cellules CHO transfectées avec le GHR (Smit *et al.* 1996). Pourtant, chez la souris « knockout » STAT1^{-/-}, si la réponse à l'IFN α et γ est fortement perturbée, aucune modification de réponse n'est observée pour le LIF, l'IL-10, l'EGF ou la GH (Meraz *et al.* 1996), suggérant qu'*in vivo*, STAT1 ne joue un rôle déterminant que dans la voie de transduction initiée par l'IFN. La suppression du gène de STAT3 entraîne une mortalité embryonnaire entre le 6^{ème} et le 7^{ème} jour de gestation. La méthode CRE-*LOXP* « floxed STAT3 allele » (Akira 2000) permet de contourner ce problème de mortalité et de supprimer le gène de STAT3 uniquement dans certains tissus comme la peau, l'épithélium thymique, l'épithélium mammaire ou le foie. Cette étude a conduit à des résultats surprenants quant à la variété et parfois la contradiction des rôles que peut jouer STAT3 dans les processus biologiques (Alonzi *et al.* 2001). Les phénotypes résultant de la délétion de STAT3 dans les tissus adultes incluent une diminution de la survie cellulaire, une diminution de l'apoptose et de la migration cellulaire (Takeda *et al.* 1998, Levy *et al.* 2002).

STAT5 paraît la cible privilégiée pour la GH. Si, initialement, un seul gène STAT5 avait été identifié chez le mouton, deux gènes codant pour deux formes distinctes STAT5a et STAT5b ont été mis en évidence chez l'homme, la souris et le rat mais la signification fonctionnelle de ces deux isoformes n'est pas claire actuellement (Lin *et al.* 1996). Bien que présentant 96% d'homologies (Schindler et Strehlow 2000), ces deux protéines ont des fonctions distinctes dans la voie de transduction induite par la GH. L'analyse phénotypique

des souris « knockout » STAT5a^{-/-} montre un développement déficient de la glande mammaire par suppression de la réponse à la prolactine (STAT5a a été primitivement identifiée comme un facteur de transcription induit par la prolactine) (Liu *et al.* 1997, Teglund *et al.* 1998). Chez les souris « knockout » STAT5b^{-/-}, par contre, l'arrêt de la croissance est identique à celui observé chez les souris GH^{-/-} ou GHR^{-/-} (Teglund *et al.* 1998). Comme STAT5b est activée d'une manière prédominante en réponse au niveau élevé des pics de GH chez le mâle (Waxman *et al.* 1995), les femelles sont largement moins affectées. De plus, le mâle « knockout » STAT5b^{-/-} perd son profil typique d'expression des gènes du foie (MUP et CYP2D9) (Teglund *et al.* 1998, Park *et al.* 1999). Ainsi, STAT5b est impliquée dans le dimorphisme sexuel lié à la transcription des gènes hépatiques selon le mode de sécrétion de la GH, pulsatile (chez le mâle), continue (chez la femelle) et la croissance consécutive (Zhu *et al.* 2001). STAT5b est également impliquée dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline par la GH (Galsgaard *et al.* 1996).

4.5.3 - Les STAT et l'oncogénèse

Au delà de leur rôle dans la cellule normale et leur implication dans divers processus physiologiques, les protéines STAT sont maintenant associées à la transformation cellulaire et d'une manière plus générale à l'oncogénèse. Une revue récente montre l'implication évidente de STAT1, STAT3 et STAT5 dans la formation et la progression des tumeurs (Bromberg 2002) (**Tableau 1**).

Cancers primaires	STAT activées
Cancer mammaire	STAT1, STAT3, STAT5
Cancer de la prostate	STAT3, STAT 5
Cancer ovarien	STAT3
Mélanome	STAT3
Cancer du poumon	STAT1, STAT3
Cancer du pancréas	STAT3
Cancer thyroïdien	STAT3
Hépatocarcinome	STAT3, STAT5

Tableau 1 : Les différentes protéines STAT activées en fonction de différents

Pendant les diverses étapes de la tumorigénèse, les cellules perdent leur capacité à reconnaître et réparer les anomalies de l'ADN, à réguler le cycle cellulaire et l'apoptose. En parallèle, elles sont soumises à une variété de facteurs de croissance qui vont favoriser les mécanismes d'invasion et d'angiogénèse. Les STAT ne sont pas connues pour contribuer à la régulation du cycle cellulaire ni à la réparation de l'ADN, mais leur rôle dans la voie de signalisation induit par ces facteurs de croissance font d'elles des acteurs potentiels du développement tumoral. De plus, comme elles jouent un rôle important dans la réponse immunitaire, une simple modification de la voie de signalisation JAK/STAT peut, en compromettant la surveillance immunitaire, favoriser la croissance tumorale.

STAT3 et STAT5 sont activées en permanence dans de nombreux cancers primaires et les lignées cellulaires correspondantes. Dans certaines de ces lignées STAT3 paraît indispensable au maintien du phénotype transformé et ceci par la régulation de la transcription de gènes spécifiques. En effet de nombreux gène-cibles de STAT3 sont connus, dont ceux qui codent pour des protéines anti-apoptotiques, Bcl-x1, Mcl-1 et Bcl-2, ceux qui codent pour des protéines associées à la prolifération, Cyclin D1 et Myc, et ceux enfin, qui codent pour des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (Bromberg *et al.* 1999, Epling-Burnette *et al.* 2001, Bowman *et al.* 2000, Niu *et al.* 2002). Des oligonucléotides anti-sens de STAT3 tout comme les inhibiteurs de JAK2 arrêtent la croissance cellulaire de lignées issues de cancer où STAT3 est activée d'une manière constitutive (Turkson *et al.* 2001).

A l'opposé STAT1 apparaît comme un « suppresseur de tumeur » (Bromberg 2002). Comme nous l'avons déjà mentionné, STAT1 est la protéine impliquée dans la voie de signalisation induite par les IFN qui, en plus de leur rôle dans l'immunité, sont des inhibiteurs potentiels de la croissance cellulaire et des promoteurs de l'apoptose. Les souris « knockout » STAT1^{-/-} bien qu'incapables de développer des tumeurs spontanément, sont beaucoup plus réceptives aux agents carcinogènes et favorisent le développement des tumeurs transplantées (Kaplan *et al.* 1998). Dans les cellules cancéreuses humaines STAT1 a très souvent perdu la capacité à réponse aux IFN (Shankaran *et al.* 2001) et il ne serait pas surprenant de trouver des formes mutées de STAT1 dans des cancers humains. Il serait alors intéressant de déterminer si la mutation de STAT1 récemment décrite par Dupuis *et al.* (2001) dans des familles présentant une prédisposition héréditaire aux infections mycobactériennes, augmente aussi le risque de cancer.

4.5.4 – Le transport nucléo-cytoplasmique des protéines STAT

La translocation des protéines STAT dans le noyau se produit rapidement après leur phosphorylation et leur dimérisation. Une si grosse protéine (180 kDa pour le dimère STAT) nécessite une liaison avec l'importine- $\alpha 5$, une des sous-unités du mécanisme de transport nucléo-cytoplasmique pour faciliter son passage dans le noyau (Sekimoto *et al.* 1997, McBride *et al.* 2002). De récentes études par mutagenèse dirigée ont montré que les résidus L₄₀₇, K₄₁₀ et K₄₁₃, à l'intérieur du site de liaison à l'ADN, étaient indispensables pour la translocation nucléaire de STAT1 phosphorylée (Fagerlund *et al.* 2002).

L'exportation des protéines STAT hors du noyau semble dépendre de résidus situés à la fois dans le domaine en hélice et dans le domaine de liaison à l'ADN, mais non encore précisés (McBride *et al.* 2000, Begitt *et al.* 2000). La déphosphorylation des STAT a lieu dans le noyau et c'est l'événement qui conditionne la sortie du noyau (Haspel et Darnell 1999). Cette déphosphorylation est assurée par des phosphatases et la TC45 (« T Cell 45 » tyrosine phosphatase nucléaire) semble fortement impliquée (Ibarra-Sanchez *et al.* 2000). Les cellules qui présentent un déficit de cette enzyme retiennent STAT1 dans le noyau plus longtemps que les cellules normales (Ten Hoeve *et al.* 2002). Une surexpression de TC45 entraîne une déphosphorylation massive de STAT5 (Aoki et Matsuda 2002). Un schéma général pour le transport nucléo-cytoplasmique de STAT1 après stimulation par l'IFN peut donc s'imaginer mais il ne peut, pour l'instant, être extrapolé aux autres STAT. Il est également fort probable qu'une seule stimulation par une cytokine déclenche plusieurs cycles : phosphorylation des STAT, migration nucléaire, déphosphorylation et exportation / rephosphorylation cytoplasmique et réimportation dans le noyau (Haspel et Darnell 1999). Ainsi l'importance de l'activité transcriptionnelle des STAT dépend de l'équilibre susceptible de s'établir entre l'activité catalytique de JAK et la capacité de déphosphorylation nucléaire (Levy et Darnell 2002).

4.5.5 - Régulation négative des STAT

Le transit des STAT impose différents niveaux de régulation. Dans le noyau, nous venons de décrire l'intervention de la TC45 dans la déphosphorylation des STAT activées. Dans le cytoplasme, plusieurs types de protéines assurent une régulation négative des STAT. Ce sont d'abord les phosphatases comme SHP1 « SH2-containing phosphatase 1 », SHP2 et PTP1B « protein-tyrosine phosphatase 1B » qui sont non seulement capables d'inactiver les STAT mais les JAK (You *et al.* 1999, Aoki et Matsuda 2000). Ce sont aussi, les protéines SOCS « suppressor of cytokine signaling » qui, en se fixant directement sur le récepteur ou sur les JAK pour inhiber leur activité catalytique, bloquent à la fois le recrutement et

l'activation des STAT. C'est un point sur lequel nous reviendrons largement en abordant la régulation du signal induit par les cytokines à la fin de notre exposé bibliographique.

5 - De l'hormone à la cytokine

5.1 - Rôle physiologique de la GH

La GH est classiquement une hormone anabolisante qui, tout au long de la vie, régule le métabolisme, stimule la croissance et favorise la différenciation et la prolifération cellulaire. Si la croissance intra-utérine semble indépendante de la présence de GH hypophysaire puisque les nouveau-nés atteints d'absence congénitale de l'hypophyse ou de délétions des gènes de la GH ou du GHR, ont une taille proche de la normale à la naissance (Gluckman *et al.* 1981), la croissance et le développement post-natal dépendent de la sécrétion normale et pulsatile de la GH et c'est particulièrement le cas au moment de la puberté.

5.1.1 - Action indirecte

La GH stimule à la fois la synthèse hépatique d'IGF-I et la synthèse tissulaire d'IGF-I mise en évidence dans de nombreux sinon tous les tissus de l'organisme. C'est par l'intermédiaire d'IGF-I que la GH agit sur la prolifération et la différenciation des chondrocytes de la plaque épiphysaire des os longs (Kember 1978). De même, dans le muscle squelettique, la GH stimule la synthèse protéique (Wolf *et al.* 1992) et son mode d'action semble indirect *via* IGF-I comme le suggère Fryburg (1994). Pourtant, Isaksson *et al.* (1982) montrent qu'une injection de GH directement dans le cartilage de conjugaison provoque la croissance des os longs chez le rat. Ces résultats indiquent clairement que la GH peut avoir une action locale indépendante de l'augmentation du taux d'IGF-I circulant, introduisant la notion, confirmée plus tard (Schlechter *et al.* 1986) que la GH stimule la synthèse locale d'IGF-I, responsable à son tour de la différenciation des chondrocytes. Plus récemment, de nombreux auteurs se sont appliqués à montrer l'interaction et les effets additifs de ces deux hormones (Clark *et al.* 1994, Clark *et al.* 1995, Fielder *et al.* 1996). Une étude précise de ces interactions dépasserait le cadre de notre travail, nous nous limiterons donc à résumer les différentes actions biologiques de la GH *via* IGF-I dans un tableau synthétique (**Tableau 2**).

Effets de l'hormone de croissance

Stimulation / IGF-I	Inhibition de l'activation des IGF-I
<p>Croissance des os longs et remodelage osseux</p> <ul style="list-style-type: none"> - Prolifération des chondrocytes - Prolifération des ostéoblastes et formation du tissu osseux - Prolifération des ostéoclastes et résorption du tissu osseux - Synthèse du collagène de type I <p>Croissance du muscle lisse</p> <p>Croissance hépatique</p> <p>Gluconéogénèse (effets insulino-mimétiques)</p> <p>Lipolyse</p> <p>Synthèse protéique</p> <p>Lactation</p> <p>Synthèse d'IGF-I</p> <p>Synthèse d'ALS « Acid Labile Subunit »</p> <p>Synthèse d'IGFBP-3</p> <p>Transactivation du promoteur de Spi2.1</p> <p>Immunomodulation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Prolifération des cellules B et T - Activité des cellules Natural Killer - Activité des macrophages - Activité des neutrophiles - Production des immunoglobulines - Production des cytokines 	<p>Action de l'insuline</p> <p>Synthèse de l'IGFBP-1</p> <p>Synthèse de l'IGFBP-2</p>

Tableau 2 : Les effets indirects de la GH *via* la synthèse d'IGF-I qu'elle soit circulante (synthèse hépatique) ou synthétisée localement (d'après Butler et LeRoith 2001).

Néanmoins, de récents travaux ont révélé que le système endocrine GH-IGF-I est d'une grande complexité. L'observation d'une croissance presque normale des souris dont le gène *IGF-I* a été spécifiquement délété dans le foie ou bien dont le gène de l'ALS « Acid Labile Subunit » a été délété, conduisent le groupe d'Ueki (2000) à s'interroger sur le rôle effectif de l'IGF circulant dans la croissance somatique. Ils soumettent l'hypothèse que la croissance somatique résulte de l'action concertée de l'IGF-I produit localement sous l'induction de la GH et de la GH d'une manière directe *via* ses récepteurs, nombreux dans le

tissu osseux, tandis que l'IGF-I circulant servirait principalement à réguler négativement la sécrétion de GH.

5.1.2 - Action directe

Dès 1982, Morikawa *et al.* avaient montré le rôle de la GH sur la transformation des préadipocytes 3T3 et Ob1771 en adipocytes matures et ceci par une action directe *via* le GHR présent sur ces préadipocytes. Dans ce système de culture, IGF-I n'a pas d'effet sur la conversion adipeuse mais favorise la multiplication des adipocytes (Green *et al.* 1985). Chow *et al.* quand à eux, démontrent en 1996, un effet direct de la GH sur le muscle où le GHR est abondamment présent. En effet, chez des rats, une administration intraveineuse de 1,5 mg/kg de GH stimule la phosphorylation de JAK2 (maximum après 2 mn) puis une phosphorylation des STAT (maximum après 15 min) dans les cellules du muscle squelettique tandis qu'aucun effet n'est remarqué sur IRS-1 ou la protéine adaptatrice SHC qui traduisent l'effet de l'insuline ou d'IGF-I. L'évidence d'un effet direct de la GH, indépendant d'IGF-I, sur la croissance a été confirmée par les travaux de Wang *et al.* (1999) qui montrent que chez des souris *igf-I^{-/-}*, la GH produit une augmentation significative de la croissance de la plaque osseuse. De même, un traitement par la GH induit une hépatomégalie chez ces souris (Liu et LeRoith 1999).

Une autre cible importante de la GH avait été mise en évidence dès 1930 par Smith qui constatait une régression du thymus chez les animaux hypophysectomisés. Sur le même modèle de rats hypophysectomisés et des souris naines (*dw/dw*), Clark (1997) montrait une déficience du développement lymphocytaire et de la fonction immune. Déficit corrigé après administration de GH exogène. Ces résultats ont été largement contestés car les animaux étaient également déficients en prolactine et en hormone thyroïdienne. Pourtant, une étude récente montre un effet protecteur de la GH sur le système immunitaire soumis à des conditions de stress (Dobashi *et al.* 2001). C'est ainsi que les glucocorticoïdes sont connus pour leurs propriétés immunosuppressives dont un des mécanismes induit l'apoptose des lymphocytes T (Evans-Storms et Cidlowski 1995). Un traitement des lymphocytes T par l'association de la GH et de glucocorticoïdes protègent les cellules CD4⁺ de l'apoptose tandis que la mort des cellules CD8⁺ est augmentée, entraînant un rapport CD4⁺/CD8⁺ augmenté. Face à cet effet protecteur, une surexpression de GH peut affecter la régulation du système immunitaire. Des études *in vivo* sur des souris transgéniques surexprimant la bGH montrent une augmentation du poids de la rate et du thymus (Dialynas *et al.* 1999). De la même façon, les patients acromégales présentent souvent une hyperplasie thymique (Bazzoni *et al.* 1990).

De plus, le taux élevé de GH chez les souris transgéniques provoque le développement de maladie auto-immunes (Ogueta *et al.* 2000). Ces observations conduisent à penser que la GH est impliquée dans la régulation du système immunitaire. L'expression du GHR par la plupart des lymphocytes B, les monocytes et à un moindre degré par les lymphocytes T (Badolato *et al.* 1994, Rapaport *et al.* 1995, Bresson *et al.* 1999), conduit à l'hypothèse d'une action directe.

5.1.3 - Action locale

Il est d'abord intéressant de rappeler que la GH hypophysaire a une action paracrine sur certaines populations de cellules hypophysaires, les cellules à prolactine et les cellules gonadotropes sur lesquelles le GHR et la GHBP ont été détectés par immunocytochimie (Mertani *et al.* 1995). Ainsi, la prédominance des cellules somatotropes dans l'hypophyse et leur relation spatiale avec les autres cellules facilitent la communication paracrine (Perez *et al.* 1995, Schwartz *et al.* 1996), et les signaux produits régulent localement leur activité. En même temps, les cellules somatotropes qui expriment elles aussi le GHR (Mertani *et al.* 1995) régulent leurs propres synthèse et sécrétion par autocrinie (Allaerts *et al.* 1990). Une action intracrine beaucoup discutée, peut également être envisagée (Harvey et Hull 1997) puisque les sites de liaison de la GH ne sont pas restreints à la membrane plasmique des cellules somatotropes mais sont présents à la fois dans le cytosol, sur la membrane nucléaire (Hull *et al.* 1992) et dans le noyau (Lobie *et al.* 1994).

Un certain nombre de tissus incluant le système immunitaire, le cerveau, les organes reproducteurs et la glande mammaire sont maintenant reconnus comme des unités autonomes de synthèse, de régulation et d'action de la GH. Cette production de GH et bien souvent des facteurs régulateurs, en dehors de l'axe hypothalamo-hypophysaire, aurait un impact local qui s'ajouterait aux interactions endocrines traditionnelles entre la GH, ses facteurs de régulation hypothalamiques et ses tissus-cibles (Harvey et Hull 1997).

Cette GH extra-hypophysaire est donc synthétisée en faible quantité sur son lieu d'action où elle a des effets pleiotropiques de type autocrine / paracrine. Son récepteur appartient à la superfamille des récepteurs des cytokines. Sa liaison sur son récepteur déclenche une transduction du signal qui fait intervenir les STAT et les MAP kinases. Tous ces éléments sont en fait les propriétés fondamentales des cytokines, molécules de signalisation impliquées dans la régulation de la différenciation cellulaire, le développement tissulaire et l'homéostasie (Nicola 1994). Elles apparaissent plus précisément comme les régulateurs majeurs de la réponse locale à un stress immunologique conduisant à une

stimulation ou une inhibition d'événements cellulaires comme la catalyse enzymatique, le réarrangement du cytosquelette ou l'expression de gènes spécifiques. C'est sous cet angle que nous allons considérer la GH extra-hypophysaire en essayant d'inventorier, d'après les données actuelles de la littérature, non seulement ses différents lieux de synthèse mais le rôle qu'elle pourrait jouer localement.

5.1.3.1 - GH et système immunitaire

L'expression du gène de la GH a été détectée dans les lymphocytes (Weigent *et al.* 1991a) et cette production locale de GH influence le développement des cellules immunitaires puisque l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens inhibe la prolifération des lymphocytes (Weigent *et al.* 1991b). Certaines lignées cellulaires issues de lymphomes humains synthétisent et sécrètent de la GH. C'est le cas notamment, des cellules IM-9 (Kao *et al.* 1992), SfRamos (Lytras *et al.* 1993), et Ba/F3 (Jeay *et al.* 2000). L'expression des ARNm codant pour la GH est mise en évidence par RT-PCR dans la rate, le thymus, les ganglions et les autres tissus du système immunitaire (Wu *et al.* 1996). Par ailleurs, la présence du facteur transcriptionnel Pit-1 sur le lieu de synthèse de la GH suggère fortement son intervention dans une régulation locale de la production de GH dans la rate, la moelle osseuse et le thymus (Delhase *et al.* 1993). Il est bien établi que chez plusieurs espèces (chien, singe) des injections prolongées de GH suppriment l'involution thymique et stimulent la croissance des tissus lymphoïdes (Goff *et al.* 1987, Monroe *et al.* 1987, Johnson *et al.* 1996). Pourtant, les enfants qui présentent un déficit de la sécrétion de GH hypophysaire ne sont pas pour autant, atteints de troubles de la fonction immunitaire (Auernhammer et Strasburger 1995). Il faut alors envisager que la synthèse locale de GH supplée au déficit systémique. Hypothèse confortée par le fait que les enfants atteints d'un syndrome de Laron caractérisé par un récepteur inactif ont une mortalité plus importante due à la déficience de leur système immunitaire (Rosenfeld *et al.* 1994), la GH locale ne pouvant exercer ses effets (Pankov 1999). Une action de type autocrine / paracrine doit être attribuée à la GH extra-hypophysaire qui apparaît maintenant comme un régulateur du système immunitaire en particulier dans des conditions de stress (Jeay *et al.* 2002).

Si les organes lymphoïdes ont été les premiers sites identifiés d'expression des ARNm codant pour la GH extra-hypophysaire, de nombreux autres sites ont été mis en évidence depuis, notamment le système nerveux central, les dents, l'appareil reproducteur, la glande mammaire. Autant de lieux où la présence du GHR suggère une action locale de la GH qui doit être maintenant considérée comme une véritable cytokine (Waters *et al.* 1999).

5.1.3.2 - GH et système nerveux central

Il est maintenant bien établi que le cerveau est un lieu de synthèse de GH (Morel *et al.* 1986, Harvey *et al.* 1993). Le gène de la GH est exprimé dans différentes parties du cerveau de rat (télencéphale, diencephale, métencéphale) (Gossard *et al.* 1987, Martinoli *et al.* 1991). Une protéine identique à la GH hypophysaire sur le plan immunologique, poids moléculaire et bioactivité a été mise en évidence dans des homogénats de cerveau de rats mais elle ne représente que 1% de la quantité présente dans l'hypophyse. D'autres protéines « GH-like » d'un poids moléculaire plus petit ou plus gros que celui de la GH hypophysaire de 22 kDa ont été également identifiées (Noteborn *et al.* 1993). L'immunoréactivité est localisée à la fois dans le péri-karyon, les fibres et les axones terminaux, elle est plus abondante dans les noyaux hypothalamiques, du moins chez le rat, en association avec les neurones à SRIF et à TRH (Lechan *et al.* 1981, 1983).

La possibilité que cette GH neuronale puisse agir d'une manière autocrine / paracrine est confortée par la présence de sites de liaison (GHBP ou GHR) dans les mêmes régions du cerveau. L'expression du gène du GHR a été, par exemple, démontrée dans l'hippocampe, les noyaux péri- et para-ventriculaires et le noyau arqué de l'hypothalamus de rat (Lobie *et al.* 1993). Les neurones exprimant le GHR ont été identifiés comme 60% des neurones à SRIF dans le noyau péri-ventriculaire (Minami *et al.* 1993), les neurones à GH-RH et à neuropeptide Y dans le noyau arqué (Kamegai *et al.* 1994).

Le cerveau est un tissu-cible de la GH dont les effets ont été déduits des corrélations établies entre la pathologie et l'insuffisance ou l'excès de sa synthèse hypophysaire. Quelle part revient à la GH synthétisée dans le cerveau ? Il est très difficile de l'estimer puisque la GH hypophysaire accède à toutes ces régions par la circulation portale hypophysaire dans le sens rétrograde et son passage au travers de la barrière hémocéphalique *via* son transport récepteur-dépendant (Lai *et al.* 1991, Johansson *et al.* 1995). Néanmoins, l'association étroite entre des neurones à SRIF exprimant le GHR et les neurones synthétisant la GH pourrait suggérer une régulation locale, d'autant plus que l'expression du SRIF hypothalamique diminue lorsque la synthèse du GHR est bloquée par une administration centrale d'un oligodésoxynucléotide antisens GH (Pellegrini *et al.* 1996). De la même manière, chez les rats transgéniques surexprimant le gène de la GH dans l'hypothalamus, une réduction de l'expression du gène du GH-RH hypothalamique est observée (Flavell *et al.* 1996). De

nombreuses études sont cependant encore nécessaires pour comprendre la fonctionnalité du système GH cérébral.

5.1.3.3 - GH et odontogénèse

L'implication de la GH dans le développement et la taille des dents est aujourd'hui évidente (Young 1999). Dès 1992, Zhang *et al.* démontraient la présence du GHR à différents stades du développement dentaire, suggérant ainsi une action directe de la GH. Une synthèse locale de GH dont les effets s'ajoutent à ceux de la GH systémique intervient sur la formation des tissus durs, de la pulpe et la différenciation des fibroblastes ligamentaires. Capable de réguler la division cellulaire, elle agit également sur la formation des protéoglycans matriciels dont la decorin et le biglycan (Zhang *et al.* 1997).

5.1.3.4 - GH et système reproducteur

Les organes reproducteurs sont des sites de synthèse de GH, en effet, la protéine a été détectée dans le tractus génital du fœtus souris au 18^{ème} jour de son développement (Nguyen *et al.* 1996), et les messagers codant pour la GH ont été mis en évidence dans le testicule humain (Untergasser *et al.* 1996).

L'immunoréactivité du GHR est abondamment présente dans les canaux de Wolff et de Müller, l'épididyme, les vésicules séminales et les gonades chez le fœtus de rat (Garcia-Aragon *et al.* 1992). Cette même distribution est retrouvée chez le rat adulte et les auteurs précisent que l'immunoréactivité est importante aussi bien dans les cellules de Leydig que les cellules de Sertoli alors qu'elle est nettement plus faible dans les spermatides (Lobie *et al.* 1990, Reiter *et al.* 1992). Chez la femelle, la présence du GHR a été démontrée dans les oviductes, l'utérus, l'ovocyte et les cellules de la thèque et de la granulosa des follicules (Lobie *et al.* 1992).

L'abondance de l'immunoréactivité détectée aussi bien pour la GH que le GHR dans le tractus génital fœtal est en faveur d'une action paracrine / autocrine de la GH d'autant plus que la GH hypophysaire fœtale est absente jusqu'au 18^{ème} jour de gestation chez le rat (Rieutort 1974). Hypothèse renforcée par le fait qu'*in vitro*, un serum anti-GH bloque la différenciation des canaux de Wolff chez le fœtus de souris, alors que la GH exogène stabilise les canaux de Wolff chez le fœtus femelle (Nguyen *et al.* 1996). Bien qu'une synthèse locale de GH dans les organes génitaux n'ait pas été réellement démontrée chez l'adulte, elle est fortement suspectée et il ne serait pas étonnant qu'elle participe à sa manière aux effets déjà démontrés de la GH sur la mobilité des spermatozoïdes (Breier *et al.* 1996), sur la

spermatogénèse et les cellules de Sertoli (Swanlund *et al.* 1995), sur la prolifération des cellules de Leydig (Closset *et al.* 1991) et sur les cellules de granulosa (Hong et Herington 1991).

5.1.3.5 - GH et glande mammaire

Le développement de la glande mammaire chez la femelle est rigoureusement contrôlé par la fonction ovarienne. C'est un modèle unique dans lequel se succèdent les phases de prolifération, différenciation et de régression à chaque cycle ovarien ou période de gestation. Oestrogènes et progestérone sont indispensables au développement normal des canaux dont les cellules épithéliales présentent les récepteurs ER (« Oestrogen Receptor ») et PR (« Progesteron Receptor ») (Russo et Russo 1998). Au moment de la puberté, l'allongement et la connexion des canaux sont positivement régulés par la GH hypophysaire (Lincoln *et al.* 1995). Bien que son mécanisme d'action ne soit pas encore parfaitement élucidé, il semble qu'elle stimule directement le développement canalaire chez des animaux hypophysectomisés et ovariectomisés (Kelly *et al.* 1974), par l'intermédiaire de son récepteur membranaire largement présent dans les cellules épithéliales et dans les cellules fibroblastiques du stroma (Mertani *et al.* 1998). Une synthèse de GH extra-hypophysaire a été démontrée dans la glande mammaire du chien après traitement par la progestérone (Selman *et al.* 1994, Mol *et al.* 1996). Le gène de la GH étant un gène-cible de la progestérone dans la glande mammaire (Lantinga-van Leeuwen *et al.* 2000). Les ARNm codant pour la GH ont été mis en évidence dans la glande mammaire humaine normale (Mol *et al.* 1995a) suggérant son rôle de facteur de croissance local agissant sur la prolifération et la différenciation de la glande mammaire en particulier durant la phase lutéale du cycle et sur la maturation finale des lobules sécrétoires en fin de gestation. L'augmentation de l'activité de prolifération cellulaire hormono-dépendante pourrait être responsable du risque que présente la glande mammaire à la transformation néoplasique (Mol *et al.* 1996). Ainsi, les effets paracrine / autocrine de la GH pourraient jouer un rôle important dans le développement du cancer mammaire chez la femme, rôle déjà démontré chez le chien et le chat (Mol *et al.* 1995b).

5.1.4 - Les minihypophyses, hypothèse de régulation locale

De la même manière que la synthèse et la libération de la GH hypophysaire sont sous le contrôle de peptides hypothalamiques et dépendent de rétrocontrôles provenant de ces tissus-cibles, la GH extra-hypophysaire pourrait être régulée par ces mêmes stimuli mais de façon autocrine / paracrine (Harvey et Hull 1997). En effet, il est maintenant bien établi qu'une minihypophyse fonctionne dans le système immunitaire où, par exemple, le GH-RH

est très abondant dans les lymphocytes de rat et humains (Weigent *et al.* 1991a, Stephanou *et al.* 1991) et les récepteurs du GH-RH sont présents dans les thymocytes et les splénocytes de rat (Matsubara *et al.* 1995, Guarcello *et al.* 1991). Les ARNm codant pour le SRIF ont également été détectés dans les lymphocytes humains (Bhathena *et al.* 1981) et dans quelques cellules B de la rate et cellules T du thymus de rat (Aguila *et al.* 1991). Mais, bien que les ARNm du GRF et du SRIF soient présents dans les organes lymphoïdes, des concentrations physiologiques de ces deux peptides n'influencent pas la sécrétion de GH par les lymphocytes humains (Hattori *et al.* 1994), ce qui pourrait suggérer que la régulation de cette sécrétion implique des mécanismes différents de ceux impliqués dans la régulation de la sécrétion hypophysaire (Pankov 1999). Pourtant, les récepteurs du SRIF sont bien présents sur les cellules lymphoïdes (Aguila *et al.* 1991) et les effets du SRIF sur les macrophages et la fonction immune ont été démontrés (Aguila *et al.* 1996).

De semblables minihypophyses fonctionnent également dans d'autres organes sources de GH extra-hypophysaire. Dans le placenta, il faut noter cependant que le cDNA et le poids moléculaire du GRF placentaire est plus important que la forme hypothalamique (Mizobuchi *et al.* 1995). Dans les organes reproducteurs, le rôle du GRF n'est pas clair d'autant plus que son récepteur n'est pas détecté dans les ovaires et les testicules ni chez le rat, ni chez l'homme (Matsubara *et al.* 1995). Le GRF et le SRIF sont présents dans la glande mammaire (Benlot *et al.* 1997) mais la sécrétion de GH par la glande mammaire ne semble pas affectée par aucun peptide (Loveridge et Farquharson 1993). Ces minihypophyses pourraient agir de manière aiguë et tissu-spécifique alors que l'axe somatotrope traditionnel régulerait les événements à long terme. Cependant, chaque minihypophyse est régulée, au moins en partie, par des facteurs spécifiques comme la progestérone pour la GH mammaire et les cytokines pour la GH immune. Cette spécificité qui entoure la production de GH dans un tissu donné, permet ainsi une réaction ciblée en réponse à des événements locaux qui ne désorganise pas l'homéostasie des autres organes (Harvey et Hull 1997).

5.2 - GH et progression tumorale

5.2.1 - GH « endocrine »

5.2.1.1 – Action indirecte

De récentes études épidémiologiques montrent une corrélation entre le taux d'IGF-I circulant et l'incidence des pathologies cancéreuses (Yu et Rohan 2000). Hankinson *et al.*

(1998) montrent qu'un taux élevé d'IGF-I circulant augmente le risque de cancer du sein chez la femme préménopausée tandis que Chan *et al.* (1998) l'associent au cancer de la prostate chez l'homme. D'autres études, cependant, n'ont pas validé cette relation, ni pour le cancer de la prostate (Serel *et al.* 2000) ni pour le cancer du sein (Jernstrom *et al.* 1999) dont l'étude prospective «the Rancho Bernardo Study» a concerné un grand nombre de patientes. Les contradictions de ces études sont dues à de multiples facteurs. En effet, le déterminant hormonal majeur du taux d'IGF-I est la GH. Il dépend de plus, de la concentration en protéines de liaison, les IGFBP, en particulier l'IGFBP-3, qui entre en compétition avec les IGFR pour la liaison d'IGF-I. Or, l'augmentation de la protéolyse d'IGFBP-3 et de la concentration d'IGFBP-2 ont été montrées dans certains cancers (Hankinson *et al.* 1998, Petridou *et al.* 1999) ; il est donc évident que les processus tumoraux sont à l'origine d'un certain nombre de perturbations du système GH-IGF-I. Comme les signes cliniques apparaissent souvent des années après la déclaration du cancer, il est fort possible que les études prospectives incluent des patients qui sont sur le point de déclarer la maladie. Cette hétérogénéité de l'échantillonnage expliquerait en partie les discordances des études épidémiologiques réalisées (Holly *et al.* 1999).

Alors que les études se poursuivent pour confirmer ou infirmer le rôle de l'IGF-I et éventuellement de l'IGFBP-3 comme facteurs de risque dans le développement tumoral, le rôle de la GH comme activateur potentiel du système doit être considéré avec prudence. D'autant plus que d'autres études épidémiologiques concernant le risque de carcinogénèse associé à l'acromégalie montrent autant de contradictions. Certains, comme Ron *et al.* (1991) et Popovic *et al.* (1998) mettent en évidence une corrélation entre l'hypersécrétion de GH et le développement tumoral en particulier gastro-intestinal tandis que d'autres (Ladas *et al.* 1994, Delhougne *et al.* 1995) ne peuvent établir de corrélation significative. D'ailleurs, une étude anglaise (Orme *et al.* 1998), considérée par beaucoup comme l'étude de référence dans le domaine, indique que l'incidence des pathologies tumorales n'est pas augmentée chez les patients atteints d'acromégalie. C'est le cas pour les cancers de la prostate, du sein, du poumon et même du colon pour lequel, certains avaient pourtant montré une plus grande fréquence chez les acromégales (Sonksen *et al.* 1997). Dans le même sens, le nombre de cancer n'est pas plus élevé chez les adultes qui ont été traités pour une déficience en GH dans leur enfance (Abs *et al.* 1999). Néanmoins, il faut signaler que l'acromégalie est associée à une organomégalie et à une augmentation importante de l'incidence des hyperplasies bénignes incluant les polypes du colon et les hyperplasies prostatiques (Colao *et al.* 1997a, b). D'autre part, un traitement par de fortes doses de GH provoque une hyperplasie de la glande

mammaire chez les primates femelles âgées (Ng *et al.* 1997). Il faut sans doute considérer que la GH ou l'IGF-I circulants augmente par leur action mitogénique, le « turn over » cellulaire dans les tissus qui, à terme, induirait une prédisposition à la transformation néoplasique (Cohen et Ellwein 1990). Il faut également attendre les résultats du National Institute of Aging qui étudie les effets de la GH en traitement à long terme sur le vieillissement pour déterminer le ratio bénéfice / risque de cette hormone (Cohen *et al.* 2000). Il semble d'ores et déjà qu'une surveillance régulière des taux d'IGF-I et d'IGFBP-3 est indispensable et que le traitement est suspendu chez les patients qui présentent un taux d'IGF-I au dessus de la moyenne et un taux d'IGFBP-3 trop bas. En effet, la PSA, « Prostatic Specific Antigen », ou la cathepsine D peuvent agir comme des protéases vis à vis de l'IGFBP-3 (Cohen *et al.* 1994). Cette protéolyse dans la prostate ou le sein pourrait favoriser la propagation locale d'un foyer néoplasique existant (Kanety *et al.* 1993). Ces marqueurs sont validés par de récentes études qui montrent qu'un taux élevé d'IGF-I associé à un faible taux d'IGFBP-3 permet d'identifier les sujets qui présentent un risque supérieur à la normale de développer un cancer (Giovannucci *et al.* 2000a, b, Yee 2001).

Avec les modèles animaux l'implication de la GH dans le développement tumoral paraît plus évident. C'est le cas dans le modèle de transplantation de tumeurs mammaires chez des souris mutantes lit/lit, souris présentant des taux de GH et d'IGF-I très faibles dus à la mutation du récepteur du GRF. La croissance tumorale est fortement diminuée dans ce modèle suggérant le rôle de la GH et / ou de l'IGF-I sur la progression des tumeurs mammaires (Yang *et al.* 1996). Chez des rats nains qui présentent une réduction du taux d'IGF-I de 50%, une injection de dimethylbenzanthracine (DMBA), un carcinogène puissant de la glande mammaire, ne provoque pas l'apparition de tumeurs. Si ces rats sont traités quotidiennement par des faibles (100 µg / jour) ou fortes (400 µg / jour) doses de GH pendant 27 semaines après l'injection de DMBA, 83% et 100% des animaux développent respectivement des tumeurs mammaires (Ramsey *et al.* 2002). D'une manière identique, les rats nains SDR « Spontaneous Dwarf Rat » qui présentent une mutation du gène codant pour la GH inhibant sa capacité à se lier à son récepteur, développent beaucoup moins de cancers mammaires que les rats contrôles après exposition à un carcinogène puissant, le N-méthyl-N-nitrosourea (Swanson et Unterman 2002).

5.2.1.2 - Action directe

Le GHR est, nous l'avons vu, distribué d'une manière ubiquitaire dans l'organisme. Ces dernières années un certain nombre de travaux ont montré sa surexpression dans les

cancers de divers organes. Dans l'hépatocarcinome, les deux formes du récepteur ont été identifiées (Esposito *et al.* 1994), la forme dite « normale » et la forme qui résulte de la délétion de l'exon 3, précédemment isolée du placenta. Récemment, une augmentation de l'expression du GHR a été constatée dans l'hépatocarcinome par rapport au foie normal (Garcia-Caballero *et al.* 2000) suggérant que l'effet prolifératif de la GH puisse être activé par l'augmentation de l'expression du GHR. Le GHR est également fortement exprimé dans les lésions bénignes et carcinomateuses de la peau et il semblerait que l'immunoréactivité soit plus faible dans le cancer à cellules squameuses et corrélé directement avec le grade de la différenciation cellulaire (Ginarte *et al.* 2000). Pourtant, dans l'hyperplasie et le cancer de la prostate, Kolle *et al.* (1999) constatent une expression importante du GHR sans pouvoir distinguer entre les deux pathologies, alors qu'ils ne détectent pas le GHR dans l'épithélium prostatique normal. Dans diverses lignées cellulaires de cancer prostatique, Chopin *et al.* (2002) identifient le GHR et le colocalise avec une synthèse autocrine de GH qui pourrait agir sur la prolifération cellulaire directement *via* le GHR ou indirectement *via* la production des IGF .

De plus nombreuses études sont consacrées au cancer de la glande mammaire qui apparaît comme un modèle unique d'étude du développement tumoral. C'est pourquoi nous en avons fait l'objet de notre travail. Nous focaliserons donc les données bibliographiques sur l'implication de la GH dans l'initiation, le développement et le pouvoir métastatique du carcinome mammaire.

Dès 1995, Decouvelaere *et al.* montrent pour la première fois l'expression du gène du GHR dans des biopsies et des lignées cellulaires T-47D, MCF7 et BT20 issues de cancers du sein, suggérant ainsi une action spécifique directe de la GH dans le développement tumoral. Une étude par hybridation *in situ* et immunocytochimie (Mertani *et al.* 1998) a permis d'identifier les différents types cellulaires qui expriment le GHR dans différents types de lésions mammaires incluant des pathologies bénignes et carcinomateuses de divers grades. Non seulement les cellules épithéliales tumorales mais les cellules stromales réactionnelles expriment fortement le GHR, elles sont des cibles pour la GH qui contribue ainsi au phénomène de prolifération tumorale. Observations confirmées par Gebre-Medhin *et al.* (2001) qui montrent une surexpression du GHR dans les foyers tumoraux par rapport au tissu sain adjacent. Ils affirment de plus que l'expression du GHR est inversement proportionnel au grade de la tumeur et qu'elle est par contre positivement régulée avec le récepteur de la progestérone. Van Garderen *et al.* (1999), quant à eux, décrivent une immunoréactivité importante mais hétérogène pour le GHR, non corrélée à la gravité du diagnostic

histopathologique des différents carcinomes mammaires du chien. Malgré ces quelques discordances, les auteurs sont unanimes sur une expression accrue du GHR dans le tissu mammaire tumoral par rapport au tissu sain, en faveur d'une action directe de la GH. Action directe démontrée dans l'expérimentation conduite par Ng *et al.* (1997) qui induit des hyperplasies mammaires chez des singes par un traitement à la GH. Dans cette étude, les singes femelles de 16 à 20 ans sont traitées pendant 7 semaines soit par la GH ou l'IGF-I seuls soit par la combinaison des deux. Les effets les plus importants sont obtenus sur le groupe qui a été traité par l'association GH-IGF-I, mais d'une manière intéressante, le groupe traité par la GH seule présente une plus forte augmentation du nombre et de la taille des lobules par rapport au groupe qui a reçu seulement IGF-I, précisant ainsi que la GH exerce une action directe, non médiée par IGF-I sur les cellules épithéliales de la glande mammaire.

5.2.2 - GH « autocrine »

5.2.2.1 - Mise en évidence dans la glande mammaire pathologique

C'est tout récemment qu'une synthèse de GH a été mise en évidence dans la glande mammaire normale et les tumeurs mammaires suggérant une fonction paracrine à cette hormone qui interviendrait dans le développement tumoral (Kurtz *et al.* 1993, Clevenger *et al.* 1995, Mol *et al.* 1995a, b). C'est d'abord chez le chien et le chat que Mol *et al.* (1995b) mettent en évidence par PCR en phase liquide, les ARNm codant pour la GH dans des tumeurs mammaires induites par un progestatif : l'acétate de médroxyprogestérone (MPA). La même année, une étude conduite chez l'homme révèle une expression de GH dans 6 sur 8 tumeurs mammaires bénignes et dans 7 sur 11 tumeurs malignes (Mol *et al.* 1995a). Une analyse du produit d'amplification montre 100% d'homologie avec la séquence du gène codant pour la GH hypophysaire (Mol *et al.* 1996).

5.2.2.2 - Induction de sa synthèse mammaire par les progestatifs

Le rôle des progestatifs dans le cancer mammaire a été largement débattu (Horwitz 1991, Pike *et al.* 1993). De nombreuses études de toxicité ont été menées concernant le rôle des androgènes et des progestatifs chez le chien. Un traitement prolongé par les androgènes n'induit pas de cancer mammaire alors qu'un traitement par un progestatif de synthèse augmente de manière dose-dépendante l'incidence de cette pathologie (El Etreby *et al.* 1979, Rutteman 1992). D'ailleurs, l'ovariectomie de la chienne, même tardive, la protège contre le développement tumoral de la glande mammaire (Misdorp 1988). En 1994, Selman *et al.* démontrent qu'un progestatif peut induire une synthèse de GH spécifiquement dans la glande

mammaire par l'existence d'un gradient artério-veineux et la rapide diminution de sa concentration plasmatique après mastectomie complète chez le chien. Les effets biologiques de la progestérone sont transmis par ses récepteurs nucléaires (PR). Chez la plupart des mammifères, deux types sont connus : le PR-A (81-94 kDa) et le PR-B (116-120 kDa), chez l'homme il existe une forme supplémentaire tronquée, de 60 kDa, mais biologiquement active (Wei *et al.* 1996). Les deux isoformes A et B ont été identifiées et localisées dans les cellules épithéliales de la glande mammaire normale et pathologique et, chez le chien, Lantinga-van Leeuwen *et al.* (2000) montrent leur co-localisation immunocytochimique avec la GH. Or, la liaison de la progestérone à l'un ou l'autre de ses récepteurs entraîne l'association du complexe formé (progestérone-PR) à des séquences spécifiques d'ADN, PRE « Progesterone Response Element » situées dans la région promotrice de ses gènes-cibles. De plus, une séquence « Progesterone/Glucocorticoid Response Element » (PRE/GRE) a été identifiée dans la région 5' du gène de la GH de chien. La co-localisation de la GH avec les PR serait donc en faveur, du moins chez le chien, d'une action directe de la progestérone, via sa liaison avec les PR, sur la transactivation du gène de la GH (Lantinga-van Leeuwen *et al.* 2000). Ces mêmes auteurs précisent pourtant que toutes les cellules PR-positives ne synthétisent pas la GH et qu'il n'existe pas de différence significative entre les rapports PR / cellules qui expriment fortement le gène de la GH et PR / cellules qui expriment faiblement le gène de la GH, suggérant ainsi que d'autres facteurs interviennent dans le contrôle de l'expression de la GH mammaire (Lantinga-van Leeuwen *et al.* 2000). Chez l'homme, Gregoraszczyk *et al.* (2001), après avoir classé des explants issus de divers cancers mammaires selon leur phénotype récepteurs ▲strogène / progestérone (ER⁻ PR⁻, ER⁺ PR⁻, ER⁺ PR⁺, ER⁻ PR⁺), montrent que toutes, sauf les cellules ER⁻ PR⁻, répondent *in vitro* à une stimulation par la progestérone en synthétisant des taux élevés de GH, d'IGF-I et de prolactine. Les auteurs concluent que dans les cancers mammaires PR⁺, la progestérone augmente la synthèse locale de ces trois hormones qui stimulent la prolifération des tumeurs mammaires.

5.2.2.3 - Ses effets, modélisation *in vitro*

Pour mieux appréhender le mécanisme d'action autocrine / paracrine de la GH « mammaire », le groupe de Lobie travaille depuis quelques années sur une lignée cellulaire issue d'un carcinome mammaire, les MCF7. Ces cellules ont été transfectées d'une manière stable, soit avec un vecteur d'expression contenant le gène de la GH, ces MCF7-hGH synthétisent alors la GH qui se retrouve dans le milieu de culture ; soit avec un vecteur d'expression contenant le gène de la GH dont le codon « start » a été inactivé, ces MCF7-

MUT peuvent transcrire le gène de la GH mais ne peuvent traduire la protéine. Dans un premier temps, la réponse cellulaire à cette stimulation par la GH endogène a été comparée à celle induite par une GH exogène (Liu *et al.* 1997). La GH est connue pour activer le gène *spi* « serine protease inhibiteur » par le biais de l'activation de facteurs de transcription (STAT1, 3 et 5) qui se lient sur un « Gas Like Element » (GLE) de son promoteur. C'est la forte activation de SPI-GLE1-CAT « Chloranphenicol Acetyl Transférase » qui démontre la réponse transcriptionnelle de la cellule à une stimulation par la GH qu'elle soit endogène ou exogène. Les cellules MCF7 possèdent le GHR de manière intrinsèque mais une transfection transitoire du GHR de même que des concentrations croissantes de plasmides pMT-hGH augmentent de manière très significative l'expression de CAT. Les auteurs précisent enfin que les effets de la GH exogène s'ajoutent aux effets de la GH autocrine. Les cellules MCF-GH prolifèrent davantage que les cellules MCF-MUT et cette activation mitogénique est supprimée après inhibition des voies de transduction du signal qui font intervenir les p38 MAPK et p42/44 MAPK (Kaulsay *et al.* 1999).

Les effets de cette production autocrine de GH sur l'expression des gènes dans les cellules carcinomateuses mammaires ont été étudiés par la technique du « cDNA array » (Mertani *et al.* 2001). Sur 588 gènes criblés, 52 sont régulés par la GH, 28 négativement, 24 positivement. Parmi ceux-ci, le gène *chop* « C/EBP homologous protein » est impliqué dans le phénomène d'apoptose. Il code pour une protéine de 28 kDa dont l'expression est plus importante dans les cellules MCF7-hGH que dans les cellules MCF7-MUT. Cet activateur de transcription agit par l'intermédiaire de la voie p38 MAP kinase et sa surexpression dans les cellules mammaires carcinomateuses stimulées par la GH les protège contre l'apoptose. Ainsi, c'est, entre autre, par l'activation transcriptionnelle du gène *chop* que la GH régule la prolifération cellulaire dans les tumeurs mammaires.

La même technique du « cDNA array » montre que le gène du *PTGFβ* « Placental Transforming Growth Factor β » est régulé négativement par la GH (Graichen *et al.* 2002). Le *PTGFβ* est une protéine récemment identifiée qui montre 25% d'homologies avec le *TGFβ* « Transforming Growth Factor » et en possède de nombreuses caractéristiques (Lawton *et al.* 1997). Le *PTGFβ* utilise soit le type I, soit le type II du récepteur du *TGFβ* pour arrêter le cycle cellulaire et induire l'apoptose (Tan *et al.* 2000). C'est donc par l'inhibition de ce facteur pro-apoptotique que la GH autocrine augmente la durée de vie des cellules carcinomateuses mammaires et participe au développement tumoral.

La cycline D1, cycline exprimée préférentiellement dans la glande mammaire (Musgrove *et al.* 1996), a un rôle déterminant sur la prolifération cellulaire par son action sur la phase G₁ du cycle cellulaire (Sherr 1995). Or, dans les cellules MCF-hGH, la GH autocrine stimule fortement la transcription du gène de la cycline D1 et lorsque ces mêmes cellules sont transfectées transitoirement avec le gène du PTGFβ, le taux de cycline D1 diminue de manière aiguë. Ainsi, l'inhibition de l'expression de la cycline D1 par le PTGFβ pourrait pallier à la stimulation du cycle cellulaire induite par la GH autocrine (Graichen *et al.* 2002). Ces résultats sont importants si l'on considère que le taux de cycline D1 est élevé dans un fort pourcentage de carcinomes mammaires (Barnes 1997) et que les souris transgéniques surexprimant la cycline D1 présentent une forte incidence de cancers de la glande mammaire (Wang *et al.* 1994). Le mécanisme par lequel le PTGFβ inhibe l'expression de la cycline D1 induite par la GH est encore inconnu et complexe du fait qu'aussi bien le PTGFβ, la cycline D1 que la GH autocrine activent la voie des MAPK p44/42. La transcription du gène de la cycline D1 est aussi régulée par STAT5 et dans des observations non publiées, le groupe de Lobie a montré que le PTGFβ inhibe la transcription médiée par STAT5. C'est donc par ce mécanisme que le PTGFβ pourrait inhiber l'expression de la cycline D1.

Ainsi, la GH autocrine agirait d'une manière indirecte, soit en réprimant la transcription de facteurs qui favorisent l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, soit en activant la transcription de facteurs qui stimulent l'activité mitotique et la survie cellulaire. Son action sur la prolifération cellulaire et le développement tumoral ferait donc intervenir des molécules effectrices qui, elles, sont directement impliquées dans la fonction cellulaire.

5.2.2.4 - Son mécanisme d'action

Peu de travaux sont consacrés au système de signalisation qu'emprunterait spécifiquement la GH autocrine dans le cas précis du développement tumoral. Un travail sur les lignées cellulaires MCF7 montre une activation de JAK2 dans les cellules MCF7-hGH par rapport aux cellules MCF7-MUT, corrélé avec leur pouvoir de migration sur une matrice collagénique (Kaulsay *et al.* 2000). L'interaction entre la GH autocrine et la matrice extracellulaire pourrait faire intervenir la protéine FAK (Cary et Guan 1999). En effet, la GH stimule l'association de JAK2 sur la protéine FAK et, en conséquence l'activation de FAK et deux de ces substrats la paxilline et la tensine (Zhu *et al.* 1998). Elle induit également la formation d'un complexe multiprotéique de signalisation organisé autour des protéines CrkII et p130^{Cas} qui sont directement impliquées dans la migration cellulaire (Klemke *et al.* 1998).

Ces études *in vitro* laissent imaginer le rôle de la GH dans la formation de métastases à partir du carcinome mammaire.

L'importance de STAT5 dans le développement fonctionnel de la glande mammaire a déjà été rapportée (§ 4.5.2). Gallego *et al.* 2001 précisent que la GH, la prolactine et l'EGF « Epidermal Growth Factor » activent STAT5 dans des compartiments différents de la glande mammaire reflétant ainsi leur action spécifique sur la différenciation et le développement canalaire et alvéolaire ; la GH activant STAT5 aussi bien dans les cellules épithéliales que dans les cellules du stroma. Comme les cellules MCF7, les cellules CMT-U335 issues de tumeurs mammaires canines répondent par une importante activation de STAT5 à une stimulation par la GH (van Garderen *et al.* 2001). La phosphorylation de STAT5 s'avère un facteur important dans les processus tumoraux puisque dans les lignées cellulaires dérivées de patients atteints de leucémie myéloïde chronique, STAT5 est activé de manière constitutive (Shuai *et al.* 1996) et qu'un inhibiteur spécifique de JAK2 (AG490) bloque la croissance des cellules leucémiques *in vitro* et *in vivo* en induisant l'apoptose sans effet délétère sur l'hématopoïèse (Meydan *et al.* 1996).

De récentes études montrent que les cancers mammaires présentent une proportion augmentée de cellules contenant une forme activée des MAPK (Santen *et al.* 2002). En effet, Sivaraman *et al.* (1997), apporte la première démonstration de l'activation des MAPK dans les cancers mammaires humains. Les 11 tumeurs étudiées présentent des taux élevés de MAPK activées, retrouvés en immunohistochimie dans les cellules épithéliales tumorales à la fois dans les tumeurs primaires et dans les métastases lymphatiques. Sahl *et al.* (1999), montrent une augmentation des MAPK activées, proche de 2,5 fois, dans 50% des cancers mammaires qu'ils étudient. Muller *et al.* (2000), quant à eux, en font un élément pronostic puisqu'il différencie une augmentation plus importante des MAPK activées dans les cancers mammaires dont les ganglions lymphatiques sont envahis par rapport au cancers non métastatiques. Une question se pose alors : est ce que cette activation provient d'une mutation de *Ras* ou d'une régulation positive des récepteurs des facteurs de croissance ? Linting *et al.* trouvent un taux élevé de MAPK activées dans 11 cancers mammaires sur 20. Aucun ne présente de mutation de *Ras*, en revanche, ils notent la présence d'EGF et une expression importante de erb-B2/Neu (EGFR) associées à l'activation des MAPK. Ainsi l'activation importante des MAPK dans le cancer mammaire serait induit par les facteurs de croissance et la GH pourrait participer à cette induction.

En effet, Yamauchi *et al.* (1997) démontrent que la GH peut également, par l'intermédiaire de JAK2 phosphorylée, activer les membres de la famille des récepteurs des

EGF, les EGFR. Ils sont au nombre de 4 : erbB2, erbB3, erbB4 et EGFR. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires d'environ 170 kDa qui possèdent une activité tyrosine kinase intrinsèque (Favoni et De Cupis 2000). Dans des travaux non publiés, Zhu et Lobie démontrent que la GH phosphoryle erbB2 dans les cellules NIH-3T3 et CHO-GHR. De 10 à 30% des cancers mammaires, gastriques et ovariens surexpriment le gène *erbB2* de manière suffisante pour que la protéine soit détectable en immunocytochimie sur des coupes de tissus inclus en paraffine (Kern *et al.* 1990, Paik *et al.* 1990). Cette caractéristique a facilité les approches tendant à faire de erbB2 un marqueur pronostic d'évolution tumorale. La phosphorylation de l'EGFR induit une cascade de réactions qui débute par la liaison de la protéine Grb2 sur la tyrosine phosphorylée 1068 (Egan *et al.* 1993, Rozakis-Adcock *et al.* 1993, Yamauchi *et al.* 1997). Cette protéine cytoplasmique forme un hétérodimère avec la protéine Sos et déclenche l'activation de la voie Ras-p44/42 MAPK responsable d'une série d'événements conduisant à l'activité mitotique de la cellule. C'est par exemple, l'induction des gènes *c-fos*, *c-myc* et *c-jun*, proto-oncogènes dont la transcription est liée à des processus de prolifération (Chiappetta *et al.* 1992). Une surexpression de *c-myc* a été rapportée dans 15 à 40% des cas de cancers mammaires (Escot *et al.* 1986) et dans de nombreux systèmes *c-myc* régule l'expression de gène, favorise la prolifération cellulaire, inhibe la différenciation, module l'adhésion cellulaire et la reconnaissance immune (Penn *et al.* 1990). La participation des récepteurs à activité kinase dans la transduction du signal induit par la GH initierait donc bon nombre de ses effets pleiotropiques (Zhu *et al.* 2001).

5.2.2.5 - Sa régulation locale

Pit-1 est un facteur de transcription régulant l'expression du gène de la GH hypophysaire. Lantinga van Leeuwen *et al.* (1999) montrent que les tumeurs mammaires canines qui expriment le gène de la GH expriment irrégulièrement le gène de Pit-1 et en faible quantité, suggérant que la GH mammaire, du moins chez le chien, soit régulée différemment. Pourtant, tout récemment Pit-1 a été associé à la synthèse de GH dans les cellules MCF7 (Gil-Puig *et al.* 2002), mais son rôle n'est pas clair. Les auteurs n'ont pas déterminé s'il régule l'expression du gène de la GH autocrine ou s'il peut agir directement sur la prolifération cellulaire.

La présence des récepteurs à SRIF dans le cancer mammaire humain a été mise en évidence par de nombreux auteurs et l'effet anti-tumoral des analogues du SRIF a été montré sur le développement de xénogreffes mammaires tumorales chez la souris nude (Kahan *et al.* 1999).

Depuis la découverte d'une production autocrine de GRF par certains cancers, il semble évident qu'il participe avec son récepteur à leur physiopathologie (Kahan *et al.* 1999). Cependant, la forme hypophysaire du récepteur du GRF n'a pas été retrouvée sur les nombreuses tumeurs étudiées (Chatzistamou *et al.* 2001, Kahan *et al.* 2000). L'isolation et le séquençage de l'ADNc correspondant au récepteur du GRF tumoral révèle qu'il existe 3 variants, SV₁, SV₂ et SV₄ « Splice Variant » du récepteur hypophysaire qui présentent une séquence intronique conservée à leur extrémité 5' et dont les trois premiers exons sont délétés (Rekasi *et al.* 2000). La présence d'une forme active de GRF dans les tumeurs mammaires conforte l'hypothèse qu'une synthèse locale de GRF participe à la prolifération de ces tumeurs (Kahan *et al.* 1999). Les antagonistes du GRF offrent une nouvelle approche pour le traitement des tumeurs mammaires. En effet, Chatzistamou *et al.* 2001 montrent qu'un antagoniste du GRF, le JV-1-36, a une action anti-tumorale sur le développement de xénogreffes de tumeurs humaines œstrogéno-indépendantes (MDA-MB-435) chez la souris nude.

Indépendamment de la GH, une autre hormone hypophysaire, le GnRH, semble jouer un rôle important dans la croissance tumorale. Chez la femme, environ 30% des cancers mammaires sont œstrogéno-dépendants et peuvent être traités par des manipulations hormonales (Tamoxifen). Des études cliniques ont montré l'efficacité d'un traitement par un agoniste du GnRH (Schally 1999) qui agit donc d'une manière indirecte en inhibant l'axe hypophysio-gonadique. Les antagonistes du GnRH n'ont été expérimentés que chez l'animal. Le Cetrorelix, par exemple, inhibe la croissance tumorale des carcinomes mammaires murins et des tumeurs mammaires humaines transplantées chez la souris Nude. Il montre également un effet anti-prolifératif *in vitro* (Schally *et al.* 2001b).

Les hormones hypothalamiques (SRIF, GH-RH, GnRH) qu'elles soient circulantes ou synthétisées localement, semblent donc impliquées dans le développement du cancer mammaire (Schally *et al.* 2001a). La présence de leurs récepteurs dans ces tumeurs mammaires (Fekete *et al.* 1989) a permis la mise au point de thérapies nouvelles utilisant des analogues synthétiques.

Un autre modèle de thérapie s'est récemment révélé efficace dans le traitement de l'acromégalie. Le Pegvisomant est un analogue de la GH (G₁₂₀R) dont l'acide aminé en position 120 a été substitué pour générer un antagoniste. D'autres modifications, en particulier au niveau du site 1 de liaison augmente la demi-vie et réduit l'antigénicité de la molécule (Pradhananga *et al.* 2002). Son efficacité pourrait conduire à l'utiliser dans tous les scénari où la surexpression de GH est associée à des désordres pathologiques. Des études précliniques

récentes montrent en effet, son intérêt dans le traitement des cancers mammaires, du colon et de la prostate (Kopchick *et al.* 2002).

Synthétisée localement, la GH agit comme une cytokine en réponse à une infection ou une agression cellulaire en initiant une cascade de signaux de transduction qui conduisent à une régulation de l'expression génique et à terme, à une activation de la réponse cellulaire. Aussi bénéfique qu'elle soit dans un premier temps, une stimulation excessive ne peut qu'aboutir à un emballement du système, qu'endommager le tissu environnant ou favoriser la prolifération tumorale. C'est pourquoi face à toutes les molécules qui induisent sa propre synthèse, la GH, comme les autres cytokines induit la synthèse de protéines spécifiques, les protéines SOCS « Suppressor Of Cytokine Signaling », capables d'inactiver la réponse cellulaire dans un délai approprié.

6 – Régulation négative du signal induit par les cytokines

Jusqu'à ces dernières années, la majorité des études sur les cytokines ciblaient leur mécanisme d'action jusqu'à ce que, conscients que leurs effets sont limités aussi bien en amplitude qu'en durée, les chercheurs s'orientèrent vers la mise en évidence de facteurs inhibiteurs. Il est actuellement évident qu'au moins trois familles de protéines inhibitrices régulent négativement le signal induit par les cytokines : les protéines tyrosine phosphatases comme SHP-1 « SH2 domain containing protein Phosphatase 1 », les PIAS « Protein Inhibitors of Activated STATs » et les SOCS. Nous nous concentrerons ici sur les SOCS qui ont fait l'objet d'une grande partie de notre travail.

6.1 – Découverte de la famille des protéines SOCS

SOCS-1 a été clonée en 1997 par trois groupes avec des approches expérimentales différentes. Starr *et al.* (1997) clonèrent SOCS-1 en tant qu'inhibiteur de la prolifération et de la différenciation des monocytes leucémiques murins M1 induites par IL-6. Naka *et al.* (1997) identifièrent SOCS-1 à une protéine reconnue par un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine SH2 « Src Homology 2 » des STAT et l'appelèrent SSI « STAT induced STAT inhibitory-1 ». Enfin, Endo *et al.* (1997) clonèrent la même protéine SOCS-1 comme une protéine se liant spécifiquement au domaine catalytique (JH1) de JAK2 et la nommèrent JAB.

Chaque étude identifia la même molécule SOCS-1/JAB/SSI-1 avec un domaine SH2 central, structure semblable à celle de CIS « Cytokine-Inducible SH2-containing protein » qui avait été précédemment clonée comme un facteur modulateur induit immédiatement en réponse à l'activation d'Il-2, Il-3 et l'érythropoïétine (EPO) et pouvant se lier directement à leur récepteur activé (Yoshimura *et al.* 1995).

Une recherche dans les banques de données génomiques a montré l'existence d'une vingtaine de protéines chez la souris et l'homme présentant une séquence commune de 40 acides aminés dans leur partie C-terminale, appelée « SOCS box ». Huit protéines CIS et SOCS-1 à -7 ont un domaine SH2 central. Les autres protéines possèdent des domaines spécifiques qui conditionnent leur nomenclature : les protéines qui contiennent une répétition de WD-40 sont appelées WSB (WSB1 et WSB2), les protéines qui contiennent une répétition du motif ankyrin sont appelées ASB (ASB1-ASB3), les protéines qui possèdent le motif SPRY sont appelées SSB (SSB1-SSB3), enfin, une sous-famille contenant un domaine GTPase est identifiée sous l'abréviation RAR et RAR-like, mais leur véritable fonction est encore inconnue (Hilton *et al.* 1998).

Représentées sur la **figure 28**, CIS, SOCS-1, SOCS-2 et SOCS-3 ont une région N-terminale relativement courte de 50 à 75 acides aminés et de séquences différentes. Par contre, les SOCS-4, -5, -6, -7 peuvent comporter des régions N-terminales de plusieurs centaines d'acides aminés (Hilton *et al.* 1998, Krebs et Hilton 2000, Chen *et al.* 2000, Yasukawa *et al.* 2000), apparemment sans motif particulier hormis SOCS-7 qui comporterait une possible séquence NLS « Nuclear Localization Signal » riche en proline (Matuoka *et al.* 1997).

En dépit de résultats contradictoires quant à la réelle fonction de la boîte SOCS, les différents auteurs s'entendent sur le fait qu'elle interviendrait dans la stabilisation des protéines SOCS. En effet, la délétion de la boîte SOCS provoque une diminution du taux d'expression de SOCS-1 dans les cellules M1 (Narazaki *et al.* 1998). Elle apparaît comme un médiateur des interactions avec les elongins B et C qui pourraient conduire les protéines vers leur dégradation *via* le protéasome (Kamura *et al.* 1998, Zhang *et al.* 1999).

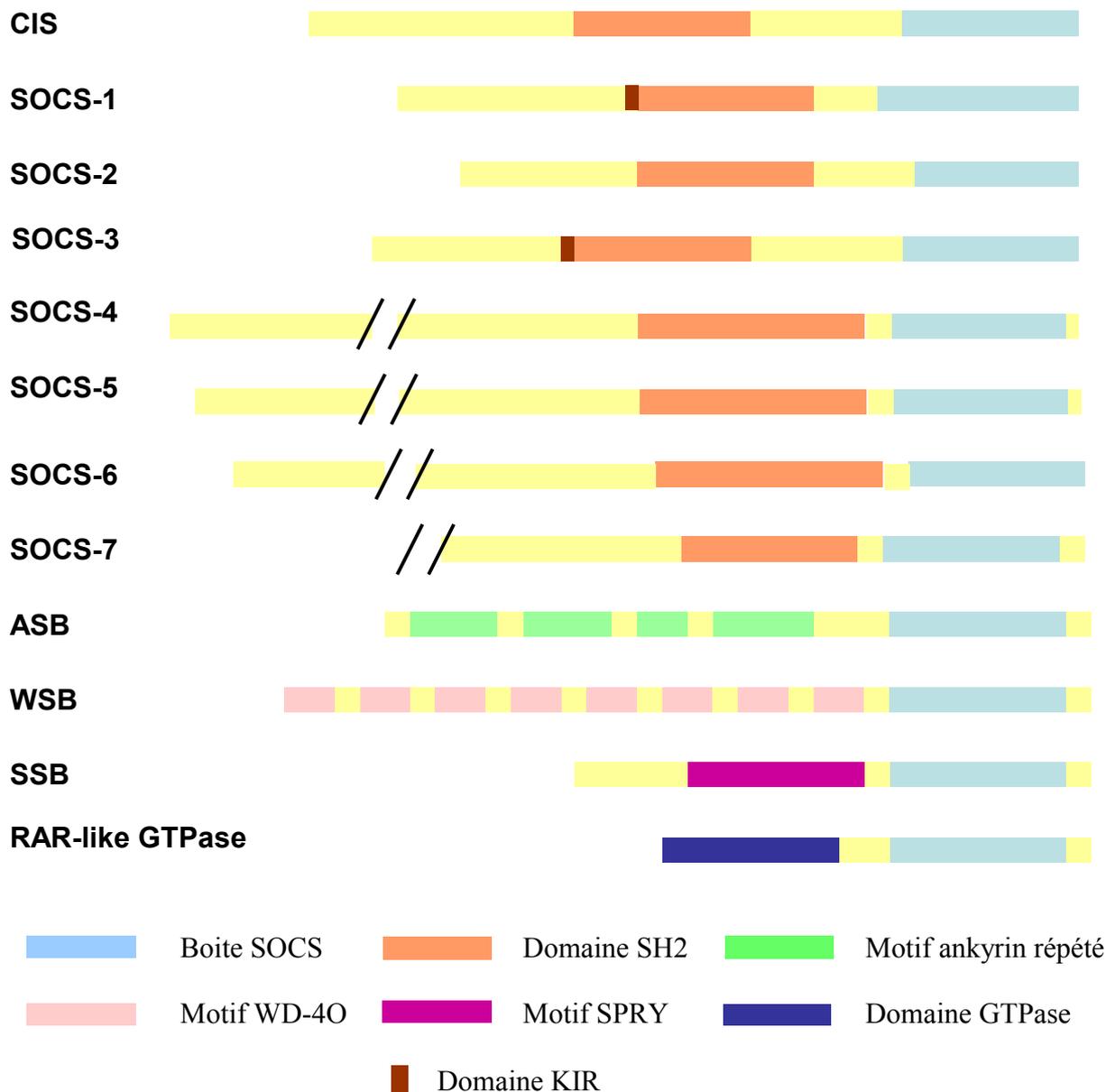


Figure 28 : Famille des protéines SOCS. Le motif qui correspond à la boite SOCS est commun à tous les groupes de protéines dans leur partie C-terminale. Les protéines impliquées dans l'inhibition du signal induit par les cytokines, CIS et SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3 ainsi que les protéines SOCS-4 et SOCS-7 contiennent un domaine SH2. Une séquence de 12 acides aminés appelée KIR (« Kinase Inhibitory Region ») est présente à la fois sur SOCS-1 et SOCS-3. Les autres sous-groupes contiennent chacun un motif spécifique, ankyrin, SPRY, WD-40 ou GTPase like domain (d'après Cooney 2002).

6.2 - Mécanisme d'action

Les protéines SOCS inhibent par différents mécanismes la transduction du signal induite par les cytokines. De récentes études ont montré que SOCS-1, grâce à son domaine

SH2, interagit directement avec le domaine kinase (JH1), des JAK (JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2) et inhibe ainsi leur activité catalytique (Naka *et al.* 1997, Endo *et al.* 1997, Nicholson *et al.* 1999, Yasukawa *et al.* 1999) (**Figure 29**).

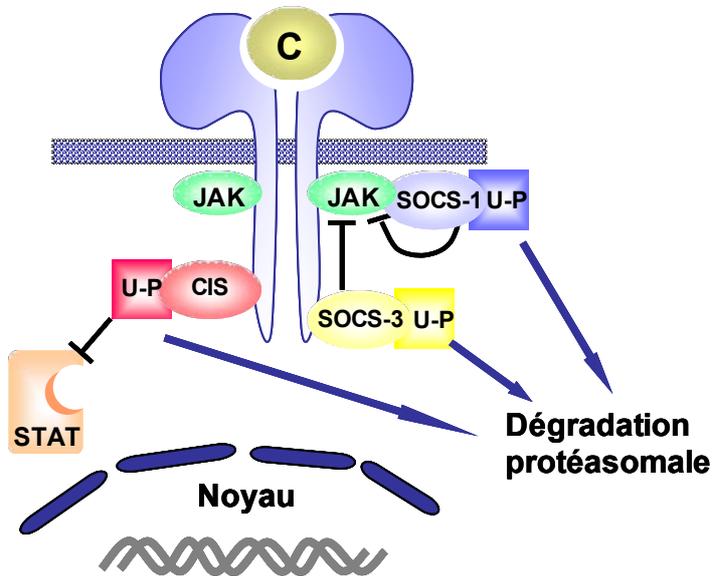


Figure 29 : Mécanisme d'action des protéines SOCS, CIS. Les protéines SOCS, CIS inhibent le signal induit par la cytokine soit en se fixant sur les JAK pour inhiber leur activité catalytique, soit en se liant directement aux tyrosines du récepteur, bloquant ainsi le recrutement et l'activation des STAT. Les SOCS interagissent aussi avec le complexe ubiquitine-protéasome (U-P) qui conduit les protéines activées vers la dégradation. La dégradation des SOCS permet à la cellule de retrouver son état initial de cellule inductible par les cytokines (d'après Alexander 2002).

D'une manière plus précise, SOCS-1 se fixe sur le résidu tyrosine Y₁₀₀₇ de JAK2 qui doit être phosphorylé pour entraîner l'activité tyrosine kinase (Yasukawa *et al.* 1999). Des études structure / fonction impliquant des formes tronquées de SOCS-1 ont mis en évidence le mécanisme par lequel SOCS-1 inhibe l'activité tyrosine kinase des JAK. L'interaction de haute affinité entre SOCS-1 et les JAK nécessite la présence de 30 acides aminés qui suivent le domaine SH2 dans la partie N-terminale de la protéine. Parmi ces 30 acides aminés une séquence de 12, appelée KIR « Kinase Inhibitory Region », commune à SOCS-1 et SOCS-3, présente une forte homologie avec une séquence du substrat interagissant dans la boucle d'activation des JAK. Yasukawa *et al.* (1999) ont dès lors émis l'idée que la région KIR pourrait inhiber l'activité JAK en agissant comme un pseudosubstrat qui pourrait empêcher l'accès du substrat légitime dans la boucle d'activation.

La protéine CIS inhibe la signalisation induite par les cytokines par un autre mécanisme utilisant son domaine SH2 pour se lier à des tyrosines phosphorylées, PTB « PhosphoTyrosine Binding », sur le récepteur activé des cytokines (**Figure 29**). Dans ce cas, le mécanisme d'action est basé sur une compétition avec les STAT (Ram et Waxman 2000). En effet, CIS inhibe l'activation de STAT5b induit par la GH. Or, on sait que CIS et STAT5b se fixent sur le même ensemble de résidus phosphotyrosine du récepteur (Hansen *et al.* 1999,

Ram et Waxman 2000). De plus, l'action inhibitrice de CIS est d'autant plus importante que le taux de STAT5b est diminué, ce qui suggère que CIS et STAT5b entrent en compétition pour se fixer sur les sites de liaison du GHR (Matsumoto *et al.* 1999, Ram et Waxman 2000). SOCS-2 qui ne possède pas de domaine KIR agirait probablement d'une manière identique (Krebs et Hilton 2001). Ainsi, CIS et SOCS-2 pourraient inhiber la signalisation induite par GH en bloquant l'accès des STAT5b sur le récepteur activé. De la même façon, CIS inhibe la signalisation induite par l'EPO en se fixant sur le résidu Y₄₀₁ de son récepteur qui représente l'un des deux sites de liaison spécifiques de STAT5 sur ce récepteur (Verdier *et al.* 1998).

Le mécanisme par lequel SOCS-3 inhibe l'action des cytokines semble être intermédiaire entre celui de SOCS-1 et celui de CIS. Bien que SOCS-3 soit considérée comme un inhibiteur partiel de JAK2, sa capacité à inhiber l'activation de JAK2 induite par la GH augmente significativement lorsque le taux d'expression du GHR est augmenté (Hansen *et al.* 1999). Ainsi, l'action inhibitrice de SOCS-3 semble être liée à sa liaison au récepteur des cytokines et à la présence, comme pour SOCS-1, d'une région KIR (**Figure 29**). D'une manière intéressante, une protéine chimérique construite avec le domaine N-terminal de CIS, le domaine SH2 de SOCS-3 et la boîte SOCS n'inhibe pas les signaux induits par la GH suggérant que le domaine N-terminal de SOCS-3 est indispensable à son action (Hansen *et al.* 1999). Récemment, Nicholson *et al.* (2000) ont essayé d'élucider le mécanisme de SOCS-3 en identifiant les sites de liaison impliqués dans son interaction avec la sous-unité gp130 des récepteurs activés par le LIF et l'IL-6, et d'autres phosphopeptides issus soit de JAK soit de STAT. Ces auteurs ont conclu que SOCS-3 et le phosphopeptide SHP-2 « SH2 domain containing protein Phosphatase 2 » ont le même site de liaison qui se situe près du résidu Y₇₅₇ de la sous-unité gp130. La mutation du résidu Y₇₅₇ en phenylalanine entraîne en effet une forte inhibition de l'activité inhibitrice de SOCS-3 mais pas de SOCS-1 (Nicholson *et al.* 2000, Schmitz *et al.* 2000). La signalisation induite par les cytokines de type IL-6 fait intervenir la protéine SHP-2 et la voie des Ras-MAPK. SOCS-3 entre en compétition avec SHP-2 pour se lier sur le gp130, ce qui suggère que SOCS-3 peut inhiber la voie des Ras-MAPK au même titre que la voie JAK/STAT (Ohtani *et al.* 2000). Pourtant Cacalano *et al.* (2001) montrent que SOCS-3 est tyrosine-phosphorylée (Y₂₀₄ et Y₂₂₁) en réponse à de nombreux facteurs de croissance dont la GH. La phosphorylation du résidu Y₂₂₁ interagit avec le p120 Ras-GAP et maintient l'activité Ras. Après une stimulation par IL-2, SOCS-3 phosphorylée inhibe en effet fortement l'activation de STAT5 mais sa liaison au Ras-GAP maintient l'activation de ERK et la prolifération cellulaire. Ainsi, bien que SOCS-3 inhibe la

réponse induite par les cytokines, sa forme tyrosine-phosphorylée assurerait la survie et la prolifération cellulaire par l'activation de la voie Ras-MAP kinase (Cacalano *et al.* 2001).

Un troisième mécanisme permet aux SOCS d'induire la dégradation des protéines générées par la signalisation. Zhang *et al.* 1999 suggèrent que la boîte SOCS puisse agir comme un adaptateur, capable de recruter des protéines activées du protéasome (**Figure 30**). Toutes les SOCS testées s'associent, par l'intermédiaire de leur boîte SOCS, avec un complexe formé par les elongins B et C. Ces elongins s'associent ensuite à la cullin-2 pour former une partie du complexe E3 ubiquitine ligase dont le rôle essentiel est d'ubiquitiner et de cibler les protéines vers la dégradation (Zhang *et al.* 1999, Kamura *et al.* 1998). Il a d'ailleurs été démontré qu'en présence d'inhibiteurs du protéasome l'activation de JAK/STAT est prolongée (Yu et Burakof 1997, Verdier *et al.* 1998).

Ainsi, les SOCS combinent une action spécifique, inhibitrice, directe sur les différentes composantes de la cascade de signalisation, avec une action qui relève d'un mécanisme général ciblant ces composantes vers une dégradation *via* le système ubiquitine-protéasome (Alexander 2002).

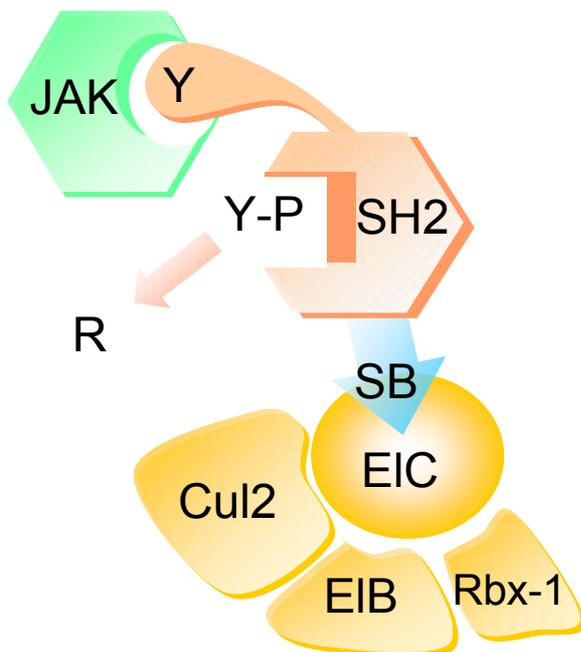


Figure 30 : Domaines fonctionnels des protéines SOCS. Le domaine SH2 se fixe sur une tyrosine phosphorylée de JAK ou du récepteur (R) et conditionne ainsi le domaine N-terminal à interagir et inhiber l'activité JAK kinase. La boîte SOCS (SB) se fixe sur une elongin C (EIC) et mobilise un complexe E3 ubiquitine ligase formé entre autre par la culine 2 (Cul2), l'elongin B (EIB) et une protéine adaptatrice « Ring box protein-1 » (Rbx-1), pour cibler les protéines liées vers une dégradation protéolytique.

6.3 – Profil d'expression des SOCS

L'expression de SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3 et CIS est détectée à des taux faibles dans de nombreuses cellules et tissus. Une augmentation de l'expression des SOCS est observée lorsque les cellules sont soumises à l'induction de toute une série de cytokines et de facteurs

de croissance comme les IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, l'interféron γ (IFN γ), l'EPO, le LIF, la prolactine et la GH, mais le profil d'expression dépend du stimulus et du tissu ou des cellules considérés (Starr *et al.* 1997, Tollet-Egnell *et al.* 1999, Chen *et al.* 2000, Krebs et Hilton 2000, Yasukawa *et al.* 2000). Par exemple, une injection d'IL-6 à des souris provoque une augmentation globale de l'expression des SOCS et CIS dans le foie, SOCS-1 et SOCS-3 étant détectables 20 minutes après l'injection. Cependant, le retour au taux de base intervient 4 heures après l'injection pour SOCS-1, 8 heures après pour SOCS-2 et il n'intervient qu'au bout de 24 heures pour CIS (Starr *et al.* 1997). L'administration de GH à des souris a des effets bien différents puisqu'elle induit en priorité l'activation de SOCS-3 et CIS dans le foie tandis que SOCS-2 et CIS sont préférentiellement activés dans la glande mammaire (Adams *et al.* 1997, Davey *et al.* 1999). L'administration de GH provoque également une augmentation de l'expression des SOCS/CIS dans divers tissus : le poumon, la rate, le rein, le muscle, l'intestin et le cœur (Tollet-Egnell *et al.* 1999). SOCS-3 est impliquée dans le développement de l'obésité due à une résistance à la leptine (Bjorback *et al.* 1999, Wang *et al.* 2000). La leptine est considérée comme une cytokine qui déclenche l'activation du complexe JAK/STAT par sa liaison à son récepteur. L'administration de leptine à des souris génétiquement obèses, par déficit en leptine, double la quantité d'ARNm codant pour SOCS-3 dans l'hypothalamus (Emilsson *et al.* 1999).

In vitro, l'activation d'une protéine SOCS particulière dépend non seulement du signal quelle reçoit mais de la lignée cellulaire stimulée. En effet, l'IFN γ induit l'expression de SOCS-1 et -3 dans les cellules NIH-3T3, et uniquement SOCS-1 dans les cellules M1. Des doses supra-physiologiques de GH provoquent une rapide augmentation de l'expression de SOCS-2, SOCS-3 et CIS dans des cultures primaires d'hépatocytes de rat. Après avoir atteint son taux maximal à 2 heures, SOCS-3 retrouve rapidement son taux de base alors que l'induction de SOCS-2 est plus lente mais prolongée et l'expression de CIS peut présenter un autre pic après un retour à un taux d'expression proche du taux de base (Adams *et al.* 1997, Tollet-Egnell *et al.* 1999). Les effets des protéines SOCS sur la réponse à l'administration de GH ont également été étudiés sur les cellules CHO (« Chinese Hamster Ovary ») transfectées avec le promoteur Spi 2.1 « Serine Protease Inhibitor 2.1 » inductible par la GH couplé au gène « reporter » de l'enzyme CAT « Chloramphenicol Acetyl Transferase ». La cotransfection avec CIS n'a pas d'effet tandis que SOCS-1 et SOCS-3 bloquent la transactivation de Spi 2.1. A l'opposé, la cotransfection de SOCS-2 augmente la réponse de Spi 2.1 à la stimulation par la GH. Ces études suggèrent un rôle important des SOCS dans la régulation de l'expression de Spi 2.1 en réponse à l'induction GH (Adams *et al.* 1997).

Malgré ces modèles de surexpression, il n'est donc pas simple d'établir une corrélation entre cytokine stimulatrice et SOCS induite, et encore plus difficile d'en tirer des conclusions quant à leur vrai rôle physiologique. Les récentes générations de souris transgéniques et « knockout » commencent à clarifier la situation.

6.4 - Contribution des modèles animaux (Tableau 3)

Gene	Phenotype des souris « knockout »	Phenotype des souris transgéniques qui surexpriment le gène
SOCS-1	- Mortalité néonatale - Lymphopénie, apoptose dans les organes lymphoïdes, activation anormale des lymphocytes T. - Réponse dérégulée à l'IFN γ .	- Suppression de la maturation des cellules T.
SOCS-2	- Gigantisme avec les signes évidents d'une dérégulation des signaux induits par GH et IGF-I.	- ND
SOCS-3	- Mortalité embryonnaire due à un déficit du développement placentaire. - Erythrocytose de l'embryon.	- Suppression de l'érythropoïèse. - Mort de l'embryon par anémie.
CIS	- Peu de modifications	- Poids légèrement réduit. - Développement incomplet de la glande mammaire, pas de lactation. - Taux des lymphocytes T diminué ; - Sensibilité à l'Il-2 diminuée.

Tableau 3 : résumé des effets de la délétion ou de la surexpression des gènes des différentes SOCS-1, -2, -3 et CIS dans les souris transgéniques.

Les souris « knockout » SOCS-1^{-/-} ne sont pas différentes des souris « wild-type » à la naissance, pourtant dès l'âge de 10 jours, elles sont beaucoup plus petites et meurent à 3 semaines (Starr *et al.* 1998). L'examen histologique révèle que leur thymus est fortement réduit en taille avec une zone corticale qui s'amenuise avec le temps. Les lymphocytes de la moelle osseuse sont moins nombreux avec une disparition sélective des pre-lymphocytes B et des lymphocytes B matures et bien que leur rate ne présente pas un poids significativement différent, l'examen histologique ne montre que de rares follicules lymphoïdes constitués uniquement de lymphocytes immatures. Ces observations confirment que ces souris souffrent

d'une lymphopénie sévère. Leur état pathologique serait dû à la surexpression de l'IFN γ par les lymphocytes T anormalement activés. En effet, Alexander *et al.* (1999) après avoir injecté quotidiennement des souris « wild type » avec de l'IFN γ comparent les effets produits à ceux observés chez les souris SOCS-1^{-/-}. Ils montrent que leur phénotype est identique et qu'elles présentent comme les souris SOCS-1^{-/-} une augmentation du taux de STAT1. Un traitement avec un anti-IFN γ est alors entrepris par les mêmes auteurs pour définir le rôle de l'IFN γ dans la pathologie des souris SOCS-1^{-/-}. Si la mortalité néonatale disparaît complètement, de nombreuses modifications histologiques subsistent. Par contre, les souris SOCS-1^{-/-} IFN γ ^{-/-} vivent en bonne santé, fertiles, malgré quelques légères anomalies histologiques. L'analyse de ces souris SOCS-1^{-/-} suggère que SOCS-1 joue un rôle essentiel dans la régulation négative des signaux induits par l'IFN γ et qu'elle pourrait également réguler la différenciation des cellules T.

Récemment, Metcalf *et al.* (2000), ont créé un modèle de souris « knockout » SOCS-2^{-/-} pour mieux comprendre la fonction de SOCS-2 *in vivo*. Bien que leur croissance paraisse normale jusqu'à 3 semaines, elle s'accélère pour donner des souris SOCS-2^{-/-} adultes, 30 à 40% plus grosses que les témoins « wild type ». L'hypothèse selon laquelle SOCS-2 régulerait négativement les signaux induits par les facteurs de croissance comme GH ou IGF-I découle de toute évidence. Les souris « knockout » SOCS-2^{-/-}, comme les souris transgéniques qui surexpriment GH ou IGF-I, présentent une augmentation en poids de tous leurs organes vitaux, une augmentation en poids et en longueur des os, et une synthèse élevée de collagène en particulier au niveau du derme (Metcalf *et al.* 2000). SOCS-2 apparaît donc comme un important régulateur de la croissance par sa capacité à moduler les signaux induits par GH ou IGF-I. Pourtant, tout récemment, par des études *in vitro*, Greenhalgh *et al.* (2002), montrent que des doses physiologiques de SOCS-2 régulent bien négativement le signal induit par la GH, mais à de fortes concentrations, SOCS-2 peut, au contraire potentialiser ce signal. Leur étude est poursuivie par la production de souris transgéniques qui surexpriment le gène de SOCS-2 ; elles ne sont pas déficientes en GH et sont significativement plus grosses que les témoins « wild-type », confirmant la dualité de l'effet de SOCS-2 *in vivo*. Ils précisent de plus, que SOCS-2 interagit avec le résidu tyrosine Y₅₈₅ du hGHR.

La fonction biologique de SOCS-3 a également été étudiée par Marine *et al.* (1999) à la fois sur des souris « knockout » et sur des souris transgéniques qui surexpriment SOCS-3. Ces deux types de souris meurent *in utero* et les auteurs soulignent que 75% des embryons qui contiennent le transgène SOCS-3 ne présentent pas d'érythropoïèse dans le foie alors que les

embryons SOCS-3^{-/-} montrent une érythrocytose importante dans tout l'organisme. Etant donné que l'EPO est indispensable à l'érythropoïèse, il est fortement probable qu'elle soit la cytokine-cible de SOCS-3. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Sasaki *et al.* (2000).

Contrairement aux délétions précédentes, la délétion de CIS n'est pas létale et ne provoque que des changements mineurs de morphotype (Matsumoto *et al.* 1999). Résultat surprenant si l'on considère que CIS inhibe l'activation de STAT5 qui est sous le contrôle de l'EPO et l'Il-3. De plus, des études récentes ont montré une rapide induction de CIS en réponse à une stimulation par la GH (Adams *et al.* 1997, Tollet-Egnell *et al.* 1999, Davey *et al.* 1999). Une stimulation par la GH provoque une activation de STAT5 dans le foie et la transcription de plusieurs gènes dont la famille des gènes du cytochrome P450 et de l'IGF-I. Le taux de STAT5 phosphorylé est fortement diminué dans le foie des souris transgéniques et leur morphotype ressemble à celui des souris STAT5a^{-/-} avec en particulier un développement de la glande mammaire incomplet (Liu *et al.* 1997). L'action de CIS serait elle redondante ou bien son déficit pourrait-il être compensé par l'activation d'autres protéines SOCS ? L'utilisation de souris transgéniques dont les gènes SOCS sont délétés, non plus seuls mais en combinaison ou spécifiquement dans des organes-cibles, contribuera à résoudre cette question (Nicola et Greenhalgh 2000).

La GH est donc une cytokine à part entière, sa synthèse ectopique associée à la présence de son récepteur lui confère un rôle nouveau qui probablement s'ajoute à sa fonction endocrine classique et qui sous-tend des mécanismes d'action et de régulation encore inconnus. Les travaux de recherche actuels s'orientent vers une meilleure connaissance des facteurs de croissance dont la production locale implique un mode d'action de type paracrine / autocrine, dans le but de mieux cerner leur participation dans la différenciation et /ou la prolifération cellulaire liées au développement ou à des situations pathologiques. C'est dans ce contexte que nous avons étudié un de ces facteurs, la GH.

III - OBJECTIFS

Le concept dans lequel s'inscrit la GH a donc considérablement évolué. A ses fonctions d'hormone classique qui agit par l'intermédiaire de la synthèse d'IGF-I, s'ajoutent depuis quelques années déjà une action directe sur ses organes-cibles *via* son récepteur membranaire présent sur la quasi totalité des tissus de l'organisme et plus récemment un rôle de cytokine lié à sa synthèse extra-hypophysaire. C'est à son rôle de cytokine que nous nous sommes plus particulièrement intéressés dans ce travail et nos objectifs se déclinent en 5 points principaux :

- localiser et identifier *in situ* les cellules responsables de l'expression de la GH extra-hypophysaire dans les organes hématopoïétiques du rat adulte et du fœtus de rat de 18 jours ; situation où la croissance est indépendante de la GH hypophysaire qu'elle soit fœtale ou maternelle ;
- rechercher cette expression ectopique dans les phénomènes pathologiques de prolifération cellulaire qui correspondent à l'évolution du carcinome canalaire mammaire humain, du stade *in situ* au stade infiltrant avec ou sans métastases ganglionnaires et essayer de corrélérer sa présence cellulaire au grade de la tumeur et à son pouvoir métastatique ;
- aborder le mécanisme d'action de la GH par l'intermédiaire de son trafic intra-cellulaire dans un modèle cellulaire ; les cellules CHO transfectées avec l'ADNc des formes entières ou mutées du récepteur de la GH ;
- évaluer l'expression des différentes protéines SOCS *in situ* dans le carcinome mammaire humain et *in vitro* dans différentes lignées cellulaires issues de carcinomes mammaires pour identifier un système de régulation des cytokines qu'emprunterait spécifiquement la GH ;
- essayer de corrélérer l'induction des différentes protéines SOCS à l'expression de GH dans un modèle cellulaire, les cellules MCF-7 transfectées avec le gène de la GH (GH autocrine) ou en réponse à une stimulation des cellules MCF-7 type sauvage par la GH (GH exogène).

IV - RESULTATS

ARTICLE 1

Dans un premier temps, il nous a paru nécessaire de localiser *in situ*, l'expression de la GH extra-hypophysaire dans les organes lymphoïdes du rat adulte puisque Weigent et Blalock (1991) avait décrit après PCR en phase liquide, une synthèse d'ARNm codant pour la GH extra-hypophysaire sur des échantillons de rate, de thymus et de moelle osseuse de rat. Il était important pour nous d'identifier la ou les populations cellulaires responsables de cette expression. Compte tenu de la faible expression du gène de la GH dans ces conditions, nous avons mis au point la technique de RT-PCR *in situ* (Cf. Annexe, publication N°6) qui permet, avec une grande efficacité, l'amplification d'une séquence donnée, ARN ou ADN, à l'intérieur même de la cellule.

Nous avons pu ainsi montrer dans les organes immunitaires du rat adulte que la synthèse de GH est restreinte aux lymphocytes de la rate, du thymus et de la plaque de Peyer ainsi qu'aux cellules endothéliales et musculaires lisses de leur système vasculaire.

La GH exerce son action principalement au cours de la croissance post-natale (Clark 1997), Cependant, la mise en évidence du GHR dans de nombreux tissus embryonnaires suggère une possible action autocrine de la GH à des stades précoces du développement. Nous avons donc recherché sa synthèse dans les organes immunitaires du fœtus de rat de 18 jours, date à laquelle la croissance fœtale est indépendante de la sécrétion de GH hypophysaire qu'elle soit maternelle ou fœtale. Tous les thymocytes, bien qu'immatures à ce stade de développement, expriment le gène de la GH. Il en est de même pour les cellules hématopoïétiques du foie fœtal qui présentent un marquage intense alors que les hépatocytes restent négatifs malgré l'amplification. La GH synthétisée localement pourrait être impliquée, selon un mécanisme paracrine / autocrine, dans le développement et la différenciation du système immunitaire du fœtus de rat.

ARTICLE 1

The Journal of Histochemistry & Cytochemistry
Volume 49(3): 347-354, 2001

Prenatal And Adult Growth Hormone Gene Expression In Rat Lymphoid Organs

Sophie Recher, Mireille Raccurt, Anne Lambert, Peter E. Lobie, Hichem C. Mertani, and Gérard Morel

SUMMARY Growth hormone (GH) exerts its immune effects on mature lymphocytes through an autocrine/paracrine mechanism. We investigated the prenatal synthesis of GH mRNA in rat lymphoid organs using the sensitive in situ RT-PCR methodology. We show that GH transcripts are detectable in the thymus and liver of the 18-day fetus. At this stage, all thymocytes are immature and express the GH gene. In fetal liver, GH gene expression was localized in circulating lymphocytes and in hematopoietic cells surrounding GH mRNA-negative hepatocytes. In situ GH gene expression in fetal lymphoid organs was confirmed by in vitro RT-PCR showing that the amplified product from fetal lymphoid tissues was similar to the product obtained from the pituitary. Moreover, GH gene expression was detected in the thymus, spleen, and ileum Peyer's patches of adult rat, with a localization restricted to the lymphocytes and endothelial and smooth muscle cells of blood vessels. The autocrine/paracrine expression of the GH gene by lymphoid and hematopoietic cells during fetal growth might influence the generation of regulatory cells involved in immunity and hematopoiesis.

Abstract (free) : <http://www.jhc.org/cgi/content/abstract/49/3/347>

Online Article : <http://www.jhc.org/cgi/content/full/49/3/347>

PDF Version : <http://www.jhc.org/cgi/reprint/49/3/347.pdf>

ARTICLE 2

Après avoir démontré la capacité de certaines cellules à synthétiser la GH dans des phénomènes de prolifération liés au développement et à la croissance, nous avons, dans un deuxième temps, étudié un modèle de prolifération cellulaire pouvant impliquer la production locale de GH. En effet, les investigations récentes qui visent à comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de certains cancers font intervenir les processus autocrine / paracrine plutôt qu'une stimulation de type endocrine. Les pathologies mammaires nous ont donc paru un modèle intéressant puisque :

- la GH est considérée comme une hormone mammothrophique indispensable au développement de la glande mammaire ;
- elles regroupent des pathologies bénignes comme le fibroadénome où une prolifération des cellules fibroblastiques stromales s'ajoute à la prolifération des cellules épithéliales glandulaires ;
- et des pathologies malignes dont la phase *in situ* consiste en une prolifération des cellules tumorales à l'intérieur du canal galactophore alors que la réaction stromale péri-canaulaire se développe avec de nombreux infiltrats inflammatoires. Les formes infiltrantes associent l'invasion des cellules tumorales à une angiogénèse importante et une néosynthèse collagénique.

Ces différentes situations pour lesquelles nous disposons du statut ER « Oestrogen Receptor », PR « Progesterone Receptor » et métastase ganglionnaire, nous ont permis d'identifier les cellules responsables de l'expression du gène de la GH soit par HIS, soit par RT-PCR *in situ* et en phase liquide. La technique ELISA nous a permis de détecter une plus grande concentration de protéine GH dans les cancers *in situ* et invasif que dans la glande mammaire normale.

L'étude des métastases ganglionnaires nous a permis de corréler l'expression de cette GH extra-hypophysaire avec le grade de la tumeur. En effet, nous avons pu mettre en évidence la synthèse de GH par simple hybridation *in situ* dans les ganglions envahis alors que l'amplification de la PCR est indispensable pour révéler la GH dans les ganglions non envahis. Ainsi, l'augmentation de son expression dans les formes métastatiques du cancer mammaire, associée à sa synthèse stromale font de la GH extra-hypophysaire un acteur à considérer dans l'invasion tumorale.

ARTICLE 2

Journal of Endocrinology (2002) **175**, 307-318

High stromal and epithelial human GH gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland

M Raccurt, P E. Lobie, E Moudilou, T Garcia-Caballero, L Frappart, G Morel and H C Mertani

Abstract We have demonstrated and localized human GH (hGH) gene expression in surgical specimens of normal human mammary gland and in proliferative disorders of the mammary gland of increasing severity using sensitive in situ RT-PCR methodology. hGH mRNA identical to pituitary hGH mRNA was first detected by RT-PCR of RNA derived from samples of normal human mammary gland. Cellular localization of hGH gene expression in the normal mammary gland exhibited restriction to luminal epithelial and myoepithelial cells of the ducts and to scattered stromal fibroblasts. We subsequently examined the expression of the hgh gene in three progressive proliferative disorders of the human mammary gland, i.e. A benign lesion (fibroadenoma), a pre-invasive stage (intraductal carcinoma) and an invasive ductal carcinoma. hGH mRNA was readily detected in the tumoral and non-tumoral epithelial components and also in cells of the reactive stroma including fibroblasts, myofibroblastic and myoepithelial cells, inflammatory infiltrate lymphocytes and endothelial cells in areas of neovascularization. In all three proliferative disorders examined, the intensity of the cellular labeling observed in both the epithelial and stromal compartments was always stronger compared with that in adjacent normal tissue. hGH protein was also present in significantly higher concentration in extracts derived from proliferative disorders of the mammary gland compared with extracts derived from normal mammary gland. We also examined hGH gene expression in axillary lymph nodes not containing and containing metastatic mammary carcinoma. hGH gene expression was evidenced in metastatic mammary carcinoma cells and in reactive stromal cells by both in situ hybridization and in situ RT-PCR. In contrast, in lymph nodes not containing metastatic mammary carcinoma, hGH mRNA was detected only by use of in situ RT-PCR. Thus, increased expression of the hGH gene in the epithelial component and the de novo stromal expression in proliferative disorders of the mammary gland are suggestive of a pivotal role for autocrine hGH in neoplastic progression of the mammary gland.

Abstract : <http://journals.endocrinology.org/joe/175/joe1750307.htm>

Online Article (PDF Version) : <http://journals.endocrinology.org/joe/175/0307/1750307.pdf>

ARTICLE 3

Le mécanisme d'action de la GH « autocrine » ou « endocrine » dépend à la fois de la signalisation membranaire qu'elle déclenche *via* le GHR et de son internalisation concomitante. Il est évident maintenant que le cheminement intracellulaire de la GH internalisée dans les différents compartiments cellulaires, lysosomes, mitochondries, appareil de Golgi, noyau, régulé par le système protéasome, est d'une importance capitale pour sa réponse biologique. La rapide translocation nucléaire de la GH et de son récepteur ainsi que l'augmentation de la phosphorylation de JAK2 nucléaire après stimulation par la GH ont été démontrées mais le mécanisme impliqué est encore inconnu.

Pour étudier le mécanisme d'action de la GH *via* son trafic intra-cellulaire, nous avons utilisé un modèle cellulaire, les cellules CHO-K1 transfectées d'une manière stable avec le GHR et par des approches complémentaires, nous avons déterminé le rôle de l'activité tyrosine kinase et de la dimérisation du récepteur dans les phénomènes d'internalisation et de translocation nucléaire de la GH. L'inhibition de l'activité tyrosine kinase de JAK2 par des inhibiteurs connus comme la staurosporine et l'herbimycin A n'affecte pas la capacité d'internalisation de la GH mais augmente son accumulation nucléaire. D'une manière similaire, les mutations du GHR qui empêchent l'association et l'activation de JAK2 : délétion de la boîte 1 (Δ 297-311) et substitution des résidus proline 300, 301, 303, 305 de la boîte 1 en alanine, n'inhibent pas l'internalisation de la GH et favorisent son accumulation nucléaire. Ces résultats sont obtenus à la fois par microscopie confocale quantitative et par fractionnement biochimique.

Ainsi, nous avons démontré d'une part que la phosphorylation des résidus tyrosine n'est pas indispensable à l'internalisation de la GH, mais fondamentale pour son transfert hors du noyau et d'autre part que la translocation nucléaire de la GH est dépendante de la dimérisation du GHR. La GH utiliserait donc un mécanisme d'internalisation et de translocation nucléaire différent de celui des autres ligands peptidiques comme l'EGF ou la prolactine, qui pourrait expliquer la spécificité d'action de l'hormone.

ARTICLE 3

Endocrinology (2003) Vol. 144, No. 7: 3182-3195

Nuclear translocation and retention of growth hormone

Hichem C. Mertani, Mireille Raccurt, Aude Abbate, Jenny Kindblom, Jan Törnell, Nils Billestrup, Yves Usson, Gérard Morel and Peter E. Lobie

Abstract We have previously demonstrated that GH is subject to rapid receptor-dependent nuclear translocation. Here, we examine the importance of ligand activation of the GH-receptor (GHR)-associated Janus kinase (JAK) 2 and receptor dimerization for hormone internalization and nuclear translocation by use of cells stably transfected with cDNA for the GHR. Staurosporine and herbimycin A treatment of cells did not affect the ability of GH to internalize but resulted in increased nuclear accumulation of hormone. Similarly, receptor mutations, which prevent the association and activation of JAK2, did not affect the ability of the hormone to internalize or translocate to the nucleus but resulted in increased nuclear accumulation of GH. These results were observed both by nuclear isolation and confocal laser scanning microscopy. Staurosporine treatment of cells in which human GH (hGH) was targeted to the cytoplasm (removal of secretion sequence) or to the nucleus (addition of the nuclear localization sequence of SV40 large T antigen) resulted in preferential accumulation of hGH in the nucleus. We further investigated the requirement of receptor dimerization for GH nuclear translocation using the non-receptor-dimerizing hGH antagonist, hGH-G120R, conjugated to fluorescein isothiocyanate. Confocal laser scanning microscopy demonstrated efficient internalization of both hGH and hGH-G120R but lack of nuclear translocation of hGH-G120R. Thus, we conclude that activation of JAK2 kinase and the subsequent tyrosine phosphorylation is not required for nuclear translocation of GH but is pivotal for the removal of the hormone from the nucleus, and that GH translocates into the nucleus in a GHR dimerized-dependent fashion.

Abstract (free) : <http://endo.endojournals.org/cgi/content/abstract/144/7/3182>

Online Article : <http://endo.endojournals.org/cgi/content/full/144/7/3182>

PDF Version : <http://endo.endojournals.org/cgi/reprint/144/7/3182.pdf>

ARTICLE 4

De récentes études ont montré l'importance de la production autocrine de GH dans la prolifération *in vitro* des cellules tumorales mammaires et nos résultats mettent en évidence *in vivo* une synthèse locale de GH par différents types cellulaires impliqués dans le développement du cancer mammaire. Cette GH autocrine est considérée comme une cytokine au même titre que les cytokines impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte face à l'agression tumorale. Les mécanismes qui régulent la voie de signalisation JAK/STAT par la GH n'est pas claire. Les protéines SOCS et CIS ont été identifiées comme des molécules qui régulent négativement le signal induit par les cytokines. Nous avons donc, dans un premier temps, rechercher l'expression génique de SOCS-1, -2, -3 et CIS dans différents cancers mammaires sélectionnés selon les critères de sévérité pour les comparer à celles obtenues à partir de tissus normaux. L'immunohistochimie et l'hybridation *in situ* semi-quantitative révèlent des niveaux élevés d'expression des différents gènes SOCS dans les zones de prolifération tumorale par rapport à ceux observés dans le tissu sain à distance de la tumeur. Les cellules tumorales, les cellules stromales : fibroblastes, myofibroblastes, aussi bien que les cellules inflammatoires sont identifiées par hybridation *in situ* comme responsables de cette expression.

Pour déterminer si cette surexpression fait partie de la réponse de l'hôte ou bien si elle est le reflet d'une altération génique, nous avons recherché l'expression des différentes SOCS dans 10 lignées cellulaires issues de cancers mammaires et deux lignées cellulaires issues de glande mammaire normale. Seule l'expression de CIS a été détectée dans les lignées transformées par rapport aux lignées normales. « L'immunoblotting » des lysats cellulaires révèle une prédominance de l'expression de la forme ubiquitinée de CIS. Pour vérifier le rôle de CIS sur l'activation des MAP kinases (ERK), nous avons transfecté des cellules CHO avec des concentrations croissantes de vecteurs d'expression CIS. L'augmentation de l'activité des MAPK, donnée par l'activité luciférase est très importante (x 50) et proportionnelle aux concentrations de CIS.

L'élévation *in vivo* de l'expression des gènes SOCS dans les cancers mammaires humains correspond donc à la réponse de l'organisme, elle est corrélée à la synthèse autocrine / paracrine de GH. L'élévation de l'expression de CIS apparaît cependant comme le résultat d'une lésion spécifique qui pourrait avoir comme conséquence, (1) d'activer la voie des MAP kinases largement impliquée dans la prolifération cellulaire et (2) d'inactiver STAT5b médiateur de la réponse induite par la GH en temps qu'hormone trophique qui assure le développement et la régulation de la glande mammaire normale.

ARTICLE 4

British Journal of Cancer (2003) **89**, 524-532.

Suppressor of cytokine signalling gene expression is elevated in breast carcinoma

M Raccurt, S P Tam, P Lau, H C Mertani, A Lambert, T Garcia-Caballero, H Li, R J Brown, M A McGuckin, G Morel and M J Waters

Abstract Cytokines are important for breast cell function, both as trophic hormones and as mediators of host defense mechanisms against breast cancer. Recently, inducible feedback suppressors of cytokine signalling (SOCS/JAB/SSI) have been identified, which decrease cell sensitivity to cytokines. We examined the expression of SOCS genes in 17 breast carcinomas and 10 breast cancer lines, in comparison with normal tissue and breast lines. We report elevated expression of SOCS-1-3 and CIS immunoreactive proteins within in situ ductal carcinomas and infiltrating ductal carcinomas relative to normal breast tissue. Significantly increased expression of SOCS-1-3 and CIS transcripts was also shown by quantitative in situ hybridisation within both tumour tissue and reactive stroma. CIS transcript expression was elevated in all 10 cancer lines, but not in control lines. However, there was no consistent elevation of other SOCS transcripts. CIS protein was shown by immunoblot to be present in all cancer lines at increased levels, mainly as the 47 kDa ubiquitinated form. A potential proliferative role for CIS overexpression is supported by reports that CIS activates ERK kinases, and by strong induction in transient reporter assays with an ERK-responsive promoter. The in vivo elevation of SOCS gene expression may be part of the host/tumour response or a response to autocrine/paracrine GH and prolactin. However, increased CIS expression in breast cancer lines appears to be a specific lesion, and could simultaneously shut down STAT 5 signalling by trophic hormones, confer resistance to host cytokines and increase proliferation through ERK kinases.

Abstract : <http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/bjc/journal/v89/n3/abs/6601115a.html&dynoptions=doi1076942168>

Article en préparation

Une augmentation des protéines SOCS est observée en réponse à l'induction de toute une série de cytokines et de facteurs de croissance mais le profil d'expression dépend du stimulus et du tissu ou des cellules considérés. En effet, l'administration de GH à des souris induit en priorité l'activation de SOCS-3 et CIS dans le foie alors que SOCS-2 et CIS sont préférentiellement activées dans la glande mammaire. *In vitro*, l'activité d'une protéine SOCS particulière dépend non seulement du signal qu'elle reçoit mais de la lignée cellulaire stimulée. Nous avons montré que la protéine CIS est surexprimée dans les lignées cellulaires issues de cancers mammaires. Nous avons également démontré une synthèse locale de GH dans les cancers mammaires humains et mis en évidence une corrélation avec l'expression de certaines protéines SOCS

Notre dernier objectif a donc visé l'identification, la localisation cellulaire et le niveau d'expression des différentes protéines SOCS-1, -2, -3 et CIS par microscopie confocale et analyse quantitative dans un modèle cellulaire, les cellules MCF7, transfectées soit avec un vecteur d'expression contenant le gène de la GH (MCF-hGH), soit avec un vecteur d'expression contenant le gène de la GH dont le codon « start » a été inactivé (MCF-MUT). Les protéines SOCS, hormis SOCS-1 ont une localisation nucléaire majoritaire. L'expression de SOCS-3 et surtout celle de CIS est significativement augmentée dans les cellules synthétisant la GH autocrine par rapport aux cellules MCF-MUT. Dans un deuxième temps nous avons mesuré la réponse des cellules MCF-7 de type sauvage, cultivées 12 heures en milieu sans sérum, à une stimulation par la GH. Une rapide activation de CIS est observée dès une minute d'incubation, elle se maintient d'une manière plus abondante dans le compartiment nucléaire jusqu'à 24 heures d'incubation. L'expression des autres SOCS est également augmentée mais à un moindre degré et selon un autre profil avec un retour au taux basal après 24 heures d'incubation.

Nos premiers résultats montrent que les protéines SOCS-3 et CIS sont surexprimées de manière préférentielle, à la fois dans les cellules carcinomateuses mammaires synthétisant la GH et dans les cellules de type sauvage stimulées par la GH exogène, ils seront confirmés par western blotting. Nous avons également montré pour la première fois leur localisation cytoplasmique et nucléaire, suggérant ainsi des mécanismes de régulation encore inconnus.

Growth hormone preferentially induces CIS and SOCS-3 expression in breast cancer cell lines

¹Mireille Raccurt, ¹Hichem C. Mertani, ¹Elara Moudilou, ²Yves Usson, ³Peter E. Lobie and ¹Gérard Morel

1 CNRS UMR 5123 Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, Université Claude Bernard-Lyon-I, France

2 Laboratory DyOGen, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

3 Institute of Molecular and Cell Biology, National University of Singapore, Republic of Singapore

Address for correspondence

Dr Gérard Morel

CNRS UMR 5123

Université Claude Bernard- Lyon 1

43 Blvd 11 novembre 1918

F69622 Villeurbanne cedex, France

E-mail: gerard.morel@univ-lyon1.fr

Tel: +(33) 472 432 927; Fax: +(33) 472 432 927

Key words

Hormones, Cytokines, SOCS1, SOCS2, SOCS3, CIS.

Introduction

The signal transduction from the GH receptor involves a number of intracellular pathways that mediate the cellular response to GH (1). Janus kinase 2 (JAK2) has been identified as the tyrosine kinase responsible for the initiation of GH signal transduction. Its activation results in tyrosine phosphorylation, dimerization and nuclear translocation of at least four members of STAT family: STAT1, 3, 5a et 5b (2-4), that subsequently bind to specific DNA-responsive elements to initiate gene transcription.

Until recently the mechanisms controlling down-regulation of the GH signaling cascade were unknown. However, a family of proteins termed suppressors of cytokine signaling (SOCS), capable of inhibiting cytokine signaling in a classical negative feedback loop, were identified (5-7). To day, eight members of the SOCS family have been described, SOCS 1 to 7 and CIS. They possess a variable N-terminal region preceding an SH2 domain, followed by a conserved C-terminal region of approximately 40 residues known as SOCS box which is thought to regulate proteolysis (8). Studies performed both *in vitro* and *in vivo* have shown that expression of several SOCS genes is induced upon GH stimulation. Indeed, GH induce SOCS-3 to inhibit STAT5-mediated transactivation of the serine protease inhibitor 2.1 promoter by binding to membrane-proximal phosphotyrosine residues of the GH receptor (9-10). When 3T3-F442A fibroblasts are stimulated with GH, a rapid, transient induction of SOCS-1 and SOCS-3 mRNA is seen while a preferential induction of SOCS-3 mRNA is observed in hepatic tissue isolated from mice treated with GH (10). Recently, SOCS-2 knockout mice were found to exhibit a phenotype resembling GH-overexpressing transgenic mice (11). On the other hand, CIS over-expressing transgenic mice exhibit impaired mammary gland development and growth retardation, although CIS knockout mice have no obvious phenotype (?).

We have recently demonstrated a consistent elevation of SOCS transcripts in breast carcinomas and an increased CIS expression in 10 breast cancer cell lines (Raccurt *et al.* 2003 submitted for publication). We have also shown a local synthesis of GH in proliferative disorders of the mammary gland and an increased expression of the GH gene associated with metastatic mammary carcinoma cells (13). As GH appears to be able to induce more than one SOCS gene expression we sought to establish which of these genes might be a target for transcriptional activation by autocrine production of GH in mammary carcinoma cells. Here we show that SOCS3 and CIS are over-expressed in autocrine-hGH producing mammary carcinoma cells as well as in GH-stimulated MCF7 “wild type” cells. Their cytoplasmic and

nuclear localization suggests unknown signaling pathway where they might act as molecular switch inhibiting one pathway while maintaining cell survival.

Materials and methods

Antibodies

Rabbit antibodies raised against a recombinant protein corresponding to amino acids 119-211 mapping within an internal region sequence of human SOCS-1 (cat. no. sc-9021, H-93), to the amino acids 90-162 of human SOCS-2 (cat. no. sc-9022, H-74) and to the amino acids 67-189 of SOCS-3 (cat. no. sc-9021, H-103) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, (Santa Cruz, CA). Goat antibody raised against the terminal sequence of human CIS (cat. no. sc-1529, N-19) came from the same company. Cy3TM conjugated sheep anti-rabbit IgG and Cy3TM conjugated rabbit anti-goat IgG (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) were respectively used for detection.

Growth hormone

Human GH was a generous gift of Novo Nordisk (Singapore) It was prepared as a stock solution of 50 μ M in distilled water and used at a concentration of 25 nM.

Cellular transfection of GH cDNA

The MCF-7 cell line was obtained from ATCC and stably transfected with an expression plasmid containing the hGH gene (pMT-hGH) (14). The MCF-7 cells which were stably transfected with an expression plasmid encoding the hGH gene were designated as MCF-hGH. These cells synthesized hGH in the cell and secreted hGH to the medium (100 pM hGH into 2 ml of media over a 24 h period). For control purposes, the ATG start site in pMT-hGH was disabled (mutated to TTG by standard technique) and this plasmid is designated pMT-MUT (15). The MCF-7 cell line generated with this plasmid are designated MCF-MUT. Their proliferation, transcriptional activation and cell spreading were identical to MCF-7 wild type cells. Non transfected MCF-7 cells were referred as "wild type".

Cell culture

Wild type, MCF-hGH and MCF-MUT cells grown in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine at 37°C in 5% CO₂ until 30-50% confluence.

Immunofluorescence

The three cell types were serum deprived for 12 hours before incubation with 25 nM of hGH for indicated time periods. They were then washed in PBS and subsequently fixed for 20 min in ice-cold 4% paraformaldehyde in PBS at the end of the respective time intervals. The cells were permeabilized in 0.1% TX-100-PBS for 5 min, washed extensively with PBS and incubated for 1 h, with specific rabbit anti-SOCS-1, anti-SOCS-2, anti-SOCS-3 and goat anti-CIS at a dilution of respectively 1/500. Cy3TM conjugated anti-rabbit and anti-goat IgG were diluted to 1/200 for detection. Controls were performed by (a) omission of the primary antibody, (b) replacing the primary antibody with the same protein concentration of preimmune mouse or rabbit serum.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

All images were acquired with a Zeiss LSM 410 confocal microscope equipped with laser sources, three separate detection channels with their own pinhole detector, and a fourth detection channel for DIC (Nomarski) transmitted light scanning microscopy. The fluorescence images of Cy 3 were collected. Cy 3 fluorescence was excited with a 543 nm HeNe laser source. A 560 nm dichroic beam splitter was used to separate laser excitation from emitted fluorescence, an additional 590 nm long-pass filter was used after the pinhole in order to reject non-specific fluorescence. The pinhole aperture was set to one Airy disk unit for each channel. An image of the same field was recorded in DIC transmitted light in order to facilitate the cell contour and nuclear contour delineation in the further image analysis stage. Image averaging (Kalman filtering) was used for the acquisition of the fluorescence images in order to improve the signal-versus-noise ratio

Image Analysis of CLSM images

Ten image diplets (Cy3 - DIC) were recorded per experimental slides. These images were stored on a computer disk and analyzed with a SAMBA 2005 image analysis system (SAMBA Technologies, Meylan, France). Dedicated software was developed for this particular application. Briefly, the DIC image of a triplet was used to interactively extract the contours of the cells and of the cell nuclei. From these contours the program built the binary masks of the cytoplasm and of the nucleus of each cell. Then the Cy 3 image was loaded. For each cell, the fluorescence intensities (arbitrary unit) were measured using the previously obtained binary mask) inside the cytoplasm of each cell and ii) inside the nucleus of each cell. Two parameters were obtained: the integrated fluorescence, that is the sum of intensity values

measured within the mask; and the average fluorescence intensity, that is the integrated fluorescence divided by the area (in pixels) of the binary mask.

Statistics

All data are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed using Student's t test and ANOVA (Statview) where appropriate and set at $P < 0.05$.

Results

Comparative localization of SOCS-1, -2, -3 or CIS in MCF-hGH and MCF-MUT cells

We first examined, expression and localization of the different SOCS/CIS molecules by confocal laser scanning microscopy in MCF-hGH transfected cells compared to MCF-MUT cells. No immunofluorescence was observed if the specific primary antibody was omitted or if the fluorescent anti-species was replaced by a fluorescent anti-mouse epitope. GH receptor is present in MCF-hGH as well as in MCF-MUT cell population (16) and it is essential for autocrine GH response. Except for SOCS-1, immunoreactivity was generally more intense for the three other SOCS-2, -3 and CIS in MCF-hGH cells compared to MCF-MUT cells (Fig. 1). It is also evident that the subcellular localization is specific for each SOCS/CIS protein. SOCS-1 immunoreactivity was detected in a nucleocytoplasmic distribution but with a slight majority of the immunoreactivity confined in the cytoplasm. SOCS-2 was mainly concentrated in the nucleus. SOCS-3 and CIS immunoreactivities were detected in a nucleocytoplasmic distribution without predominant labeling in cytoplasm or nucleus (Fig. 1). To determine the effect of autocrine production of GH on SOCS gene expression, we resorted to the use of quantitative analysis of confocal microscopy and we compared the fluorescence intensity obtained for the four SOCS/CIS proteins in the two cellular compartments, cytoplasm and nucleus of each cell population MCF-hGH and MCF-MUT (Fig. 2). No significant difference could be observed in SOCS-1 immunoreactivity obtained for the two cell types even if we considered the nuclear and cytoplasmic distribution. For SOCS-2, maximal fluorescence intensity was observed in the nucleus, but there was no significant difference between MCF-hGH and MCF-MUT cells. On the contrary, a significant increase of fluorescence intensity was observed for both SOCS-3 and CIS in cytoplasm and nucleus of MCF-hGH, compared to MCF-MUT cells. This increase was limited to 50% and 55% for SOCS-3 fluorescence intensity in cytoplasm and nucleus respectively, but could achieve more than 250% for CIS fluorescence intensity in nucleus.

Kinetics of SOCS-1, -2, -3 and CIS localization in response to GH stimulation in MCF7 “wild type” cells.

We next examined SOCS-1, -2, -3 and CIS localization by confocal laser scanning microscopy and quantitative analysis in “wild type” cell population after stimulation with 25 nM of hGH.

As shown on Figure 3A, cytoplasm and nucleus were immunoreactive for SOCS-1 at all time points of the study. No significant variations of SOCS-1 immunoreactivity could be observed before 1 h of GH exposure. At that time, a significant increase (+34%, $P < 0.05$) of immunoreactivity was apparent in the cytoplasm before a gradual decrease until 24 h after exposure.

In accordance with results on Fig. 1, immunoreactivity for SOCS-2 was mainly localized in the nucleus of “wild type” cells and for all time studied. Signal intensity represented on Fig. 3B showed an increase of 28%, 6 h after GH exposure in the cytoplasm suggesting a synthesis of this protein, while in the nucleus only 1 min of stimulation provided 21% of nuclear translocation of SOCS-2. After peaking at 6 h, SOCS-2 expression dramatically decreases in nucleus until normalization at 24 h.

A rapid and transient increase of fluorescence intensity was observed for SOCS-3 (Fig. 3C) only 1 min after hGH stimulation. Signal intensity peaked at 6 h in the nucleus (173% of basal intensity) and cytoplasm before declining again to basal level.

Whatever time period of hGH exposure, a significant increase of fluorescence intensity was observed for CIS, compared to unstimulated cells (Fig. 3D). As soon as 1 min of stimulation, signal intensity reached 245% and 256% in cytoplasm and nucleus respectively. This intensity level was maintained until 24 h of hGH stimulation. 15 min after GH exposure, CIS immunoreactivity peaked in the nucleus and corresponds probably to a rapid translocation. This predominant nuclear distribution is in agreement with the data observed using MCF-hGH (Fig. 1). The high expression of CIS protein observed at 24 h time point is in favor of a continuous stimulated synthesis.

Discussion

In this *in vitro* study we identified CIS and SOCS-3 proteins as the major regulators induced by autocrine hGH production in human mammary carcinoma cell lines. We also provide the first demonstration of a prominent nuclear localization of SOCS-2, SOCS-3, and CIS, which raises several questions. Various components of the GH signal transduction cascade including GH (16), the GH receptor (17), signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5)

(18) either translocate to the nucleus upon GH stimulation, or are already located in the nucleus as shown for Janus kinases (JAK) 1, 2 (19) and STAT1, 5 (18). Thus, nuclear localization of every components of GH signaling strongly suggest that GH nuclear effects could be very similar to those elicited at the plasma membrane. The nuclear presence of SOCS and CIS as demonstrated in this study strengthens this hypothesis and further work should determine the function and mechanism of nuclear translocation of SOCS/CIS. Nevertheless, what is the role of SOCS3 and CIS activation upon GH stimulation?

The activation of CIS and SOCS-3 proteins has been demonstrated following GH stimulation in 3T3-F442A cells (10) and in rat adipocytes isolated from epididymal and perirenal fat (20). SOCS-3 was also demonstrated to be the principal negative regulator of GH signaling in pancreatic β -cells (21). Both CIS and SOCS-3 proteins are intracellular soluble factors, which inhibit GH signaling by interaction with the activated GH receptor. A very important role has been attributed to SOCS-3 due to its inhibitory action on JAK2 tyrosine kinase activity. On the other hand, CIS inhibitory action has been shown to involve the binding of its SH-2 domains to phosphorylated GH receptor, thereby impeding the recruitment and tyrosine phosphorylation of STAT5 (22). Studies using transgenic mice have revealed the importance of STAT5 during mammary gland development (23). Other studies have shown that DNA binding activity of STAT5 could be impaired following induction of SOCS-3 by GH stimulation (24, 9). In addition, functional STAT5 DNA binding sites are present on the CIS promoter gene (25) and mice with homozygous deletion of STAT5 a/b in the mammary gland have lost CIS expression (26). These observations strongly suggest that STAT5 is a critical target of GH-activated *SOCS-3* and *CIS*. On the other hand, another study has shown that STAT5 mediated transcriptional activity is stimulated by autocrine production of hGH in mammary carcinoma cells (14). Further studies are needed to explain how STAT5 activity and CIS expression could be simultaneously increased by autocrine production of hGH. Recent studies have shown that tyrosine phosphorylation of SOCS-3 on residues 204 and 221 in response to growth factors (*e.g.* IL-2, EPO, EGF, PDGF) would block STAT5 activation (27). Interestingly, phosphorylation of tyrosine residue 221 has been shown to interact with the Ras inhibitor p120RasGap leading to sustained extracellular signal regulated kinase (ERK) activation (27). This clearly indicates that SOCS-3 is not only a suppressor of cytokine-mediated JAK/STAT signaling but it is also a potent activator of the MAP kinase pathway that ensure cell survival and proliferation. Thus SOCS3 activation by autocrine production of hGH could be involved in p38 MAPK/p42/44 MAPK activation and stimulation of mammary carcinoma cells mitogenesis (14). Using an ERK responsive promoter assay, we

have previously shown that chronically elevated CIS is able to elevate ERK activity (Raccurt *et al.* submitted). Other studies have also shown that MAP kinases (ERK, JNK) activation is an important consequence of CIS over expression in CD4 T cells (28), and is thought to be a result of direct association between CIS and PKC theta (29). A growing number of studies clearly implicated CIS and SOCS-3 as important regulator of GH signaling in human mammary carcinoma cells, preliminary results indicate that these proteins act as molecular switches inhibiting the JAK/STAT pathway while maintaining cell survival through the Ras pathway. Further studies are now required to define the molecular mechanisms through which SOCS-3 and CIS contributes to hGH-induced mammary carcinoma cells proliferation.

References

1. Argetsinger LS, Carter-Su C (1996) Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev* 76:1089-1107
2. Smit LS, Meyer DJ, Billestrup N, Norstedt G, Schwartz J, Carter-Su C (1996) The role of the growth hormone (GH) receptor and JAK1 and JAK2 kinases in the activation of Stats 1, 3, and 5 by GH. *Mol Endocrinol* 10:519-533
3. Campbell GS (1997) Growth-hormone signal transduction. *J Pediatr* 131:S42-44
4. Soldaini E, John S, Moro S, Bollenbacher J, Schindler U, Leonard WJ (2000) DNA binding site selection of dimeric and tetrameric Stat5 proteins reveals a large repertoire of divergent tetrameric Stat5a binding sites. *Mol Cell Biol* 20:389-401
5. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. *Nature* 387:917-921
6. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Otsubo M, Misawa H (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387:921-924
7. Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387:924-929
8. Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ, Moritz RL, Cary D, Richardson R, Hausmann G, Kile BJ, Kent SB, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M (1999) The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2071-2076

9. Hansen JA, Lindberg K, Hilton DJ, Nielsen JH, Billestrup N (1999) Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressor of cytokine signaling proteins. *Mol Endocrinol* 13:1832-1843
10. Adams TE, Hansen JA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Billestrup N (1998) Growth hormone preferentially induces the rapid, transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signaling. *J Biol Chem* 273:1285-1287
11. Metcalf D, Greenhalgh CJ, Viney E, Willson TA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS (2000) Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature* 405:1069-1073
12. Raccurt M, Lobie PE, Moudilou E, Garcia-Caballero T, Frappart L, Morel G, Mertani HC (2002) High stromal and epithelial human gh gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland. *J Endocrinol* 175:307-318
13. Kaulsay KK, Mertani HC, Tornell J, Morel G, Lee KO, Lobie PE (1999) Autocrine stimulation of human mammary carcinoma cell proliferation by human growth hormone. *Exp Cell Res* 250:35-50
14. Liu N, Mertani HC, Norstedt G, Tornell J, Lobie PE (1997) Mode of the autocrine/paracrine mechanism of growth hormone action. *Exp Cell Res* 237:196-206
15. Lobie PE, Wood TJ, Sliva D, Billestrup N, Waters MJ, Enberg B, Norstedt G. 1994 The cellular mechanism of growth hormone signal transduction. *Acta Paediatr Suppl* 406:39-46
16. Lobie PE, Wood TJ, Chen CM, Waters MJ, Norstedt G Nuclear translocation and anchorage of the growth hormone receptor. *J Biol Chem*. 1994 269:31735-31746
17. Stout LE, Svensson AM, Sorenson RL (1997) Prolactin regulation of islet-derived INS-1 cells: characteristics and immunocytochemical analysis of STAT5 translocation. *Endocrinology* 138:1592-1603
18. Lobie PE, Ronsin B, Silvennoinen O, Haldosen LA, Norstedt G, Morel G 1996 Constitutive nuclear localization of Janus kinases 1 and 2. *Endocrinology* 137:4037-4045
19. Du L, Frick GP, Tai LR, Yoshimura A, Goodman HM (2003) Interaction of the growth hormone receptor with cytokine-induced SRC homology domain 2 protein in rat adipocytes. *Endocrinology* 144:868-876
20. Ronn SG, Hansen JA, Lindberg K, Karlsen AE, Billestrup N (2002) The effect of suppressor of cytokine signaling 3 on GH signaling in beta-cells. *Mol Endocrinol*. 16:2124-2134
21. Tonko-Geymayer S, Goupille O, Tonko M, Soratroi C, Yoshimura A, Streuli C, Ziemiecki A, Kofler R, Doppler W (2002) Regulation and function of the cytokine-inducible SH-2 domain proteins, CIS and SOCS3, in mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 16:1680-1695
22. Matsumoto A, Seki Y, Kubo M, Ohtsuka S, Suzuki A, Hayashi I, Tsuji K, Nakahata T, Okabe M, Yamada S, Yoshimura A (1999) Suppression of STAT5 functions in liver,

mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* 19:6396-6407

23. Ram PA, Waxman DJ (1999) SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 274:35553-35561
24. Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, Yokouchi M, Ohtsubo M, Misawa H, Miyajima A, Yoshimura A. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood*. 1997 89:3148-3154
25. Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN (1998) Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93:841-850
26. Cacalano NA, Sanden D, Johnston JA (2001) Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras. *Nat Cell Biol* 3:460-465
27. Li S, Chen S, Xu X, Sundstedt A, Paulsson KM, Anderson P, Karlsson S, Sjogren H-O, Wang P (2000) CIS promotes T cell receptor mediated proliferation and prolongs survival of activated T cells. *J Exp Med* 191:985-994
28. Baier-Bitterlich G, Baier G, Fuchs D, Bock G, Hausen A, Utermann G, Pavelka M, Wachter H (1996) Role of 7,8-dihydroneopterin in T-cell apoptosis and HTLV-1 transcription in vitro. *Oncogene* 13:2281-2285

Figure legends

Figure 1 : Confocal laser scanning microscopic detection of SOCS-1, -2, -3 and CIS expression in MCF-hGH and MCF-MUT cells. SOCS-3 and CIS proteins are especially increased in response to autocrine GH production, their nuclear and cytoplasmic localization is evident. Bar: 20 μ m

Figure 2 : Quantitative analysis of SOCS-1, -2 -3 and CIS expression in MCF-hGH and MCF-MUT cells. Immunofluorescence intensity in nuclear and cytoplasmic compartments were quantified as described in materials and methods.

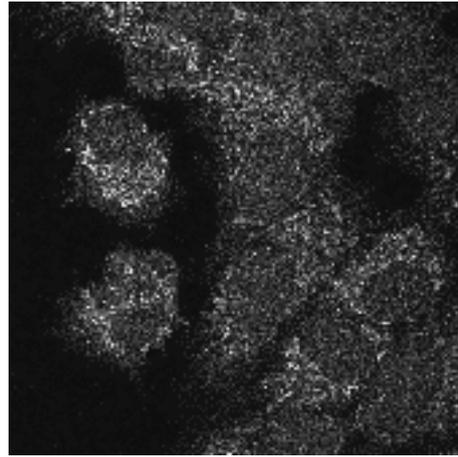
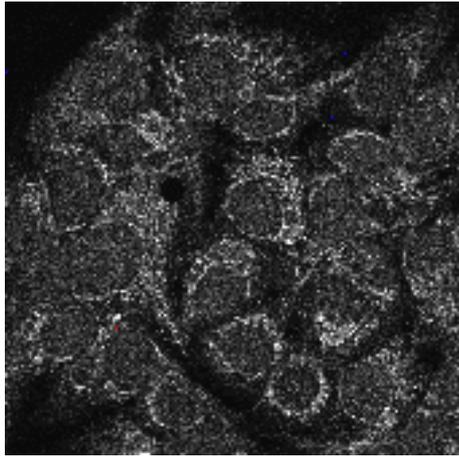
Figure 3 : Confocal laser scanning microscopy and quantitative analysis of SOCS-1, -2 -3 and CIS expression in “wild type” MCF7 cells was performed as described in Materials and Methods at 0, 1 min, 15 min, 1 h, 6 h and 24 h after GH stimulation. The photographs correspond to each time points. Exogenous GH rapidly increases CIS expression which is maintained for 24 h after hGH exposure. Bar:20 μ m

Figure 1

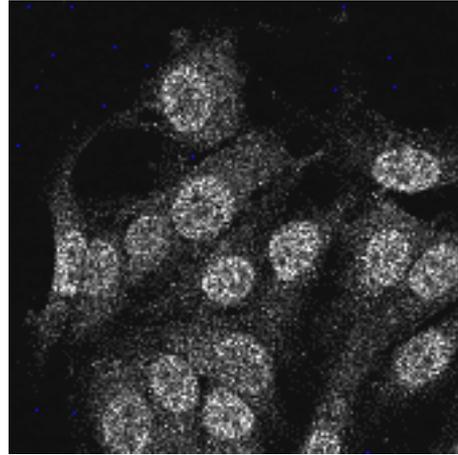
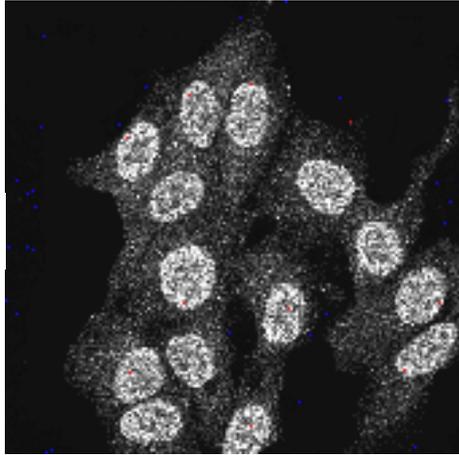
MCF-hGH

MCF7 MUT

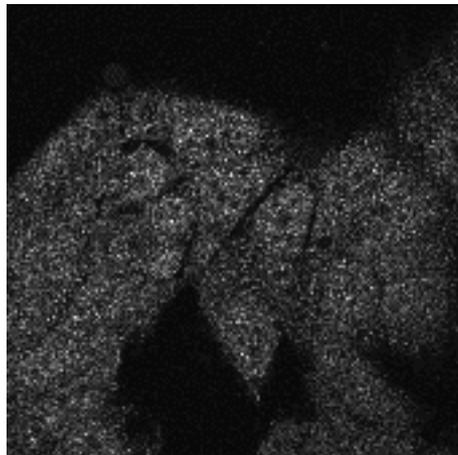
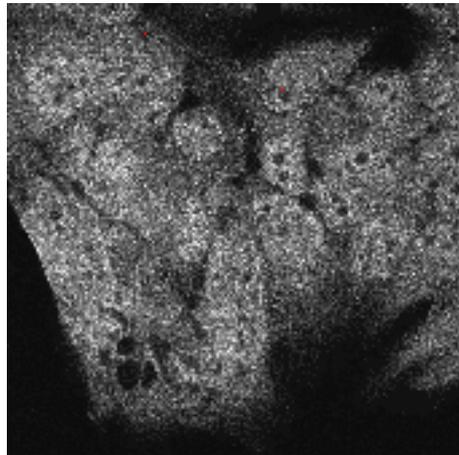
SOCS -1



SOCS -2



SOCS-3



CIS

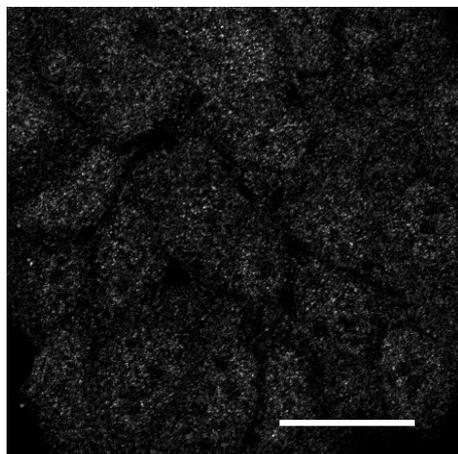
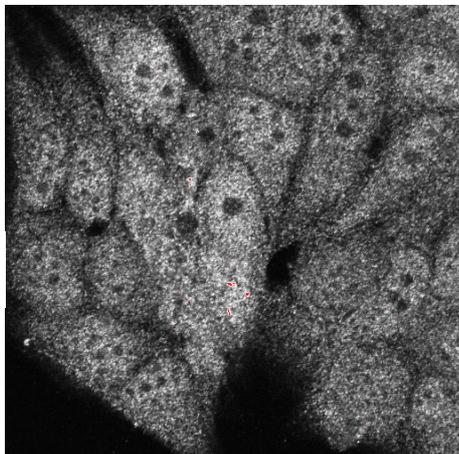
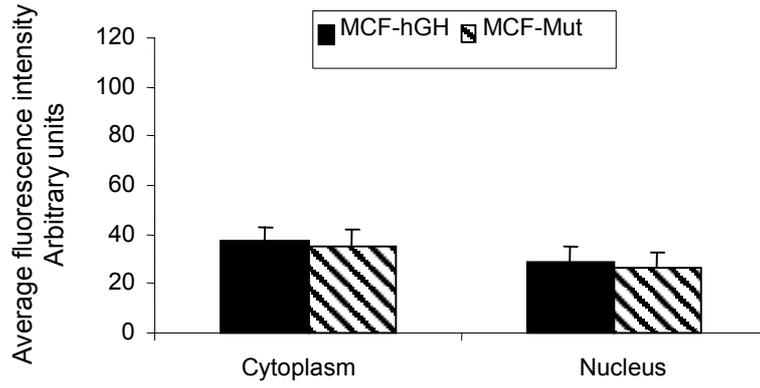
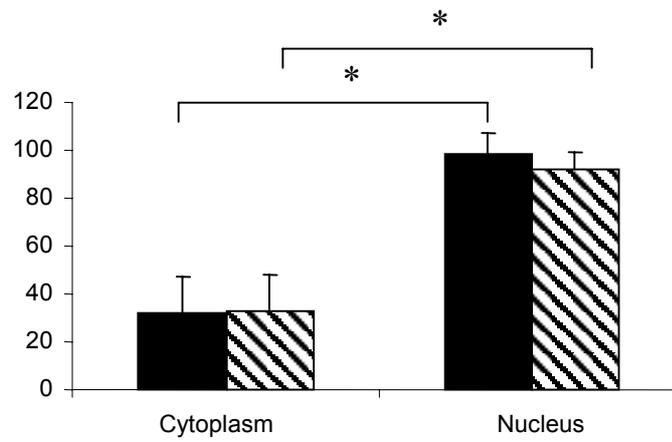


Figure 2

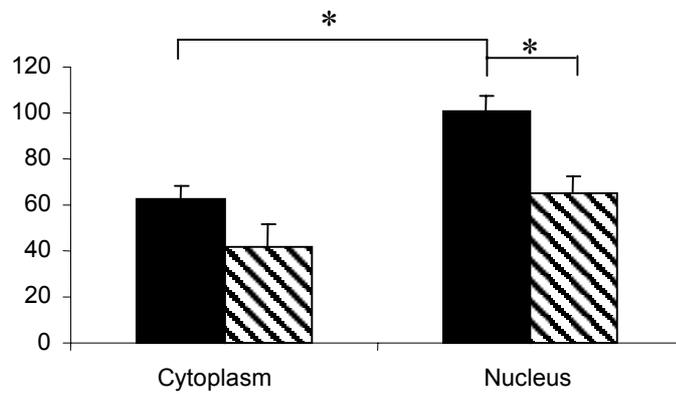
SOCS 1



SOCS 2



SOCS 3



CIS

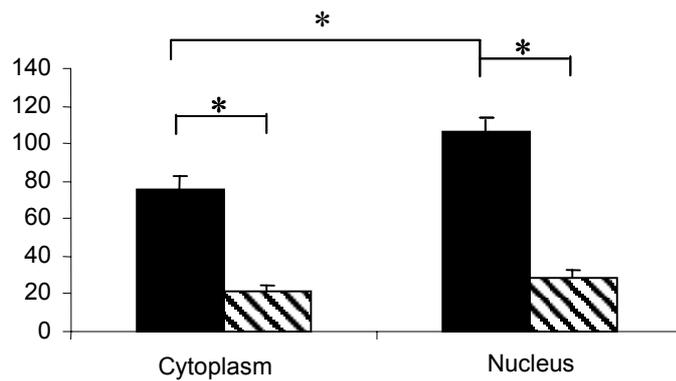
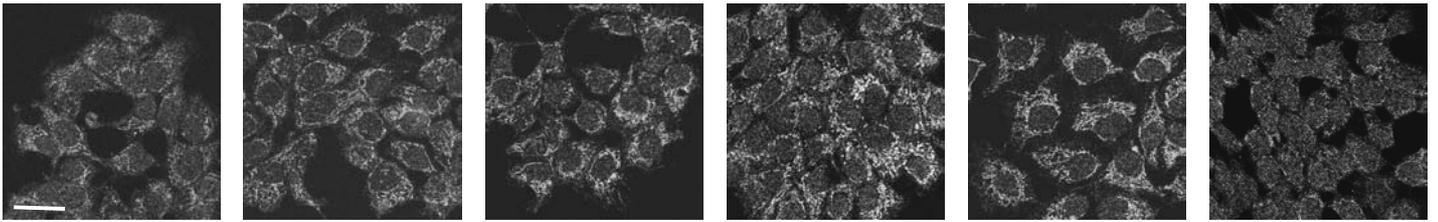
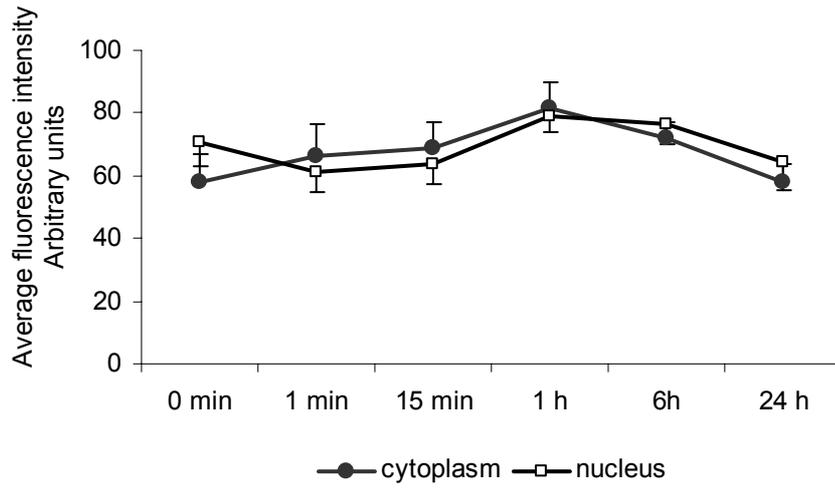


Figure 3

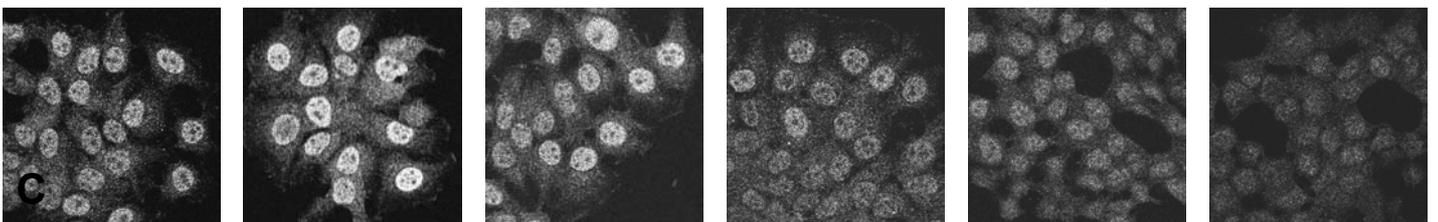
A



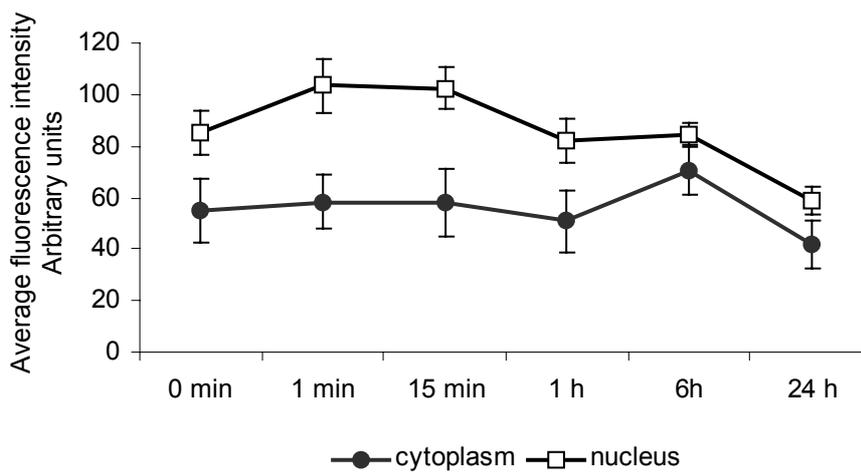
SOCS-1

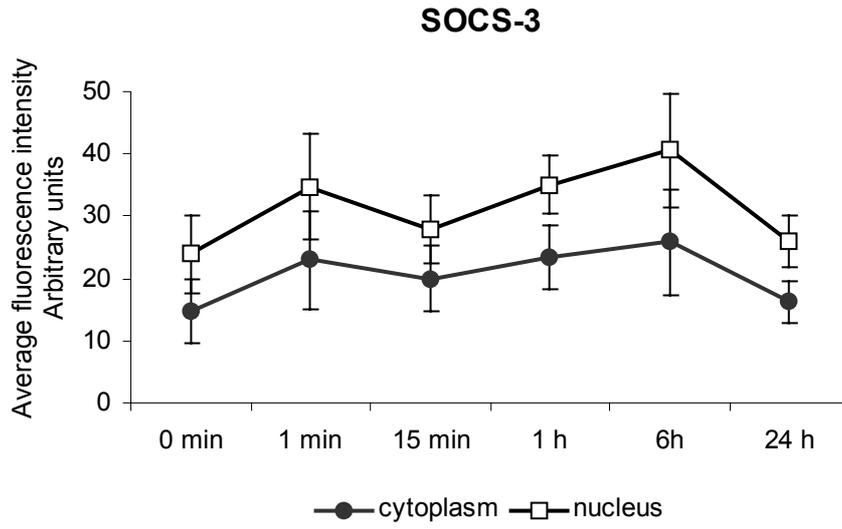
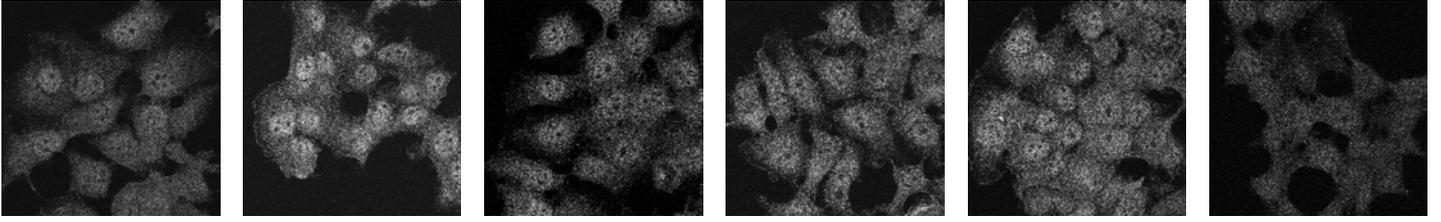
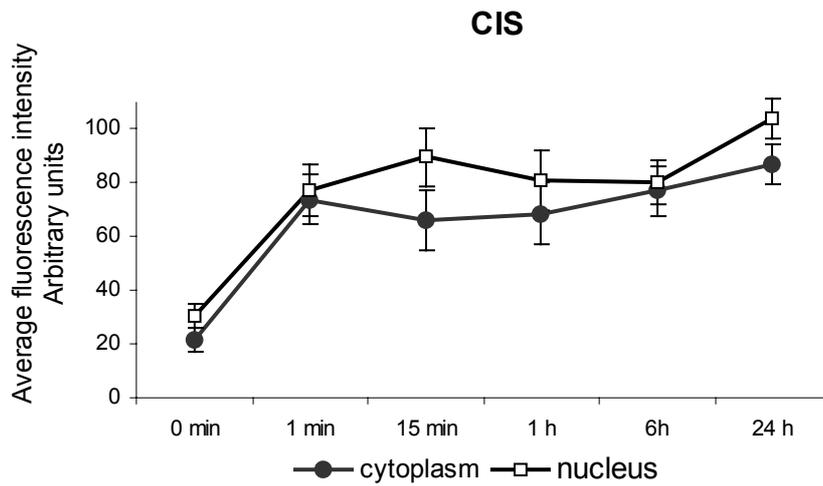
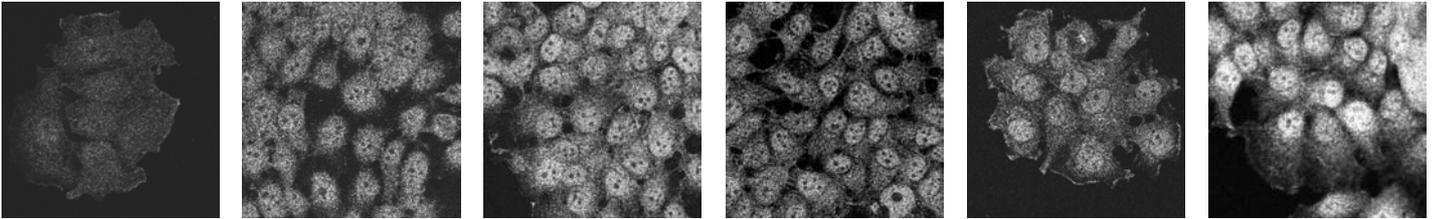


B



SOCS-2



C**D**

V – DISCUSSION / PERSPECTIVES

La GH a vu ses dix dernières années, son statut classique d'hormone intervenant dans la croissance post-natale, s'élargir à une fonction complexe de cytokine qui en fait un régulateur incontournable de la réponse cellulaire. Différents sites de synthèse extra-hypophysaire ont été identifiés dans notre travail et la présence du GHR sur ces mêmes sites suggère qu'en plus de son action de type endocrine, la GH peut agir par mécanisme autocrine / paracrine comme une cytokine inductible, favorisant localement la différenciation et la prolifération cellulaire. Cette GH « autocrine » est donc une véritable entité. Synthétisée très précocement puisqu'au stade morula et dans les blastocystes du rat (Pantaleon *et al.* 1997), elle est, par la présence de son récepteur, directement impliquée dans les premiers stades du développement embryonnaire. Hypothèse confirmée par les travaux de Harvey *et al.* (2000) qui démontrent que la GH est aussi présente dans de nombreux tissus de l'embryon de poulet durant toute la période d'incubation (21 jours). D'une distribution ubiquitaire dans tous les tissus de l'embryon de 3 jours, l'immunoréactivité pour la GH et son récepteur se localise ensuite dans certaines cellules spécifiques de l'ectoderme, mesoderme et endoderme de l'embryon de 5 jours. Cette immunoréactivité est largement mise en évidence dans la plupart des tissus de l'embryon avant la différenciation des cellules somatotropes hypophysaires au stade 12 jours du développement et les auteurs concluent à une action locale participant à la croissance embryonnaire. Action directe ou qui pourrait être médiée par les IGFs, une production locale d'IGF-I et de son récepteur ayant été mise précédemment en évidence chez l'embryon de poulet par les mêmes auteurs (Harvey et Hull 1997). Action confirmée tout récemment par un travail *in vitro* (Ajo *et al.* 2003) qui montre les effets de la GH sur des cellules issues de cortex cérébral de fœtus de rat de 14 et 17 jours. A des doses considérées comme physiologiques (entre 0,5 et 5 ng / ml) elle favorise la prolifération cellulaire des précurseurs neuronaux, la neurogénèse et la gliogénèse par le biais d'une production locale d'IGF-I et d'IGFBP-3 pendant le développement cérébral.

Utilisant les méthodes de RT-PCR en phase liquide et *in situ*, nous avons obtenu des résultats similaires chez l'embryon de rat. Nous avons localisé l'expression du gène de la GH et l'immunoréactivité du GHR dans la plupart de ses organes vitaux, cerveau, cœur, rein, estomac, intestin, avant l'apparition de la synthèse d'hormone somatotrope par l'hypophyse au 18^{ème} jour du développement embryonnaire (travaux non publiés). Nous nous sommes focalisés sur la production ectopique de GH dans le système immunitaire, considérant son rôle dans la réponse immunitaire chez l'adulte. Dans notre premier article, nous avons en effet

localisé une synthèse de GH dans les lymphocytes de la pulpe blanche de la rate, du cortex thymique et de la zone corticale de la plaque de Peyer du rat adulte. Nous l'avons également visualisée dans les cellules hématopoïétiques du foie fœtal. La présence du GHR à la surface des cellules immunes (Badolato *et al.* 1994, Bresson *et al.* 1999) fait de notre démonstration de la synthèse de GH par les lymphocytes fœtaux et adultes, un résultat important qui implique directement l'hormone dans le développement et la régulation du système immunitaire. Implication confirmée chez les enfants atteints d'un déficit en GH hypophysaire qui ne présentent pas pour autant de troubles de la fonction immunitaire. Auernhammer et Strasburger (1995) suggèrent alors que la synthèse locale de GH pallie au déficit systémique. Dans le même sens, de récentes études (Jeay *et al.* 2002) montrent l'effet « cytokine like » de la GH sur une lignée cellulaire, les Ba/F3, issues de lymphome humain et transfectées avec le GHR. Les auteurs montrent que dans ces cellules, la GH est capable d'activer une nouvelle voie de signalisation qui met en jeu l'activation du facteur nucléaire NF- κ B et l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 pour assurer la survie cellulaire. Ils montrent de plus que des concentrations croissantes de GH déclenchent la prolifération cellulaire par l'activation de la PI-3 kinase et l'induction du proto-oncogène *c-myc* (**Figure 31**).

Ils suggèrent également que la PI-3 kinase puisse réguler l'activation du facteur de

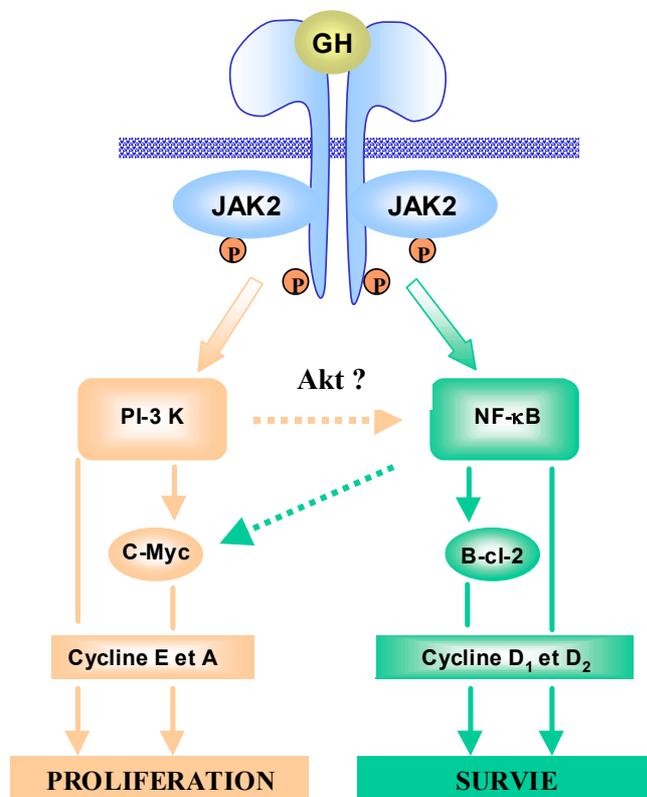


Figure 31 : Représentation schématique des voies de signalisation induites par la GH dans les cellules Ba/F3. La liaison de la GH à son récepteur active JAK2 qui à son tour active simultanément la PI-3 K et le NF- κ B. La PI-3 K intervient sur la prolifération cellulaire par le biais de l'activation de c-Myc. Le NF- κ B intervient sur la survie cellulaire par l'intermédiaire de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. L'expression des cyclines de type D dépend du facteur NF- κ B alors que l'expression des cyclines E et A dépend de la PI-3 K. Un lien entre ces deux voies de signalisation existe puisque l'activation du NF- κ B est partiellement contrôlée par la PI-3 K et qu'une inhibition du NF- κ B diminue l'expression de c-Myc. Akt est la molécule de signalisation qui assure, en aval de la PI-3 K, l'activation du NF- κ B par la GH (d'après Jeay *et al.* 2002).

transcription NF- κ B par l'intermédiaire d'une serine/threonine kinase Akt en aval de la PI-3 K. Ils concluent alors que le facteur NF- κ B est responsable de l'effet anti-apoptotique de la GH d'une part par le biais de l'expression de la protéine Bcl-2 et d'autre part par la transcription de gènes qui régulent le cycle cellulaire comme la cycline D1 et *c-myc*. Une activation constitutive du facteur NF- κ B a été associée au développement d'un certain nombre de cancers incluant le lymphome de Hodgkin's (Bargou *et al.* 1997), les lymphomes à cellules B (Wu *et al.* 1996) et les lymphomes à cellules T (Bellavia *et al.* 2000, Guzman *et al.* 2001). La potentialité que possède la GH à promouvoir ces tumeurs immunes mérite d'autres investigations. Cependant, la mise à jour de ces nouveaux mécanismes d'action de la GH sur les cellules immunes nous permettent de préciser que : 1) la GH pourrait partiellement protéger les cellules immunes contre l'apoptose induite par des conditions de stress, 2) une expression dérégulée de GH pourrait participer au développement de maladies auto-immunes et à la transformation maligne des cellules immunes.

Cette GH extra-hypophysaire est donc une véritable cytokine. Synthétisée sur son lieu d'action, elle apparaît plus précisément comme un régulateur majeur de la réponse locale à un stress, conduisant à une stimulation ou une inhibition d'évènements cellulaires comme la catalyse enzymatique, le réarrangement du cytosquelette ou l'expression de gènes spécifiques.

Nous avons donc recherché sa synthèse dans des phénomènes de prolifération cellulaire et nous avons choisi les pathologies de la glande mammaire puisque la GH est une hormone mammothrophique qui intervient au cours de son développement. Elle produit, de plus, de nombreuses hormones et facteurs de croissance qui participent non seulement au processus normal de modifications phénotypiques cycliques mais également au processus anormal de tumorigénèse. Dans notre deuxième article nous avons montré que la GH est synthétisée localement dans les différents systèmes de prolifération cellulaire du cancer de la glande mammaire humaine. En effet, le développement tumoral de la glande mammaire associe à la prolifération des cellules carcinomateuses, la prolifération des cellules fibro-compétentes responsables de la réaction et de la néosynthèse stromale, une prolifération lymphocytaire et une prolifération des cellules vasculaires (endothéliales, musculaires lisses) qui accompagne l'angiogénèse. Toutes ces cellules qui participent à l'invasion tumorale sont donc le siège d'une forte expression du gène de la GH. La présence du GHR dans la glande mammaire normale et sa surexpression dans les cancers *in situ* et invasif donnent au complexe GH/GHR une signification fonctionnelle dans l'organogénèse et la tumorigénèse de la glande

mammaire. Nous avons montré, de plus, une augmentation de l'expression du gène de la GH dans les métastases ganglionnaires, puisqu'une hybridation simple suffit pour la visualiser. Il nous a été cependant difficile de mettre la protéine en évidence par immunohistochimie, seule la technique Elisa nous a permis de montrer une augmentation du taux de GH dans les trois pathologies étudiées : le fibroadénome, le cancer canalaire *in situ* et invasif, par rapport au taux observé dans la glande mammaire normale. Les concentrations de l'ordre du pg / mg de tissus correspondent aux concentrations habituelles des cytokines. De toutes récentes observations montrent également la présence de GH dans des insulinomes canins (Robben *et al.* 2002) et dans des ostéosarcomes spontanés canins (Kirpensteijn *et al.* 2002) faisant intervenir le même système autocrine / paracrine de stimulation locale. Les auteurs détectent aussi une plus importante expression de GH dans les métastases, comparée à l'insulinome primaire et ils proposent deux explications.

La première fait intervenir les caractères histo-pathologiques de la tumeur et ils suggèrent que : 1) le stroma est moins important dans les métastases, il en résulte une grande densité de cellules tumorales qui expriment le gène de la GH ou, 2) les métastases proviendraient des cellules tumorales qui présentent la plus forte expression de GH. Leurs résultats ont été obtenus par RT-PCR en phase liquide et ne permettent pas d'identifier l'origine cellulaire de la synthèse. Pour notre part, la technique de RT-PCR *in situ* a permis de montrer, au moins dans le cancer de la glande mammaire, que l'expression du gène codant pour la GH est également associée à l'activation fibroblastique que ce soit au niveau de la réaction stromale primaire ou au niveau de la néosynthèse conjonctive qui accompagne la progression métastatique. Le rôle physio-pathologique de cette production de GH autocrine reste à définir, il semble cependant qu'elle intervienne dans l'activation du micro-environnement local où les cellules stromales, immunes et tumorales échangent leurs signaux pour modifier la matrice extra-cellulaire, stimuler la prolifération et faciliter la migration cellulaire.

La deuxième explication est basée sur le rôle des acteurs impliqués dans la régulation locale de cette GH extra-hypophysaire. En effet, l'insulinome est caractérisée par une expression accrue des récepteurs à somatostatine (SRIF) (Robben *et al.* 1997). Dans le pancréas, la tumeur est donc soumise à l'effet inhibiteur du SRIF synthétisé localement alors que les cellules métastatiques échapperaient à cet effet inhibiteur compte tenu des faibles taux d'expression observés dans les métastases tant pour le SRIF que son récepteur et en particulier le sous-type sst2. Robben *et al.* (2002) précisent même que dans certaines formes de tumeurs colorectales ou du pancréas exocrine, c'est la diminution de l'expression du gène

codant pour sst2 qui induit les cellules tumorales vers la formation de métastases. Comme les récepteurs à SRIF ainsi que le SRIF ont été décrits par plusieurs auteurs (§5.2.2.5) dans les tumeurs mammaires, il faudrait vérifier si le même système de régulation locale peut s'envisager pour expliquer l'abondance de GH dans les métastases.

Par ailleurs, la protéine FAK, colocalisée avec les intégrines est directement impliquée dans les interactions cellules / cellules / matrice extra-cellulaire. Son activation par la GH induit la formation d'un complexe multiprotéique de signalisation organisé autour des protéines CrkII et p130^{cas} qui, par le biais de l'activation de la PI-3 K, est directement impliqué dans la migration cellulaire (Cho et Klemke 2000). Les études jusqu'alors *in vitro* pourrait s'étendre à l'*in vivo* pour établir un lien entre l'expression de la GH, l'expression de la protéine FAK et le degré d'invasion tumorale.

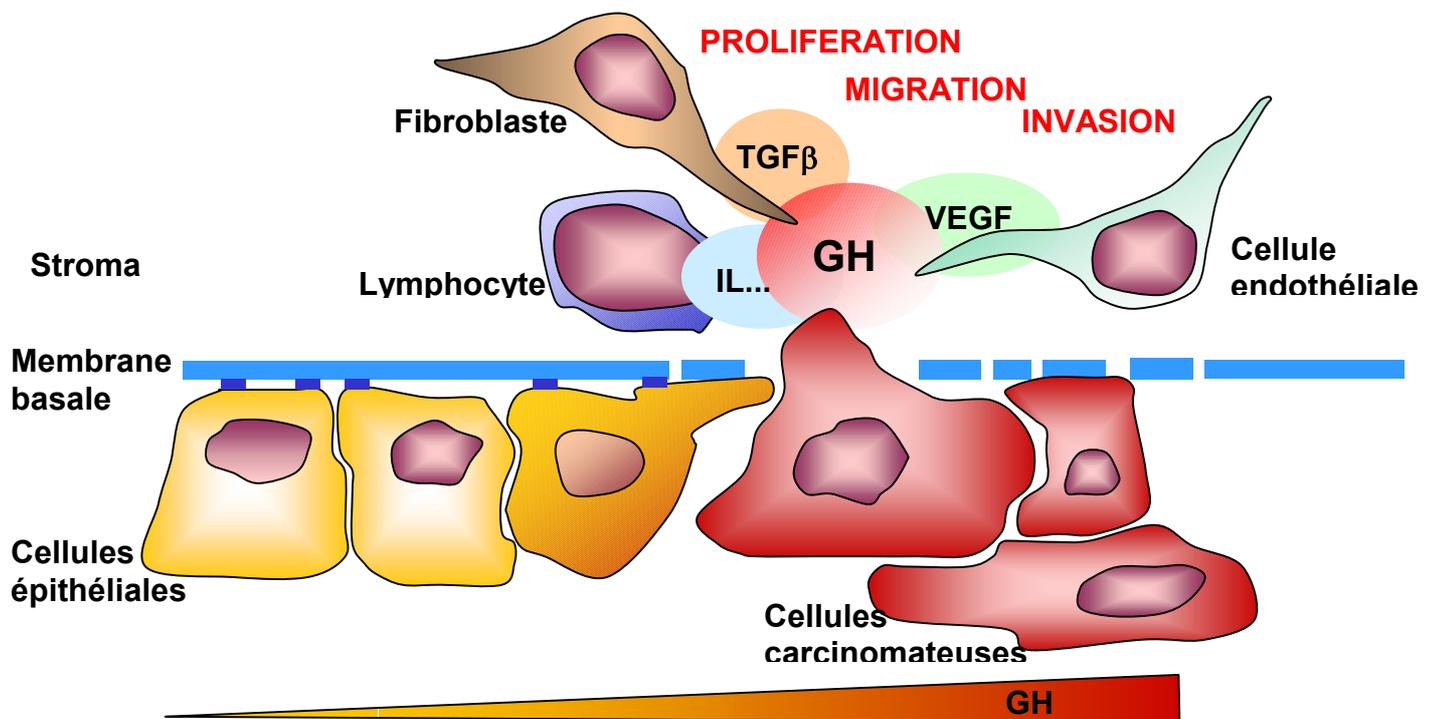


Figure 33 : Implication de la production locale de GH au cours du développement tumoral. Les cellules tumorales, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires synthétisent la GH, régulateur paracrine / autocrine commun. La production accrue de GH au front d'invasion tumoral et dans les cellules métastatiques témoigne de son potentiel d'action. Des études *in vitro* ayant en effet, clairement montré son rôle en tant que facteur prolifératif et anti-apoptotique ainsi que son implication dans la migration cellulaire. Il reste maintenant à déterminer *in vivo*, les mécanismes par lesquels la production autocrine / paracrine de GH (dé)régule l'intégrité de l'environnement cellulaire propre à chaque organe.

Qu'elle soit synthétisée dans le cancer de la glande mammaire, l'insulinome ou l'ostéosarcome, la GH « autocrine » est identique à la GH hypophysaire et la méthode d'amplification rapide de l'extrémité 5' du cDNA (5'-RACE analysis) montre que sa régulation génique locale est la même que celle de l'hormone hypophysaire puisqu'elle est initiée à partir du même site spécifique de transcription. Le facteur de transcription Pit-1 qui se fixe sur deux régions en amont du site d'initiation de la transcription a été décrit comme indispensable à la transcription du gène *hGH-N*. Pourtant, Lantinga-Van Leeuwen *et al.* (1999) et Kooijman *et al.* (1997) affirment respectivement que l'expression de la GH dans la glande mammaire et dans la moelle osseuse est indépendante de l'expression de Pit-1. Il s'agit probablement d'une spécificité liée au chien, modèle sur lequel ils ont travaillé, car Pit-1 a été tout récemment associé à la synthèse de GH dans les cellules MCF7 (Gil-Puig *et al.* 2002). Il serait alors intéressant de rechercher la synthèse de Pit-1 dans les tumeurs mammaires humaines que nous avons étudiées. Nous ne voudrions pas entrer dans la polémique bien connue des endocrinologues qui débattent sur la potentialité de la hGH à se fixer aussi bien sur le GHR que sur le PRLR. Van Garderen et Schalken (2002) ont montré la participation du système GH / GHR dans les processus normaux de morphogénèse et anormaux de tumorigénèse de la glande mammaire canine. Modèle où ils précisent que la GH ne peut exercer son action que par sa liaison spécifique avec le GHR tandis que chez les primates la GH peut se fixer aussi bien sur le GHR que sur le PRLR. Wennbo *et al.* (1997) utilisant des souris transgéniques pour clarifier quel système de récepteur est responsable de la transformation maligne affirment que 1) les souris transgéniques qui surexpriment le gène de la prolactine développent toutes des carcinomes mammaires *via* l'activation du PRLR ; 2) les souris qui surexpriment la bGH ne pouvant se fixer que sur le GHR avec augmentation des taux circulants d'IGF-I ne présentent aucune pathologie alors qu'ils avaient montré précédemment (Törnell *et al.* 1992) que des souris transgéniques surexprimant la hGH susceptible de se lier aux deux récepteurs GHR et PRLR développaient systématiquement des carcinomes mammaires. La GH et en particulier la GH « autocrine » interviendrait alors dans le développement des tumeurs malignes de la glande mammaire seulement par l'intermédiaire de sa liaison au PRLR que nous savons depuis longtemps surexprimé dans ce cas (Bonnetterre *et al.* 1987, Mertani *et al.* 1998). Des études *in vitro* (Kaulsay *et al.* 2001), réalisées sur des cellules MCF7 transfectées d'une manière stable soit avec un vecteur d'expression contenant le gène de la GH (MCF-hGH), soit avec un vecteur d'expression contenant le gène de la GH dont le codon « start » a été inactivé (MCF-MUT), donnent des résultats en parfaite

contradiction. Un antagoniste de la hGH (le B2036) qui ne se fixe pas sur le PRLR (Thorner *et al.* 1999, Goffin *et al.* 1999) a été utilisé pour déterminer les effets cellulaires de la GH spécifiquement médiés par le GHR. Les auteurs confirment que la production autocrine de GH favorise la prolifération des cellules MCF7 par activation mitogénique et protection contre l'apoptose. Elle stimule l'activité transcriptionnelle soit par l'intermédiaire du facteur de transcription STAT5, soit du facteur de transcription Elk-1 (p44/42 MAP kinase dépendant), soit encore du facteur de transcription CHOP (p38 MAP kinase dépendant). Tous ces effets sont supprimés lorsque l'antagoniste B2036 est ajouté à une concentration de 600 nM pendant les 12 heures d'incubation sans SVF prouvant, du moins dans ce modèle cellulaire, que la production de hGH autocrine exerce son action *via* le hGHR. La GH est désormais une cytokine qu'il faut considérer dans le développement tumoral même si les mécanismes qu'elle implique ne sont pas totalement élucidés.

De nombreuses études visent actuellement à caractériser la signalisation moléculaire de cette GH extra-hypophysaire (§5.2.2.4). Dès 1999, Kaulsay *et al.* avaient montré *in vitro* que l'augmentation de l'activité mitotique de cellules MCF-GH était due à l'activation préférentielle des voies de transduction du signal qui font intervenir les p38 MAPK et p42/44 MAPK. D'ailleurs, Santen *et al.* (2002) précisent que le taux des MAPK activées est significativement plus élevé dans le tissu tumoral que dans le tissu normal d'environ 50% des cancers de la glande mammaire. Ils montrent de plus, que le taux des MAPK activées est plus important dans les cancers invasifs présentant des métastases ganglionnaires que dans les cancers non métastatiques. Bien que le nombre de patientes ne soient pas suffisant pour établir une signification statistique, d'autres auteurs (Mueller *et al.* 2000) font du taux de MAPK activées un élément prédictif de survie. Cette augmentation ne provient pas d'une mutation de *Ras* mais de l'activation induite par les facteurs de croissance en particulier l'EGF, fortement co-exprimé avec erb-B2 Neu dans ces tumeurs (von Linting *et al.* 2000). Il est clairement établi maintenant que la GH peut également, par l'intermédiaire de JAK2 phosphorylé, activer les membres de la famille des récepteurs des EGF (erb-B2, erb-B3, erb-B4, EGFR) et que le taux des MAPK traduit l'activation induite par de nombreux facteurs de croissance. La voie des MAPK constitue donc une cible moléculaire potentielle qui permettrait de bloquer la prolifération cellulaire. Des molécules inhibitrices de différentes étapes de la voie de signalisation des MAPK ont d'ailleurs été testées *in vitro* sur des cellules MCF7 (**Figure 32**).

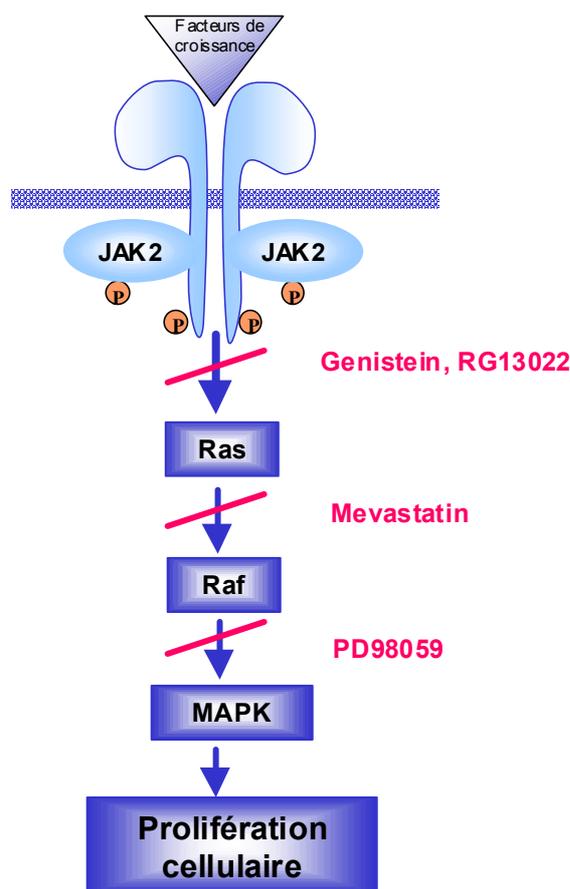


Figure 32 : Représentation schématique des inhibiteurs de la voie des MAPK utilisés pour bloquer la prolifération cellulaire d'un variant des cellules MCF7 (d'après Jeng *et al.* 2000).

D'autres travaux ciblent certains des gènes régulés par la GH « autocrine » dans le cancer de la glande mammaire. Une étude antérieure (Mertani *et al.* 2001) avait permis de montrer que sur 588 gènes criblés, 52 sont régulés par la GH, 28 négativement, 24 positivement. Parmi ceux-ci, le gène *chop* code pour une protéine de 28 kDa plus fortement exprimée dans les cellules MCF-GH que dans les cellules MCF-MUT les protégeant ainsi contre l'apoptose. C'est donc, entre autre par l'activation transcriptionnelle du gène *chop* que la GH régule la prolifération cellulaire dans les tumeurs mammaires. Tout récemment, la même équipe (Zhang *et al.* 2003) démontrent que la stimulation autocrine des cellules carcinomateuses mammaires (MCF7-hGH) augmente l'expression d'un gène candidat qui code pour un protéine à homéodomaine, le facteur de transcription HOXA1 (Homeobox protein A1). C'est un gène qui est impliqué dans le développement, la prolifération cellulaire et dans l'oncogénèse lorsqu'il est dérégulé (Cillo *et al.* 1992, Abate-Shen (2002). Son expression est en particulier mise en évidence dans les lésions néoplasiques de la glande mammaire humaine (Chariot et Castronovo 1996). Pour vérifier le pouvoir oncogénique de HOXA1 les auteurs ont procédé à la transfection stable de HOXA1 dans la lignée cellulaire

MCF-10A et montrent l'acquisition de son caractère transformé par sa capacité à coloniser une membrane d'agar et à développer de larges tumeurs palpables après inoculation dans le tissu adipeux mammaire de souris immunodéficientes (SCID). HOXA1 est donc un oncogène qui active la protéine Bcl-2 anti-apoptotique. Stimulé par la production de GH, il représente donc un maillon du mécanisme moléculaire qui induit la transformation oncogénique des cellules épithéliales mammaires humaines. L'étude des mécanismes anti-apoptotiques sont d'un grand intérêt si l'on considère qu'une surexpression de la protéine Bcl-2 est associée à la chimiorésistance. Ainsi, une surexpression de HOXA1 dans des cellules MCF7 inhibe l'effet de la doxorubicine, un agent utilisé en chimiothérapie qui induit la protéine p53 à exécuter son programme apoptotique. L'inhibition de la transactivation de HOXA1 pourrait alors constituer une nouvelle cible thérapeutique pour contrecarrer la chimiorésistance. De nombreux travaux sont encore nécessaires pour comprendre le rôle de la GH dans la tumorigénèse.

Il est clair que les voies de signalisation identifiées sont directement impliquées dans les processus de prolifération, de survie et de mobilité cellulaire. Elles sont indissociables du trafic cellulaire des molécules signal, le cytoplasme et le noyau constituant des sites d'échanges entre la GH, d'autres facteurs de croissance et régulateurs hormonaux qui contribuent au développement et à la progression tumorale. Au delà du phénomène de désensibilisation bien admis, quel est le rôle de l'internalisation par rapport à la signalisation ?

Pour notre part, nous avons pu montrer récemment en collaboration avec le Dr Jean Chiesa (CHU de Nîmes) que la synthèse autocrine de GH par les cellules épithéliales tumorales mammaires est conservée après la mise en culture primaire de différents types de cancers mammaires humains. Une analyse de la double immunoréactivité GH / GHR par microscopie confocale révèle une localisation précise nucléaire et /ou cytoplasmique de la GH et du GHR. L'analyse fine de cette distribution en corrélation avec le type et le grade de la tumeur fera partie de nos objectifs prioritaires. D'autant plus que nous avons, dans notre troisième article, étudié le trafic intracellulaire de la GH *in vitro*. Il est évident maintenant que le cheminement intracellulaire de la GH internalisée dans les différents compartiments cellulaires est d'une importance majeure pour sa réponse biologique. La liaison de la GH sur le GHR déclenche d'une manière concomitante à la transduction du signal, l'internalisation du complexe GH / GHR *via* les vésicules à clathrine ou les caveol◊. Classiquement, ce processus va aboutir à : 1) un recyclage des récepteurs à la surface cellulaire, 2) une dégradation du récepteur et / ou du ligand par les lysosomes ou le protéasome induisant au

final une régulation négative des récepteurs (phénomène de désensibilisation) ou 3) une translocation vers d'autres compartiments cellulaires comme le noyau où l'action directe de la GH sur la transcription de certains gènes reste à démontrer. La translocation nucléaire de la GH et de son récepteur est pour nous évidente et rapide après stimulation des cellules CHO transfectées avec le GHR. Par des techniques complémentaires nous avons démontré que l'activation de JAK2 et par conséquent la phosphorylation tyrosine induite n'est pas nécessaire à l'internalisation et à la translocation nucléaire de la GH, elle est cependant fondamentale à son transfert hors du noyau. D'autre part nous apportons la preuve que la dimérisation du GHR est indispensable à la translocation nucléaire de la GH. Nous avons ainsi mis en évidence un mécanisme original spécifiquement utilisé par la GH pour sa translocation et son accumulation nucléaire. Il reste à déterminer les substrats de JAK2 activé qui pourraient induire l'exportation nucléaire et dans quelle mesure cette exportation nucléaire possède un rôle physiologique. Khokhlatchev *et al.* (1998) avaient déjà montré qu'après stimulation par un ligand, la dimérisation de la MAP kinase ERK2 était absolument nécessaire à son import nucléaire. Comme la GH active la voie de signalisation passant par les MAPK, il est possible que la dimérisation des protéines impliquées dans la transduction du signal soit fondamentale pour médier leur translocation et leurs effets nucléaires. Quel est le rôle potentiel de cette GH nucléaire ? Quelles sont les cibles moléculaires qui pourraient induire une signalisation typiquement nucléaire ? L'heure est encore aux hypothèses même si des éléments de réponse émergent. Il nous a paru intéressant d'en regrouper quelques uns, d'autant plus que la GH synthétisée dans les cellules carcinomateuses de certains cancers mammaires affiche une localisation nettement nucléaire après mise en culture primaire (travaux non publiés). Le noyau est un réservoir de kinases et de phosphatases, donc un compartiment cellulaire important pour la phosphorylation / dephosphorylation des protéines (Wang 1994). Bien que le mécanisme d'action de ces kinases et phosphatases nucléaires ne soit pas encore complètement défini, il a été rapporté (Ram et Waxman 1997) qu'après stimulation par la GH la phosphatase phosphotyrosine SHP-1 est transloquée dans le noyau où elle désactive les molécules STAT5b phosphorylées. En revanche, dans un tout récent travail Graichen *et al.* (2003) montrent que la GHBP produite de manière endogène est transloquée dans le noyau après stimulation par la GH et qu'elle active la protéine STAT5. Lorsque cette GHBP est dirigée préférentiellement vers le noyau par l'adjonction d'une séquence NLS, une plus forte expression de STAT5 activée est observée. La GHBP agirait donc de manière opposée selon sa localisation, extracellulaire, elle inhibe la réponse cellulaire induite par la GH par compétition avec le GHR, intracellulaire, elle agit comme un

potentialisateur de l'activité transcriptionnelle médiée par STAT5. D'autres molécules de signalisation comme JAK1 et JAK2 sont mises en évidence dans le noyau (Lobie *et al.* 1996). Elles sont exprimées de manière constitutive dans le noyau des hépatocytes de rat et des cellules CHO et l'expression de la forme phosphorylée de JAK2 est fortement induite après induction par la GH (Lobie *et al.* 1996). La voie des MAPK est activée dans le noyau et bien que la protéine MEK n'ait pas été, pour l'instant, localisée dans le noyau, il se pourrait que JAK2 régule la voie de signalisation ERK / MAPK directement dans le noyau. Hypothèse confortée par la présence nucléaire d'un taux élevé de protéine adaptatrice Grb2 (Romero *et al.* 1998). Aucune preuve de l'action directe de la GH sur le noyau n'a encore été établie, pourtant la présence du GHR, de la GH et de toutes les molécules de signalisation rend possible une signalisation nucléaire probablement identique à la signalisation induite au niveau de la membrane plasmique. La réponse cellulaire résulterait ainsi de l'équilibre entre ces deux modes de signalisation au niveau de la membrane plasmique et du noyau, l'internalisation apparaissant comme modulateur des processus de transduction du signal. Wang *et al.* (2002) n'ont ils pas montré que l'endosome peut servir de site d'assemblage du complexe de signalisation induit par l'EGF et que cette signalisation « endosomale » est suffisante pour assurer la survie et la prolifération et pour supprimer l'apoptose induite par un milieu de culture sans sérum. Les caveolines dont le rôle primitif est d'assurer le transport cellulaire de certaines molécules dont la GH (Lobie *et al.* 1999) sont considérées bien différemment depuis les travaux récents de Park *et al.* (2002). En effet, la caveoline-1, apparentée à la famille des protéines SOCS (Park *et al.* 2002), fonctionne comme un nouveau régulateur négatif du signal induit par les cytokines dans la glande mammaire et plus précisément, elle inhibe le signal induit par la liaison PRL / PRLR. Son expression est particulièrement effondrée à la fin de la gestation et pendant la lactation. Les auteurs montrent également que les souris Knockout caveoline-1^{-/-} ont un développement prématuré de la glande mammaire associé à une lactation précoce par hyperactivation de la cascade de signalisation induite par la PRL. En conséquence, une hyperphosphorylation de STAT5a et une activation de la voie Ras-p42/44 MAPK sont observées tout comme chez la souris Knockout SOCS-1^{-/-}. Les études futures viseront la possible redondance entre la caveoline-1 et SOCS-1 dans le développement de la glande mammaire et la lactation. Pour notre part, il nous semble intéressant d'explorer l'expression de ce régulateur négatif potentiel dans le cancer mammaire. Se comporte-t-il comme les différentes SOCS-1, -2, -3 et CIS dont nous avons étudié l'expression dans le cancer de la glande mammaire ?

En effet, par immunohistochimie et hybridation *in situ* semi-quantitative nous avons pu montrer une surexpression des différentes protéines SOCS dans les zones de prolifération tumorale par rapport au tissu sain environnant des cancers canauxaires *in situ* et invasifs que nous avons étudiés. Cette synthèse a été retrouvée comme celle de la GH, tant dans les cellules tumorales que les cellules fibro-compétentes et inflammatoires de la réaction stromale. Notre étude quantitative n'a pas mis en évidence de différence significative entre l'expression obtenue pour les 4 protéines, dans le compartiment tumoral et celle obtenue dans le stroma, nous avons cependant démontré une plus forte expression des protéines SOCS-3 et CIS dans le tissu tumoral par rapport au tissu juxta-tumoral. Comme les protéines SOCS et CIS sont activées d'une manière non spécifique par de nombreuses cytokines, il était important pour nous de rapporter leur expression à l'induction des hormones mammothrophiques et plus précisément à la GH dont la synthèse locale nous paraît d'une grande importance dans la progression tumorale. Dans toutes les lignées tumorales testées par northern blot, seule l'expression de CIS est particulièrement élevée par rapport à l'expression quasiment nulle observée dans deux lignées cellulaires non transformées, les HMEC184 et les MCF-10A. Ram et Waxman (2000) avaient précédemment montré et ceci en accord avec nos résultats, que l'effet inhibiteur de la protéine CIS sur la signalisation induite par la GH dans les cellules COS, elle est en effet capable de déplacer STAT5 de l'extrémité carboxyl du GHR et d'accélérer la dégradation des molécules de signalisation *via* le protéasome. D'ailleurs, le nanisme et l'absence de développement de la glande mammaire des cellules transgéniques surexprimant la protéine CIS suggère fortement que cette protéine est particulièrement impliquée dans la régulation négative du signal induit par la GH et ceci dans de nombreux tissus (Matsumoto *et al.* 1999).

Nos résultats démontrent également que c'est la forme ubiquitinée de CIS qui est exprimée de manière prépondérante, en accord avec un tout récent travail (Du *et al.* 2003) qui confirme l'interaction de CIS avec le GHR et l'importance de l'ubiquitination pour le ciblage vers la dégradation dans des adipocytes isolés de foie de rat incubés avec 500 ng / ml de hGH. L'interaction CIS / GHR est maximale entre 2 et 10 mn de stimulation, lorsque le GHR présente son maximum de phosphorylation tyrosine. A 60 mn, l'interaction CIS / GHR diminue en même temps que le degré de phosphorylation du GHR et des inhibiteurs du protéasome prolongent l'interaction CIS / GHR au delà d'une heure, prouvant que CIS augmente la dégradation du GHR par la voie protéasomale.

Nous avons de surcroît mis en évidence un phénomène d'importance majeure puisque, *in vitro*, les transfections de concentrations croissantes du vecteur d'expression CIS dans les cellules CHO provoquent une activité proportionnelle des MAPK. De la même façon Li *et al.* (2000) avaient montré une activation des MAPK suite à une surexpression de CIS dans les cellules CD4T. Nous pouvons alors assimiler la protéine CIS à un véritable commutateur qui, par suppression de l'activité kinase et inhibition consécutive de STAT5, pourrait bloquer les fonctions différenciées des cellules mammaires pour orienter la signalisation vers la voie des MAPK et ainsi favoriser leur prolifération. De nombreuses études sont encore nécessaires à la compréhension de cette boucle de régulation. Etudes rendues difficiles *in vivo* car la délétion ou surexpression des molécules d'intérêt dans la signalisation induite par la GH empêche le développement de la glande mammaire chez les animaux knockout ou transgéniques. La méthode CRE-*LOXP* (Akira 2000) permet de contourner ce problème et de supprimer le gène de la molécule ciblée uniquement dans l'épithélium mammaire.

Les études *in vitro* contribuent cependant à décortiquer le puzzle et dans notre dernier article nous avons corrélé l'expression des différentes protéines SOCS et CIS à la synthèse autocrine de GH dans les cellules MCF-GH par rapport aux cellules MCF-MUT. L'activation de CIS est majoritaire et largement significative dans le noyau des cellules exprimant la GH, une analyse quantitative nous ayant permis de distinguer la protéine nucléaire et cytoplasmique. Si *in vivo* et dans les lignées cellulaires mammaires, il est difficile de rapporter l'activation de la protéine CIS à la seule GH, ce modèle nous le permet. Cette compartimentation de la protéine pouvait d'autre part, laisser suspecter un trafic des différentes protéines SOCS. Une cinétique de stimulation par la GH nous a permis de montrer que sur des cellules MCF7 « wild type » une GH exogène induit également une forte augmentation de l'expression de la protéine CIS mais aucun trafic n'a pu être mis en évidence pour les SOCS1, -2, -3 et CIS étudiées. Cette activation préférentielle de CIS semble spécifique des cellules tumorales mammaires puisque Adams *et al.* 1998, montrent par « northern blotting » une expression prédominante de SOCS-3 dans les cellules 3T3-F442A après stimulation par la GH. Ils montrent également qu'*in vivo*, des hépatocytes isolés de foie de rat injectés avec une seule dose de GH expriment rapidement le gène codant pour la protéine CIS (30 mn après l'injection) et plus tardivement (1 h après l'injection) mais à un taux plus élevé le gène codant pour la protéine SOCS3. Sur le même modèle d'hépatocytes isolés, cible physiologique de la GH, Du *et al.* (2003) montrent que la protéine CIS peut se fixer par son domaine SH2, directement sur un résidu phosphorylé du GHR et ainsi inhiber

l'activation de STAT5. Dans notre modèle nous devrions observer une modification du taux d'expression de ce facteur de transcription et une activation de la voie des MAPK. Cette activation de la voie de signalisation faisant intervenir les p44/42MAPK ou p38MAPK a déjà été montrée dans les cellules MCF-hGH, (Kaulsay *et al.* 1999, 2000) comme un résultat entre autres 1) de l'activation transcriptionnelle du gène *chop* (Mertani *et al.* 2001), 2) de l'activation du facteur transcriptionnel HOXA1, oncogène qui stimule la synthèse de la protéine Bcl-2 anti-apoptotique (Zhang *et al.* 2003), 3) de l'inhibition du gène du *PTGFβ*, facteur proapoptotique qui inhibe l'action de la cycline D1 fortement exprimée dans les cancers mammaires (Graichen *et al.* 2002). Il faudra désormais compter avec un inhibiteur du signal induit par les cytokines, la protéine CIS dont la réponse semble spécifique à l'activation induite par la GH dans le modèle mammaire.

Ainsi, la GH « autocrine » agirait d'une manière indirecte, soit en activant la transcription de facteurs qui stimulent l'activité mitotique et la survie cellulaire, soit en réprimant la transcription de facteurs qui favorisent l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. L'induction de facteurs inhibiteurs du signal et en particulier la protéine CIS bloquent la voie JAK/STAT assurant les fonctions différenciées des cellules de la glande mammaire, détournant ainsi la signalisation induite par la GH vers la voie des MAPK et probablement la voie de la PI-3 kinase, toutes deux impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire. Il est clair que de nombreuses recherches sont encore nécessaires pour identifier et comprendre les voies de signalisation utilisées par la GH pour promouvoir la tumorigénèse des cellules mammaires. Notre modèle de cultures primaires issues de cancers mammaires constituera un excellent support puisque proches de l'*in vivo*, mais avec les limites dues aux cultures primaires. Si dans les modèles *in vitro*, il est possible de différencier les effets de la GH « autocrine », les effets observés *in vivo* résultent probablement d'une action concertée de la GH « autocrine et de la GH « endocrine » et il sera très difficile de dissocier quelle est la part de chacune d'elle dans le processus de développement tumoral. La méthode de transfection ciblée permettra de surexprimer ou inhiber le gène de la GH seulement dans la glande mammaire de souris transgéniques pour définir le rôle exact de la GH, du GHR et de toutes les molécules de signalisation impliquées dans la transduction du signal.

VI – CONCLUSIONS

Même si le rôle de cytokine attribué à la GH n'est plus à démontrer, notre travail la place, par son action autocrine / paracrine, comme régulateur important de la réponse cellulaire. Cette GH « autocrine », identique à la GH hypophysaire, visualisée dès les premiers stades du développement embryonnaire est impliquée très précocement dans le développement et la régulation de nombreux systèmes de l'organisme en particulier le système immunitaire où elle pourrait selon de récents travaux participer au développement de maladies auto-immunes et à la transformation malignes des cellules immunes.

Nous avons montré sa synthèse locale dans les différents systèmes de prolifération cellulaire du carcinome canalaire mammaire humain et sa surexpression dans les métastases ganglionnaires. Synthétisée aussi bien par les cellules tumorales que toutes les composantes cellulaires de la réaction stromale (cellules fibroblastiques, endothéliales et immunes), la GH participe activement à la progression tumorale. La signalisation moléculaire induite par cette GH ectopique est encore obscure même si de nombreux travaux désignent la voie impliquant les MAPK et la PI-3 kinase comme les voies préférentielles activées dans les cellules tumorales pour favoriser la prolifération et la migration cellulaire. Les modèles *in vitro* (MCF-GH, MCF-MUT) permettent de clarifier les mécanismes mis en jeu et démontrent déjà que la GH régule positivement ou négativement l'expression de certains gènes pro ou anti-apoptotique, pour favoriser le pouvoir mitotique des cellules tumorales.

Ces voies de signalisation génèrent un trafic cellulaire de molécules informatives et il nous semble évident que le cheminement de la GH internalisée dans les différents compartiments cellulaires est d'une importance majeure pour sa réponse biologique. Nous avons démontré *in vitro* l'internalisation et la translocation rapide du complexe GH/GHR. Cette internalisation est indépendante de l'activation de JAK2 et la phosphorylation consécutive du GHR qui semblent cependant indispensables à l'exportation de la GH hors du noyau. Nous avons également démontré que la dimérisation du récepteur est indispensable à la translocation nucléaire. Quel rôle pouvons nous attribuer à cette GH nucléaire ? Nous ne pouvons émettre que des hypothèses même si la présence dans le noyau, de phosphatases, de kinases et de toutes les molécules signal (JAK, STAT, MAPK, Grb2) pourrait suggérer l'existence d'une signalisation typiquement nucléaire.

Par nos travaux à la fois *in vivo* et *in vitro* nous avons mis en évidence un mécanisme de régulation négative impliquant la protéine CIS, inhibitrice du signal induit par les

cytokines. Elle est préférentiellement exprimée dans les zones de prolifération tumorale des différents carcinomes mammaires humains étudiés et dans 8 lignées cellulaires mammaires tumorales alors que deux lignées considérées comme non tumorales ne l'expriment pas. Nous avons également mis en évidence un mécanisme de régulation important puisqu'une transfection de CIS dans des cellules CHO active les MAPK. Ainsi, la protéine CIS est aussi bien capable d'inhiber la voie de signalisation JAK/STAT induit par la GH, en supprimant l'activité kinase et l'activation consécutive de STAT5, que d'activer la voie des MAPK. Elle pourrait donc inhiber les fonctions différenciées des cellules mammaires tout en favorisant leur prolifération.

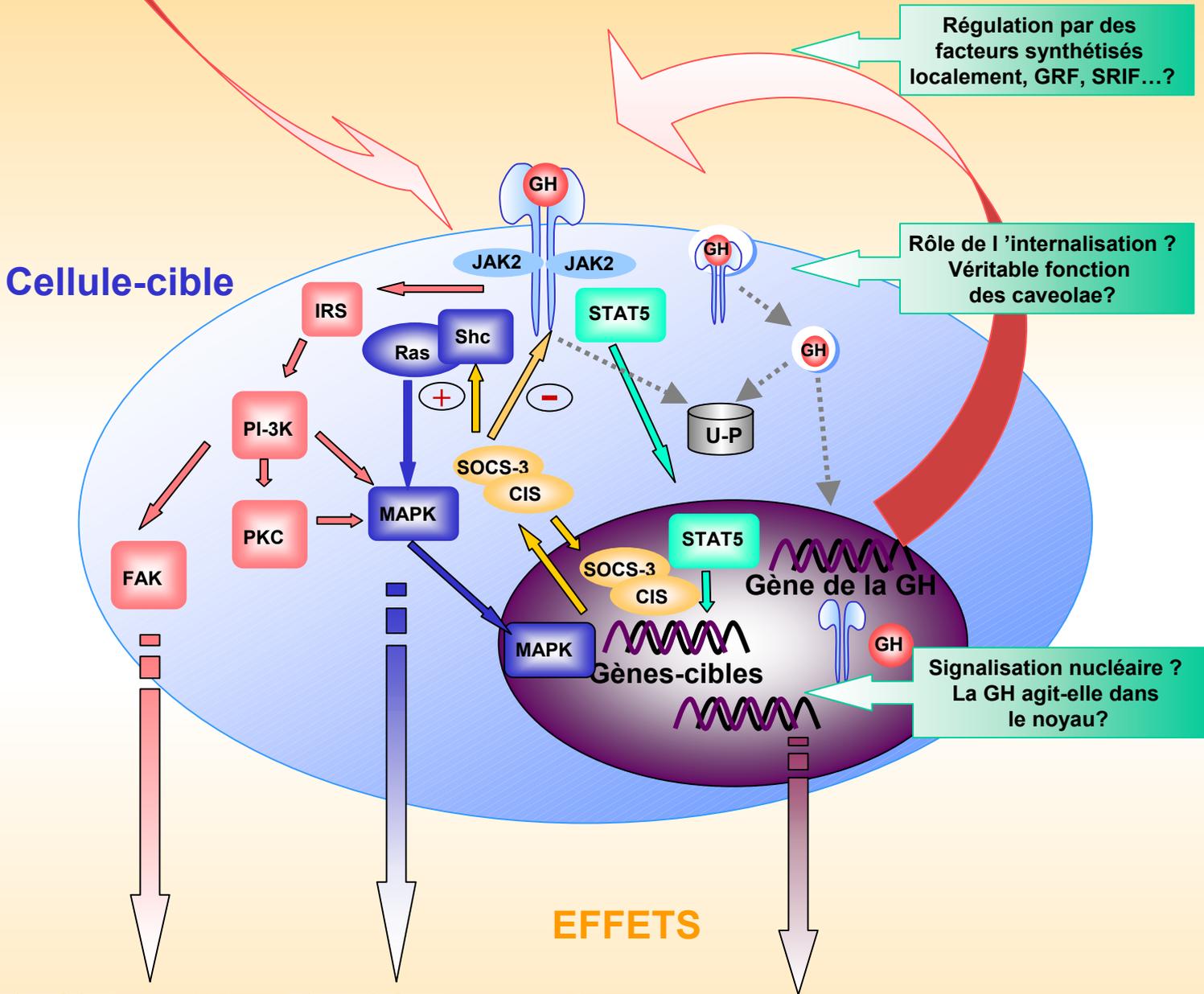
Nous avons finalement rapporté l'expression de CIS à la seule expression autocrine de GH dans le modèle cellulaire MCF-GH. Nous avons retrouvé cette surexpression dans les cellules MCF7 « Wild type » stimulées par la GH exogène selon une cinétique temps. La localisation aussi bien nucléaire que cytoplasmique de la protéine CIS laisse supposer des mécanismes de régulation encore inconnus.

La GH est donc une hormone paradoxale qui suscite un intérêt grandissant. La définition de ses fonctions biologiques se transforment et se précisent peu à peu. Les travaux futurs tenteront de répondre à la question : la GH, hormone de jeunesse ou véritable oncogène ?

SYNTHÈSE / REGULATION

ENDOCRINE

AUTOCRINE / PARACRINE



Adhésion
Organisation du cytosquelette

Progression du cycle cellulaire
Synthèse d'ADN

Anti-apoptotiques

**MIGRATION
INVASION**

PROLIFERATION

Figure 34 : Schéma synthétique de conclusion

VII – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. Abate-Shen C (2002) Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer* 2:777-785
2. Abdel-Meguid SS, Shich HS, Smith WW, Dayringer HE, Violand BN, Bentle LA (1987) Three dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc Natl Acad Sci, USA* 84:6434-6437
3. Abs R, Bengtsson BA, Hernberg-Stahl E, Monson JP, Tauber JP, Wilton P, Wuster C (1999) GH replacement in 1034 growth hormone deficient hypopituitary adults: demographic and clinical characteristics, dosing and safety. *Clin Endocrinol (Oxf)* 50:703-713
4. Adams TE, Hansen JA, Star R, Nicola NA, Hilton DJ, Billestrup N (1998) Growth hormone preferentially induces the rapid transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signalling. *J Biol Chem* 273:1285-1287
5. Aguila MC, Dees WL, Haensly WE, McCann SM (1991) Evidence that somatostatin is localized and synthesized in lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci, USA* 88:11485-11489
6. Aguila MC, McCann SM (1985) Stimulation of somatostatin release *in vitro* by synthetic human growth hormone-releasing factor by a nondopaminergic mechanism. *Endocrinology* 117:762-765
7. Aguila MC, Rodriguez AM, Aguila-Mansilla HN, Lee WT (1996) Somatostatin antisense oligodeoxynucleotide-mediated stimulation of lymphocyte proliferation in culture. *Endocrinology* 137:1585-1590
8. Ajo R, Cacicedo L, Navarro C, Sanchez-Franco F (2003) Growth hormone action on proliferation and differentiation of cerebral cortical cells from fetal rat. *Endocrinology* 144:1086-1097
9. Akira S (2000) Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 19:2607-2611
10. Alete J, Jiang J, Goldsmith JF, Yang X, Maheshwari HG, Black RA, Baumann G, Frank SJ (1998) Blockade of growth hormone receptor shedding by a metalloprotease inhibitor. *Endocrinology* 139:1927-1935
11. Alexander WS (2002) Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:1-7
12. Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, Corbin JE, Cornish AL, Darwiche R, Owczarek CM, Kay TW, Nicola NA, Hertzog PJ, Metcalf D, Hilton DJ (1999) SOCS-1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal action of this cytokine. *Cell* 98:597-608
13. Allaerts W, Carmeliet P, Deneef C (1990) New perspectives in the function of pituitary folliculo-stellate cells. *Mol Cell Endocrinol* 71:73-81
14. Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C, Poli V (2001) Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. *Mol Cell Biol* 21:1621-1632
15. Anderson RG (1992) Multiple endocytic pathways. *J Invest Dermatol* 99:7S-9S
16. Anderson RG (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67:199-225

17. Aoki N, Matsuda T (2000) A cytosolic protein-tyrosine phosphatase PTP1B specifically dephosphorylates and deactivates prolactin-activated STAT5a and STAT5b. *J Biol Chem* 275:39718-39726
18. Aoki N, Matsuda T (2002) A nuclear protein tyrosine phosphatase TC-PTP is a potential negative regulator of the PRL-mediated signaling pathway: dephosphorylation and deactivation of signal transducer and activator of transcription 5a and 5b by TC-PTP in nucleus. *Mol Endocrinol* 16:58-69
19. Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C (1993) Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74:237-244
20. Argetsinger LS, Hsu GW, Myers MG Jr, Billestrup N, White MF, Carter-Su C (1995) Growth hormone, interferon-gamma, and leukemia inhibitory factor promoted tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* 270:14685-14892
21. Argetsinger LS, Carter-Su C (1996) Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev* 76:1089-1107
22. Argetsinger LS, Norstedt G, Billestrup N, White MF, Carter-Su C. (1996) Growth hormone, interferon-gamma, and leukemia inhibitory factor utilize insulin receptor substrate-2 in intracellular signaling. *J Biol Chem* 271:29415-29421
23. Auernhammer CJ, Strasburger CJ (1995) Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the immune system. *Eur J Endocrinol* 133:635-645

B

24. Badolato R, Bond HM, Valerio G, Petrella A, Morrone G, Waters MJ, Venuta S, Tenore A (1994) Differential expression of surface membrane growth hormone receptor on human peripheral blood lymphocytes detected by dual fluorochrome flow cytometry. *J Clin Endocrinol Metab* 79:984-990
25. Baird A, Wehrenberg WB, Ling N (1984) Ontogeny of the response to growth hormone-releasing factor. *Regul Pept* 10:23-28
26. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dorken B (1997) Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 100:2961-2969
27. 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
28. Barnard R, Bundesen PG, Rylatt DB, Waters MJ (1984) Monoclonal antibodies to the rabbit liver growth hormone receptor: production and characterization. *Endocrinology* 115:1805-1813
29. Barnard R, Haynes KM, Werther GA, Waters MJ (1988) The ontogeny of growth hormone receptors in the rabbit tibia. *Endocrinology* 122:2562-2569
30. Barnard R, Quirk P, Waters MJ (1989) Characterization of the growth hormone-binding protein of human serum using a panel of monoclonal antibodies. *J Endocrinol* 123:327-332
31. Barnes DM (1997) Cyclin D1 in mammary carcinoma. *J Pathol* 181:267-279
32. Barta A, Richards RI, Baxter JD, Shine J (1981) Primary structure and evolution of rat growth hormone gene. *Proc Natl Acad Sci, USA* 78:4867-4871
33. Barton DE, Foellmer BE, Wood WI, Francke U (1989) Chromosome mapping of the growth hormone receptor gene in man and mouse. *Cytogenet Cell Genet* 50:137-141

34. Baumann G (1991) Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants and binding proteins. *Endocr Rev* 12:424-449
35. Baumann G (2001) Growth hormone binding protein. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14:355-375
36. Baumann G, Stolar MW, Amburn K, Barsano CP, De Vries BC (1986) A specific growth hormone-binding protein in human plasma: initial characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 10:323-326
37. Baumbach WR, Horner DL, Logan JS (1989) The growth hormone-binding protein in rat serum is an alternatively spliced form of the rat growth hormone receptor. *Genes Dev* 3:1199-1205
38. Baumgartner JW, Wells CA, Chen CM, Waters MJ (1994) The role of the WSXWS equivalent motif in growth hormone receptor function. *J Biol Chem* 269:29094-29101
39. Bazan JF (1989) A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the GH, prolactin, EPO and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor β chain. *Biochem Biophys Res Commun* 162:788-795
40. Bazan JF (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci, USA* 87:6934-6938
41. Bazzoni N, Ambrosi B, Arosio M, Barbareschi M, Losa M, Faglia G (1990) Acromegaly and thymic hyperplasia: a case report. *J Endocrinol Invest* 13:931-935
42. Beauloye V, Ketelslegers JM, Moreau B, Thissen JP (1999) Dexamethazone inhibits both growth hormone (GH)-induction of insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA and GH receptor (GHR) mRNA levels in rat primary cultured hepatocytes. *Growth Horm IGF Res* 9:205-211
43. Bégeot M (1976) Apport de l'immunocytologie à l'étude de l'antéhypophyse fœtale humaine. Thèse doct 3^{ème} cycle Lyon n° 566, 113 pages
44. Begitt A, Meyer T, van Rossum M, Vinkemeier U (2000) Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc Natl Acad Sci, USA* 97:10418-10423
45. Bellavia D, Campese AF, Alesse E, Vacca A, Felli MP, Balestri A, Stoppacciaro A, Tiveron C, Tatangelo L, Giovarelli M, Gaetano C, Ruco L, Hoffman ES, Hayday AC, Lendahl U, Frati L, Gulino A, Screpanti I (2000) Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *EMBO J* 19:3337-3348
46. Benali N, Ferjoux G, Puente E, Buscail L, Sisini C (2000) Somatostatin receptors. *Digestion* 62:27-32
47. Benlot C, Levy L, Fontanaud P, Roche A, Rouannet P, Joubert D (1997) Somatostatin and growth hormone-releasing hormone in normal and tumoral human breast tissue: endogenous content, in vitro pulsatile release, and regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 82:690-696
48. Bennet PA, Levy A, Carmignac D, Robinson IC, Lightman S (1996) Differential regulation of the growth hormone receptor gene: effects of dexamethazone and estradiol. *Endocrinology* 137:3891-3896
49. Bergeron JJ, Posner BI, Josefberg Z, Sikstrom R (1978) Intracellular polypeptide hormone receptors. The demonstration of specific binding sites for insulin and human growth hormone in Golgi fractions isolated from the liver of female rats. *J Biol Chem* 253:4058-4066
50. Bhatena SJ, Louie J, Schechter GP, Redman RS, Wahl L, Recant L (1981) Identification of human mononuclear leukocytes bearing receptors for somatostatin and glucagon. *Diabetes* 30:127-131
51. Bick T, Youdim MBH, Hochberg Z (1989) The dynamics of somatogenic and lactogenic binding: internalization to Golgi fractions in the male rat. *Endocrinology* 125:1718-1722

52. Billestrup N, Bouchelouche P, Allevato G, Ilondo M, Nielsen JH (1995) Growth hormone receptor C-terminal domains required for growth hormone-induced intracellular free Ca²⁺ oscillations and gene transcription. *Proc Natl Acad Sci, USA* 92:2725-2729
53. Billestrup N, Gonzalez-Manchon C, Potter E, Vale W (1990) Inhibition of somatotroph growth and growth hormone biosynthesis by activin in vitro. *Mol Endocrinol* 4:356-62.
54. Bischoff FR, Ponstingl H (1991) Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc Natl Acad Sci, USA* 88:10830-10834
55. Bjorback C, El Haachimi K, Frantz JD, Flier JS (1998) Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1:619-625
56. Boguszewski CL, Svenson PA, Jansson T, Clark R, Carlson LMS, Carlsson B (1998) Cloning of two novel growth hormone transcripts expressed in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2878-2885
57. Bonneterre J, Peyrat JP, Beuscart R, Lefebvre J, Demaille A (1987) Prognostic significance of prolactin receptors in human breast cancer. *Cancer Res* 47:4724-4728
58. Bornfeldt KE, Arnqvist HJ, Enberg B, Mathews LS, Norstedt G (1989) Regulation of Insulin-like growth factor-I and growth hormone gene expression by diabetes and nutritional state in rat tissues. *J Endocrinol* 122:651-655
59. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19:2474-2488
60. Brameld JM, Gilmour RS, Buttery PJ (1999) Glucose and amino acids interact with hormones to control expression of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor mRNA in cultured pig hepatocytes. *J Nutr* 129:1298-1306
61. Breier BH, Vickers MH, Gravance CG, Casey PJ (1996) Growth hormone (GH) therapy markedly increases the motility of spermatozoa and the concentration of insulin-like growth factor-I in seminal vesicle fluid in the male GH-deficient dwarf rat. *Endocrinology* 137:4061-4064
62. Brent GA, Moore DD, Larsen PR (1991) Thyroid hormone regulation of gene expression. *Annu Rev Physiol* 53:17-35
63. Bresson JL, Jeay S, Gagnerault MC, Kayser C, Beressi N, Wu Z, Kinet S, Dardenne M, Postel-Vinay (1999) Growth hormone (GH) and prolactin receptors in human peripheral blood mononuclear cells: relation with age and GH-binding protein. *Endocrinology* 140:3203-3209
64. Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE (2001) Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:517-568.
65. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell* 98:295-303
66. Bromberg J (2002) Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 109:1139-1142
67. Bruning JC, Winnay J, Cheatham B, Kahn CR (1997) Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells. *Mol Cell Biol* 17:1513-1521
68. Bullier-Picard F, Postel-Vinay MC, Kayser C (1989) In-vivo uptake of human growth hormone in male rat liver. *J Endocrinol* 121:19-25
69. Burton KA, Kabigting EB, Clifton DK, Steiner RA (1992) Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid distribution in the adult male rat brain and its colocalization in hypothalamic somatostatin neurons. *Endocrinology* 131:958963

70. Butler AA, LeRoith D (2001) Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 142:1685-1688

C

71. Cacalano NA, Sanden D, Johnston JA (2001) Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras. *Nat Cell Biol* 3:460-465
72. Camarillo IG, Thordarson G, Ilkbahar YN, Talamantes F (1998) Development of a radioimmunoassay for mouse growth hormone receptor. *Endocrinology* 139:3585-3589
73. Campbell GS, Pang L, Miyasaka T, Saltiel AR, Carter-Su C (1992) Stimulation by growth hormone of MAP kinase activity in 3T3-F442A fibroblasts *J Biol Chem* 267:6074-6080
74. Campbell GS, Meyer DJ, Raz R, Levy DE, Schwartz J, Carter-Su C (1995) Activation of acute phase response factor (APRF)/Stat3 transcription factor by growth hormone. *J Biol Chem* 270:3974-3979
75. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995) Recombinant mouse ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546-549
76. Carro E, Senaris R, Considine RV, Casanueva FF, Dieguez C (1997) Regulation of *in vivo* growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology* 139:2203-2206
77. Cary LA, Guan JL (1999) Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Front Biosci* 4:D102-113
78. Cassoni P, Papotti M, Ghe C, Catapono F, Sapimo A, Graziani A, Deghenghi R, Reissmann T, Ghigo E, Muccioli G (2001) Identification, characterization and biological activity of specific receptors for natural ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1738-1745
79. 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
80. Castrillo JL, Theill LE, Karin M (1991) Function of the homeodomain protein GHF-1 in pituitary cell proliferation. *Science* 253:197-199
81. Ceda GP, Davis RG, Rosenfeld RG (1987) The growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH)-GH-somatomedin axis: evidence for rapid inhibition of GHRH-elicited GH release by insulin-like growth factors I and II. *Endocrinology* 114:465-469
82. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci EL (1998) What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology. *Semin Cancer Biol* 8:263-273
83. Chapman GE, Rogers KM, Brittain T, Bradshaw RA, Bates OJ, Turner C, Cary PD, Crane-Robinson C (1981) The 20,000 molecular weight variant of human growth hormone: Preparation and some physical and chemical properties. *J Biol Chem* 256:2395-2401
84. Chariot A, Castronovo V (1996) Detection of HOXA1 expression in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 222:292-297
85. Chatelain A, Dupouy JP, Dubois MP (1979) Ontogenesis of cells producing polypeptide hormones (ACTH, MSH, LPH, GH, Prolactin) in the fetal hypophysis of the rat. Influence of the hypothalamus. *Cell Tissue Res* 196:409-427
86. Chatzistamou I, Schally AV, Varga JL, Groot K, Busto R, Armatas P, Halmos G (2001) Inhibition of growth and metastases of MDA-MB-435 human estrogen-independent breast cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone. *Anticancer Drugs* 12:761-768

87. Chawla RK, Parks JS, Rudman D (1983) Physiological and pathological variants of human growth hormone. *Dev Med Child Neurol* 25:534-539
88. Chen C (2000) Growth hormone secretagogue actions on the pituitary gland: multiple receptors for multiple ligands? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27:323-329
89. Chen CM, Brinkworth R, Waters MJ (1997) The role of receptor dimerization residues in GH signaling. *J Biol Chem* 272:5133-5140
90. Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldafia HA, Gelinas RF, Seeburg PH (1989) The growth hormone locus: nucleotide sequence, biology and evolution. *Genomics* 4:479-497
91. Chen HT, Schuler LA, Schultz RD (1998) Growth hormone receptor and regulation of gene expression in fetal lymphoid cells. *Mol Cell Endocrinol* 137:21-29
92. Chen M, Cheng A, Chen YQ, Hymel A, Hanson EP, Kimmel L, Minami Y, Taniguchi T, Changelian PS, O'Shea JJ (1997) The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common gamma chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. *Proc Natl Acad Sci, USA* 94:6910-6915
93. Chen NY, Chen WY, Kopchick JJ (1997) Liver and kidney growth hormone (GH) receptors are regulated differently in diabetic GH and GH antagonist transgenic mice. *Endocrinology* 138:1988-1994
94. Chen WY, Chen N-Y, Yun J, Wagner TE, Kopchick JJ (1994) In vitro and in vivo studies of antagonistic effects of human growth hormone analogs. *J Biol Chem* 269:15892-15895
95. Chen XP, Losman JA, Rothman P (2000) SOCS proteins regulators of intracellular signaling. *Immunity* 13:287-290
96. Chernauzek SD, Turner R (1989) Attenuation of spontaneous, nocturnal growth hormone secretion in children with hypothyroidism and its correlation with plasma insulin-like growth factor I concentration. *J Pediatr* 114:968-972
97. Chiappetta C, Kirkland JL, Loose-Mitchell DS, Murthy L, Stancel GM (1992) Estrogen regulates expression of the jun family of protooncogenes in the uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41:113-123
98. Chien YH, Thompson EB (1980) Genomic organization of rat prolactin and growth hormone genes. *Proc Natl Acad Sci, USA* 77:4583-4587
99. Cho SY, Klemke RL (2000) Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *J Cell Biol* 149:223-236
100. Choi HK, Waxman DJ (2000) Pulsatility of growth hormone (GH) signalling in liver cells: role of the JAK-STAT5b pathway in GH action. *Growth Horm IGF Res Suppl* B:S1-8
101. Chopin LK, Veveris-Lowe TL, Philipps AF, Herington AC (2002) Co-expression of GH and GHR isoforms in prostate cancer cell lines. *Growth Horm IGF Res* 12:126-136
102. Chow JC, Ling PR, Qu Z, Laviola L, Ciccarone A, Bistran BR, Smith RJ (1996) Growth hormone stimulates tyrosine phosphorylation of JAK2 and STAT5, but not insulin receptor substrate-1 or SHC proteins in liver and skeletal muscle of normal rats in vivo. *Endocrinology* 137:2880-2886
103. Cillo C, Barba P, Freschi G, Bucciarelli G, Magli MC, Boncinelli E (1992) HOX gene expression in normal and neoplastic human kidney. *Int J Cancer* 51:892-897
104. Clackson T, Wells JA (1995) A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* 267:383-386

105. Clark R (1997) The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr Rev* 18:157-179
106. Clark R, Carlsson L, Mortennessen D, Cronin M (1994) Additive effects of body growth of insulin-like growth factor-I and growth hormone in hypophysectomized rats. *Endocrinol Metab* 1:64-69
107. Clevenger CV, Ngo W, Sokol DL, Luger SM, Gewirtz AM (1995) Vav is necessary for prolactin-stimulated proliferation and is translocated into the nucleus of a T-cell line. *J Biol Chem* 270:13246-13253
108. Closset J, Dombrowicz D, Vandenbroeck M, Hennen G (1991) Effects of bovine, human and rat growth hormones on immature hypophysectomized rat testis. *Growth Regul* 1:29-37
109. Cobb MH (1999) MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 71:479-500
110. Cohen P, Peehl DM, Baker B, Liu F, Hintz RL, Rosenfeld RG (1994) Insulin-like growth factor axis abnormalities in prostatic stromal cells from patients with benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1410-1415
111. Cohen P, Clemmons DR, Rosenfeld RG (2000) Does the GH-IGF axis play a role in cancer pathogenesis? *Growth Horm IGF Res* 10:297-305
112. Cohen SM, Ellwein LB (1990) Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* 249:1007-1011
113. Colao A, Balzano A, Ferone D, Panza N, Grande G, Marzullo P, Bove A, Iodice G, Merola B, Lombardi G (1997) Increased prevalence of colonic polyps and altered lymphocyte subset pattern in the colonic lamina propria in acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)* 47:23-28
114. Cole CN, Hammell CM (1998) Nucleocytoplasmic transport: driving and directing transport. *Curr Biol* 8:R368-R372
115. Conte F., Salles JP, Raynal P, Fernandez L, Molinas C, Tauber M, Bieth E (2002) Identification of a region critical for proteolysis of the human growth hormone receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 290:851-857
116. Cooke NE, Ray J, Watson MA, Estes PA, Kuo BA, Liebhaber SA (1988) Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns. *J Clin Invest* 82:270-275
117. Cooney RN (2002) Suppressors of cytokine signalling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 17:83-90
118. Copp RP, Samuels HH (1989) Identification of an adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-responsive region in the rat growth hormone gene: evidence for independent and synergistic effects of cAMP and thyroid hormone on gene expression. *Mol Endocrinol* 3:790-796
119. Cosman D (1993) The hematopoietin receptor superfamily. *Cytokine* 5:95-106
120. Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG, March CJ (1990) A new cytokine superfamily. *Trends Biochem Sci* 15:265-270
121. Courtois SJ, Lafontaine DA, Lemaigre FP, Durviauz SM, Rousseau GG (1990) Nuclear factor-1 and activator protein-2 bind in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequences and trans-activate the human growth hormone gene. *Nucleic Acids Res* 18:57-64
122. Crowe SJ, Cushing H, Homans J (1910) Experimental hypophysectomy. *Bull Johns Hopkins Hosp* 2:127-169

123. Cunningham BC, Henner DJ, Wells JA (1990) Engineering human prolactin to bind to the human growth hormone receptor. *Science* 247:1461-1465
124. Cunningham BC, Ultsch M, Vos AMD, Mulkerrin MG, Clauser KR, Wells JA (1991) Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* 254:821-825
125. Cushing H (1909a) Partial hypophysectomy for acromegaly with remarks on the function of the hypophysis. *Ann Surg* 50:1003-1017
126. Cushing H (1909b) The hypophysis cerebri: clinical aspects of hyperpituitarism and of hypopituitarism. *JAMA* 53:249-255
127. Cushing H (1910) The function of the pituitary body. *Am J Med Sci* 139:473-484
128. Cyert MS (2001) Regulation of nuclear localization during signaling. *J Biol Chem* 276:20805-20808

D

129. Dada MO, Campbell GT, Blake CA (1984) pars distalis cell quantification in normal adult male and female rats. *J Endocrinol* 101:87-94
130. Dardenne M, Mello-Coelho V, Gagnerault MC, Postel-Vinay MC (1998) Growth hormone receptors and immunocompetent cells. *Ann NY Acad Sci* 840:510-517
131. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415-1421
132. Dastot F, Duquesnoy P, Sobrier ML, Goosens M, Amselem S (1998) Evolutionary divergence of the truncated growth hormone receptor isoform in its ability to generate a soluble growth hormone-binding protein. *Mol Cell Endocrinol* 137:79-84
133. Daughaday WH (1989) Growth hormone: normal synthesis, secretion, control and mechanisms of action. *Endocrinology* 1:318-329
134. Dautry-Varsat (2001) Clathrin-independent endocytosis. Oxford University Press, New York, NY
135. Davey HW, McLachlan MJ, Wilkins RJ, Hilton DJ, Adams TE (1999) STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in the liver. *Mol Cell Endocrinol* 156:111-116
136. Davila N, Alcaniz J, Salto L, Estrada J, Barcelo B, Baumann G (1994) Serum growth hormone-binding protein is unchanged in adult panhypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1347-1350
137. Decouvrelaere C, Peyrat JP, Bonnetterre J, Djiane J, Jammes H (1995) Presence of the two growth hormone receptor messenger RNA isoforms in human breast cancer. *Cell Growth Differ* 6:477-483
138. De Gennaro V, Zoli M, Cocchi D (1989) Reduced growth hormone releasing factor (GHRH)-like immunoreactivity and GHRH gene expression in hypothalamus of aged rats. *Peptides* 10:705-709
139. Delhougne B, Deneux C, Abs R, Chanson P, Fierens H, Laurent-Puig P, Duysburgh I, Stevenaert A, Tabarin A, Delwaide J. (1995) The prevalence of colonic polyps in acromegaly: a colonoscopic and pathological study in 103 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3223-3226
140. de Vos AM, Ultsch M, Kossiatoff AA (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255:306-312
141. Dekker LV, Parker PJ (1994) Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci* 19:73-77

142. Deladoëy J, Gex G, Vuissoz JM, Strasburger CJ, Wajnrajch MP, Mullis PE (2002) effect of different growth hormone (GH) mutants on the regulation of GH-receptor gene transcription in a human hepatoma cell line. *Eur J Endocrinol* 146:573-581
143. Delehay-Zervas MC, Mertani H, Martini JF, Nihoul-Fekete C, Morel G, Postel-Vinay MC (1994) Expression of the growth hormone receptor gene in human digestive tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 78:1473-1478
144. Delhase M, Vergani P, Malur A, Velkeniers B, Teugels E, Trouillas J, Hooghe-Peters EL (1993) Pit-1/GHF-1 expression in pituitary adenomas: further analogy between human adenomas and rat SMtTW tumours. *J Mol Endocrinol* 11:129-139
145. Delitala G, Tomasi PA, Palermo M, Fresu P (1990) Interaction of glucose and pyridostigmine on the secretion of growth hormone (GH) induced by GH-releasing hormone (GHRH). *J Endocrinol Invest* 13:653-656
146. Di Fiore PP, De Camilli P (2001) Endocytosis and signaling. An inseparable partnership. *Cell* 106:1-4
147. Dialynas DP, Shao LE, Hinojosa AG, Yu J (1999) Functional and biochemical characterization of a novel human macrophage-derived negative regulator of haematopoiesis. *Cytokine* 11:985-995
148. Dieguez C, Casanueva FF (2000) Ghrelin: a step forward in the understanding of somatotroph cell function and growth regulation. *Eur J Endocrinol* 142:413-417
149. Dingwall C, Laskey RA (1991) Nuclear targeting sequences: a consensus? *Trends Biochem Sci* 16:478-481
150. Dixon JS, Li CH (1966) Retention of the biological potency of human pituitary growth hormone after reduction and carbamidomethylation. *Science* 154:785-786
151. Dobashi H, Sato M, Tanaka T, Tokuda M, Ishida (2001) Growth hormone restores glucocorticoid-induced T cell suppression. *FASEB J* 15:1861-1863
152. Doglio A, Dani C, Grimaldi P, Ailhaud G (1989) Growth hormone stimulates c-fos gene expression by means of protein kinase C without increasing inositol lipid turnover. *Proc Natl Acad Sci, USA* 86:1148-1152
153. Du L, Frick GP, Tai LR, Yoshimura A, Goodman HM (2003) Interaction of the growth hormone receptor with cytokine-induced SRC homology domain 2 protein in rat adipocytes. *Endocrinology* 144:868-876
154. Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C, Thomassin N, Rosenzweig S, Harris J, Holland SM, Schreiber RD, Casanova JL (2001) Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science* 293:300-303
155. Duquesnoy P, Sobrier ML, Duriez B, Dastot , Buchanan CR, Savage MO, Preece MA, Craescu CT, Blouquit Y, Gossens M (1994) A single amino acid substitution in the extracellular domain of the human GH receptor complex confers familial GH resistance by abolishing receptor homodimerization. *EMBO J* 13:1386-1395

E

156. Eden S (1979) Age and sex related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 105:5555-5560
157. Edens A, Talamantes F (1998) Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocr Rev* 19:559-582

158. Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM, Weinberg RA (1993) Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 363:45-51
159. Eisenhauer KM, Chun SY, Billig H, Hsueh AJ (1995) Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein. *Biol Reprod* 53:13-20
160. El Etreby MF, Graf KJ, Beier S, Elger W, Gunzel P, Neumann F (1979) Suitability of the beagle dog as a test model for the tumorigenic potential of contraceptive steroids. "A short review". *Contraception* 20:237-256
161. Emilsson V, Arch JRS, de Groot RP, Lister CA, Cawthorne MA (1999) Leptin treatment increases suppressors of cytokine signaling in central and peripheral tissues. *FEBS Lett* 455:170-174
162. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Otsubo M, Misawa H (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387:921-924
163. Epelbaum J, Dournaud P (1998) Somatostatin: a ubiquitous peptide. *C R Séances Soc Biol Fil* 192:597-606
164. Epelbaum J, Willoughby JO, Brazeau P, Martin JB (1977) Effects of brain lesion and hypothalamic deafferentation on somatostatin distribution in rat brain. *Endocrinology* 101:1495-1502
165. Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, Li Y, Wang JM, Yang-Yen HF, Karras J, Jove R, Loughran TP Jr (2001) Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest* 107:351-362
166. Escot C, Theillet C, Lidereau R, Spyrtos F, Champeme MH, Gest J, Callahan R (1986) Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci, USA* 83:4834-4838
167. Esposito N, Paterlini P, Kelly PA, Postel-Vinay MC, Finidori L (1994) Expression of two isoforms of the human growth hormone receptor in normal liver and hepatocarcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 103:13-20
168. Evans M, Long JA (1921) The effect of the anterior lobe administered intraperitoneally upon growth, maturity, and estrus cycles of the rat. *Anat Rec* 21:62-78
169. Evans-Storms RB, Cidlowski JA (1995) Regulation of apoptosis by steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:1-8

F

170. Fagerlund R, Melen K, Kinnunen L, Julkunen I (2002) Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5. *J Biol Chem* 277:30072-30078
171. Fain JN, Ihle JH, Bahouth SW (1999) Stimulation of lipolysis but not of leptin release by growth hormone is abolished in adipose tissue from Stat5a and b knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 263:201-205
172. Farrow SM. (1993) Post-transcriptional regulation of hormone synthesis. *J Endocrinol* 138:363-368
173. Favoni RE, de Cupis A (2000) The role of polypeptide growth factors in human carcinomas: new targets for a novel pharmacological approach. *Pharmacol Rev* 52:179-206

174. Fekete M, Wittliff JL, Schally AV (1989) Characteristics and distribution of receptors for [D-TRP6]-luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin, epidermal growth factor, and sex steroids in 500 biopsy samples of human breast cancer. *J Clin Lab Anal* 3:137-147
175. Fielder PJ, Mortensen DL, Mallet P, Carlsson B, Baxter RC, Clark RG (1996) Differential long-term effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) growth hormone (GH), and IGF-I plus GH on body growth and IGF binding proteins in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 137:1913-1920
176. Fife SK, Brogan RS, Giustina A, Wehrenberg WB (1996) Immunocytochemical and molecular analysis of the effects of glucocorticoid-treatment on the hypothalamic-somatotropic axis in the rat. *Neuroendocrinology* 64:131-138
177. Finidori J (2000) Regulators of growth hormone signaling. *Vitam Horm* 59:71-97
178. Flavell DM, Wells T, Wells SE, Carmignac DF, Thomas GB, Robinson IC (1996) Dominant dwarfism in transgenic rats by targeting human growth hormone (GH) expression to hypothalamic GH-releasing factor neurons. *EMBO J* 15:3871-3879
179. Foster CM, Shafer JA, Rozsa FW, Wang XY, Lewis SD, Renken DA, Natale JE, Schwartz J, Carter-Su C (1988) Growth hormone promoted tyrosyl phosphorylation of growth hormone receptors in murine 3T3-F442A fibroblasts and adipocytes. *Biochemistry* 27:326-334
180. Friend K, Iranmanesh A, Login IS, Veldhuis JD (1997) Pyridostigmine treatment selectively amplifies the mass of GH secreted per burst without altering the GH burst frequency, half-life, basal GH secretion or the orderliness of the GH release process. *Eur J Endocrinol* 137:377-386
181. Frohman LA, Szabo M (1981) Ectopic production of growth hormone-releasing factor by carcinoids and pancreatic islets tumors associated with acromegaly. *Prog Clin Biol Res* 74:259-271
182. Fryburg DA (1994) Insulin-like growth factor I exerts growth hormone- and insulin-like actions on human muscle protein metabolism. *Am J Physiol* 267:E331-336
183. Fuh G, Mulkerrin MG, Bass S, McFarland N, Brochier M, Bourell JH, Light DR, Wells JA (1990) The human growth receptor: secretion from Escherichia Coli and disulfide bounding pattern of the extracellular binding domain. *J Biol Chem* 265:3111-3115
184. Fuh G, Cunningham BC, Fukunaga R, Nagata S, Goeddel DV, Wells JA (1992) Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. *Science* 256:1677-1680

G

185. Gallego MI, Binart N, Robinson GW, Okagaki R, Coschigano KT, Perry J, Kopchick JJ, Oka T, Kelly PA, Hennighausen L (2001) Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects. *Dev Biol* 229:163-175
186. Galsgaard ED, Gouilleux F, Groner B, Serup P, Nielsen JH, Billestrup N (1996) Identification of a growth hormone-responsive STAT5-binding element in the rat insulin 1 gene. *Mol Endocrinol* 10:652-660
187. Garcia A, Alvarez CV, Smith RG, Dieguez C (2001) Regulation of Pit-1 expression by ghrelin and GHRP-6 through the GH secretagogue receptor. *Mol Endocrinol* 15:1484-1495
188. Garcia Aragon J, Lobie PE, Muscat GEO, Gobius KS, Norstedt G, waters MJ (1992) prenatal expression of the GH receptor/binding protein in the rat: A role for GH in fetal development? *Development* 114:869-876

189. Garcia-Caballero T, Mertani HC, Lambert A, Gallego R, Fraga M, Pintos E, Forteza J, Chevalier M, Lobie PE, Vonderhaar BK, Beiras A, Morel G (2000) Increased expression of growth hormone and prolactin receptors in hepatocellular carcinomas. *Endocrine* 12:265-271
190. Gaylinn BD (1999) Molecular and cell biology of the growth hormone-releasing hormone receptor. *Growth Horm IGF Res* 9:37-44
191. Gebre-Medhin M, Kindblom LG, Wennbo H, Törnell J, Meis-Kindblom JM (2001) Growth hormone receptor is expressed in human breast cancer. *Am J Pathol* 158:1217-1222
192. Ghigo E, Bellone J, Mazza E, Imperiale E, Procopio M, Valente F, Lala R, De Sanctis C, Camanni F (1990) Arginine potentiates the GHRH but not the pyridostigmine-induced GH secretion in normal short children. Further evidence for a somatostatin-suppressing effect of arginin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 32:763-766
193. Gil-Puig C, Blanco M, Garcia-Caballero T, Segura C, Perez-Fernandez R (2002) Pit-1/GHF-1 and GH expression in the MCF-7 human breast adenocarcinoma cell line. *J Endocrinol* 173:161-167
194. Ginarte M, Garcia-Caballero T, Fernandez-Redondo V, Beiras A, Toribio J (2000) Expression of growth hormone receptor in benign and malignant cutaneous proliferative entities. *J Cutan Pathol* 27:276-282
195. Giovannucci E, Pollak M, Platz EA, Willett WC, Stampfer MJ, Majeed N, Colditz GA, Speizer FE, Hankinson SE (2000a) Insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding protein-3 and the risk of colorectal adenoma and cancer in the Nurses' Health Study. *Growth Horm IGF Res Suppl A*:S30-31
196. Giovannucci E, Pollak MN, Platz EA, Willett WC, Stampfer MJ, Majeed N, Colditz GA, Speizer FE, Hankinson SE (2000b) A prospective study of plasma insulin-like growth factor-1 and binding protein-3 and risk of colorectal neoplasia in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:345-349
197. Girault JA, Labesse G, Moron JP, Callebaut I. (1998) Janus kinases and focal adhesion kinases play in the 4.1 band: a superfamily of band 4.1 domains important for cell structure and signal transduction. *Mol Med* 4:751-769
198. Girod C (1980) L'appareil hypothalamo hypophysaire. In: Girod (ed.) Introduction à l'étude des glandes endocrines. Editions SIMEP, Villeurbanne, pp 23-146
199. Giustina A, Wehrenberg WB (1995) Influence of thyroid hormones on the regulation of growth hormone secretion. *Eur J Endocrinol* 133:646-653
200. Giustina A, Veldhuis JD (1998) Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev* 19:717-797
201. Gluckman PD, Grumbach MM, Kaplan SL (1981) The neuroendocrine regulation and function of growth hormone and prolactin in the mammalian fetus. *Endocr Rev* 2:363-395
202. Gluckman PD, Breler BH, Sauerwein H (1990) Regulation of the cell surface growth hormone receptor. *Acta Paediatr Scand* 366:73-78
203. Godowski PJ, Leong DW, Meacham LR, Galgani JP, Hellmiss R, Keret R, Rotwein PS, Parks JS, Laron Z, Wood WI (1989) Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proc Natl Acad Sci, USA* 86:8083-8087
204. Goeddel DV, Heyneker HL, Hozumi T, Arentzen R, Itakura K, Yanzura DG, Ross MJ, Miozzari G, Crea R, Seeburg PH (1979) Direct expression in Escherichia coli of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* 281:544-548
205. Goff BL, Roth JA, Arp LH, Incefy GS (1987) Growth hormone treatment stimulates thymulin production in aged dogs. *Clin Exp Immunol* 68:580-587

206. Goffin V, Bernichtein S, Carriere O, Bennett WF, Kopchick JJ, Kelly PA (1999) The human growth hormone antagonist B2036 does not interact with the prolactin receptor. *Endocrinology* 140:3853-3856
207. Goh EL, Pircher TJ, Wood TJ, Norstedt G, Graichen R, Lobie PE (1997) Growth hormone-induced reorganization of the actin cytoskeleton is not required for STAT5 (signal transducer and activator of transcription-5)-mediated transcription. *Endocrinology* 138:3207-3215
208. Goh EL, Zhu T, Yakar S, LeRoith D, Lobie PE (2000) CrkII participation in the cellular effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent and independent effects. *J Biol Chem* 275:17683-17692
209. Goodyer CG, De Stephano L, Guyda HJ, Posner BI (1984) Effects of insulin-like growth factors on adult male rat pituitary function in tissue culture. *Endocrinology* 115:1568-76
210. Goodyer CG, Zogopoulos G, Schwartzbauer G, Zheng H, Hendy GN, Menon RK (2001a) Organization and evolution of the human growth hormone receptor gene 5' flanking region. *Endocrinology* 142:1923-1934
211. Goodyer CG, Zheng H, Hendy GN (2001b) Alu elements in human growth hormone receptor gene 5' untranslated region exons. *J Mol Endocrinol* 27:357-366
212. Gorin E, Grichting G, Goodman HM (1984) Binding and degradation of [¹²⁵I]human growth hormone in rat adipocytes. *Endocrinology* 115:467-475
213. Gossard F, Dihl F, Pelletier G, Dubois PM, Morel G (1987) In situ hybridization to rat brain and pituitary gland of growth hormone cDNA. *Neurosci Lett* 79:251-256
214. Govers R, ten Broeke T, van Kerkhof P, Schwartz AL, Strous GJ (1999) Identification of a novel ubiquitin conjugation motif, required for ligand-induced internalization of the growth hormone receptor. *EMBO J* 18:28-36
215. Graichen R, Liu D, Sun Y, Lee KO, Lobie PE (2002) Autocrine human growth hormone inhibits placental transforming growth factor-beta gene transcription to prevent apoptosis and allow cell cycle progression of human mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* 277:26662-26672
216. Graichen R, Sandstedt J, Goh EL, Isaksson OG, Tornell J, Lobie PE (2003) The growth hormone-binding protein is a location-dependent cytokine receptor transcriptional enhancer. *J Biol Chem* 278:6346-6354
217. Gregoraszczuk EL, Milewicz T, Kolodziejczyk J, Krzysiek J, Basta A, Sztefko K, Kurek S, Stachura J (2001) Progesterone-induced secretion of growth hormone, insulin-like growth factor I and prolactin by human breast cancer explants. *Gynecol Endocrinol* 15:251-258
218. Grichting G, Levy LK, Goodman HM (1983) Relationship between binding and biological effects of human growth hormone in rat adipocytes. *Endocrinology* 113:1111-1120
219. Gronowski AM, Zhong Z, Wen Z, Thomas MJ, Darnell JE Jr, Rotwein P (1995) In vivo growth hormone treatment rapidly stimulates the tyrosine phosphorylation and activation of Stat3. *Mol Endocrinol* 9:171-177
220. Guarcello V, Weigent DA, Blalock JE (1991) Growth hormone releasing hormone receptors on thymocytes and splenocytes from rats. *Cell Immunol* 136:291-302
221. Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB (1982) Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that cause acromegaly. *Science* 218:585-587
222. Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, Luger SM, Jordan CT (2001) Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 98:2301-2307

H

223. Hadden DR, Prout TE (1964) A growth hormone-binding protein in normal human serum. *Nature* 202:1342-1343
224. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M (1998) Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 351:1393-1396
225. Hansen JA, Lindberg K, Hilton DJ, Nielsen JH, Billestrup N (1999) Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signalling by suppressor of cytokine signalling proteins. *Mol Endocrinol* 13:1832-1843
226. Harder T, Kellner R, Parton RG, Gruenberg J (1997) Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 8:533-545
227. Harding PA, Wang XZ, Kelder B, Souza S, Okada S, Kopchick JJ (1994) In vitro mutagenesis of growth hormone receptor Asn-linked glycosylation sites. *Mol Cell Endocrinol* 106:171-180
228. Harding PA, Wang X, Okada S, Chen WY, Wan W, Kopchick JJ (1996) growth hormone (GH) and a GH antagonist promote GH receptor dimerization and internalization. *J Biol Chem* 271:6708-6712
229. Harel Z, Tannenbaum GS (1992) Synergistic interaction between insulin-like growth factors-I and -II in central regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 131:758-764
230. Harvey S, Hull KL (1997) Growth hormone. A paracrine growth factor? *Endocrine* 7:267-279
231. Harvey S, Hull KL, Fraser RA (1993) Growth hormone: neurocrine and neuroendocrine perspectives. *Growth Regul* 3:161-171
232. Harvey S, Johnson CD, Sanders EJ (2000) Extra-pituitary growth hormone in peripheral tissues of early chick embryos. *J Endocrinol* 166:489-502
233. Hasegawa O, Minami S, Sugihara H, Wakabayashi I (1993) Developmental expression of the growth hormone receptor gene in the rat hypothalamus. *Develop Brain Res* 74:287-290.
234. Hashimoto Y, Kamioka T, Hosaka M, Mabuchi K, Mizuchi A, Shimazaki Y, Tsunoo M, Tanaka T (2000) Exogenous 20 K growth hormone (GH) suppresses endogenous 22 K GH secretion in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 85:601-606
235. Haspel RL, Darnell JE Jr (1999) A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci, USA* 96:10188-10193
236. Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H (1994) Spontaneous growth hormone (GH) secretion by unstimulated human lymphocytes and the effects of GH-releasing hormone and somatostatin. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1678-1680
237. Hellgren G, Jansson JO, Carlsson LM, Carlsson B (1999) The growth hormone receptor associates with Jak1, Jak2 and Tyk2 in human liver. *Growth Horm IGF Res* 9:212-218
238. Herlant M (1960) Cytologie du lobe antérieur de l'hypophyse. *Anat Anz* 109:562-596
239. Herrington J, Smit LS, Schwartz J, Carter-Su C (2000) The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene* 19:2585-2597
240. Herrington J, Carter-Su C (2001) Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 12:252-257

241. Heuser JE, Keen JH, Amende LM, Lippoldt RE, Prasad K (1987) Deep-etch visualization of 27S clathrin: a tetrahedral tetramer. *J Cell Biol* 105:1999-2009
242. Hilkens CM, Is'harc H, Lillemeier BF, Strobl B, Bates PA, Behrmann I, Kerr IM (2001) A region encompassing the FERM domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130. *FEBS Lett* 505:87-89
243. Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Spring NS, Starr R, Nocholson SE, Metcalf D, Nicola NA (1998) Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci, USA* 95:114-119
244. Hirst J, Robinson MS (1998) Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta* 1404:173-193
245. Hirt H, Kimelman J, Birnbaum MJ, Chen EY, Seeburg PH, Eberhardt NL, Barta A (1987) The human growth hormone gene locus: structure, evolution and allelic variations. *DNA* 6:59-70
246. Holly JMP, Gunnell DJ, Davey Smith G (1999) Growth hormone, IGF-I and cancer. Less intervention to avoid cancer? More intervention to prevent cancer. *J Endocrinol* 162:321-330
247. Holstein SE, Ungewickell H, Ungewickell E (1996) Mechanism of clathrin basket dissociation: separate functions of protein domains of the DnaJ homologue auxilin. *J Cell Biol* 135:925-937
248. Hong H, Herington AC (1991) Differentiation between the effects of IGF-1 and GH on PMSG-induced progesterone production by rat granulosa cells. *Growth Regul* 1:65-71
249. Horvath CM, Wen Z, Darnell JE Jr (1995) A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev* 9:984-994
250. Horvath E, Kovacs A (1988) Fine structural cytology of the adenohypophysis in rat and man. *J Electron Microscop Tech* 8:401-432
251. Horwitz K B (1991) The molecular biology of RU 486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer? *Endocr Rev* 13:146-162
252. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K (2000) Purification and characterisation of rat des-Gln 14-ghrelin, a second endogenous ligand for growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem* 275:21995-2000.
253. Hubbard SR, Till JH (2000) Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 69:373-398
254. Hug H, Sarre TF (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* 291:329-343
255. Hull KL, Thiagarajah A, Harvey S (1996) Cellular localization of growth hormone receptors/binding proteins in immune tissues. *Cell Tissue Res* 286:69-80
256. Husman B, Gustafsson JA, Andersson G (1988) Receptor-mediated endocytosis and degradation of bovine growth hormone in rat liver. *Mol Cell Endocrinol* 59:13-25

I

257. Ibarra-Sanchez MJ, Simonicic PD, Nestel FR, Duplay P, Lapp WS, Tremblay ML (2000) The T-cell protein tyrosine phosphatase. *Semin Immunol* 12:379-386
258. Ihle JN (1996) STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84:331-334
259. Ihle JN (2001) The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 13:211-217

260. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O (1995) Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 13:369-398
261. Ilkbahar YN, Southard JN, Talamantes F (1999) Transcriptional upregulation of hepatic GH receptor and GH-binding protein expression during pregnancy in the mouse. *J Mol Endocrinol* 23:85-96
262. Ilondo MM, Damholt AB, Cunningham BA, Wells JA, Meyts PD, Shymko RM (1994) Receptor dimerization determines the effects of growth hormone in primary rat adipocytes and culture IM-9 lymphocytes. *Endocrinology* 134:2397-2403
263. Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA (1982) Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 216:1237-1239
264. Ivarie RD, Baxter JD, Morris JA (1981) Interaction of thyroid and glucocorticoid hormones in rat pituitary tumor cells. Specificity and diversity of the responses analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* 256:4520-4528

J

265. Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC, Baixeras E (2000) Growth hormone prevents apoptosis through activation of nuclear factor-kappaB in interleukin-3-dependent Ba/F3 cell line. *Mol Endocrinol* 14:650-661
266. Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC, Kelly PA, Baixeras E. (2002) Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol* 188:1-7
267. Jeng MH, Yue W, Eischeid A, Wang JP, Santen RJ (2000) Role of MAP kinase in the enhanced cell *Breast Cancer Res Treat* 62:167-175
268. Jernstrom H, Barrett-Connor E (1999) Obesity, weight change, fasting insulin, proinsulin, C-peptide, and insulin-like growth factor-1 levels in women with and without breast cancer: the Rancho Bernardo Study. *J Womens Health Gend Based Med* 8:1265-1272
269. Johansson JO, Larson G, Andersson M, Elmgren A, Hynsjo L, Lindahl A, Lundberg PA, Isaksson OG, Lindstedt S, Bengtsson BA. (1995) Treatment of growth hormone-deficient adults with recombinant human growth hormone increases the concentration of growth hormone in the cerebrospinal fluid and affects neurotransmitters. *Neuroendocrinology* 61:57-66
270. Johnston JA, Kawamura M, Kirken RA, Chen YQ, Blake TB, Shibuya K, Ortaldo JR, McVicar DW, O'Shea JJ (1994) Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature* 370:151-153
271. 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

K

272. Kahan Z, Arencibia J, Csernus V, Groot K, Kineman R, Robinson WR, Schally AV (1999) Expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) messenger ribonucleic acid and the presence of biologically active GHRH in human breast, endometrial and ovarian cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2608-2615
273. Kahan Z, Varga JL, Schally AV, Rekasi Z, Armatis P, Chatzistamou L, Czompoly T, Halmos G (2000) Antagonists of growth hormone-releasing hormone arrest the growth of MDA-MB-468 estrogen-independent human breast cancers in nude mice. *Breast Cancer Res Treat* 60:71-79

274. Kalhan S, Rossi K, Gruca L, Burkett E, O'Brien A (1997) Glucose turnover and gluconeogenesis in human pregnancy. *J Clin Invest* 100:1775-1781
275. Kamegai J, Minami S, Sugihara H, Higuchi H, Wakabayashi I (1994) Growth hormone induces expression of the c-fos gene on hypothalamic neuropeptide-Y and somatostatin neurons in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 135:2765-2771
276. Kamura T, Sato S, Haque D, Liu L, Kaelin WG, Conaway RC, Conaway JW (1998) The elongin BC complex interacts with the conserved SOCS box motif present in members of the SOCS, ras, WD-4-repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev* 12:3872-3881
277. Kanety H, Madjar Y, Dagan Y, Levi J, Papa MZ, Pariente C, Goldwasser B, Karasik A. (1993) Serum insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) is increased and IGFBP-3 is decreased in patients with prostate cancer: correlation with serum prostate-specific antigen. *J Clin Endocrinol Metab* 77:229-233
278. Kao TL, Supowit SC, Thompson EA, Meyer WJ (1992) Immunoreactive growth hormone production by human lymphocyte cell lines. *Cell Mol Neurobiol* 12:483-498
279. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD (1998) Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci, USA* 95:7556-7561
280. Kaplan SL, Grumbach MM, Aubert ML (1976) The ontogenesis of pituitary hormones and hypothalamic factors in the human fetus: maturation of central nervous system regulation of anterior pituitary function. *Recent Prog Horm Res* 32:161-234
281. Karin M, Theill L, Castrillo JL, McCormick A, Brady H (1990) Tissue-specific expression of the growth hormone gene and its control by growth hormone factor-1. *Recent Prog Horm Res* 46:43-58
282. Katakami H, Kato Y, Matsushita N, Shimatsu A, Waseda N, Imura H (1984) Interrelation between somatostatin output from the mediobasal hypothalamus and plasma growth hormone levels in conscious rats: effects of glucagon administration. *Endocrinology* 115:1598-604
283. Kaulsay KK, Mertani HC, Tornell J, Morel G, Lee KO, Lobie PE (1999) Autocrine stimulation of human mammary carcinoma cell proliferation by human growth hormone. *Exp Cell Res* 250:35-50
284. Kaulsay KK, Mertani HC, Lee KO, Lobie PE (2000) Autocrine human growth hormone enhancement of human mammary carcinoma cell spreading is Jak2 dependent. *Endocrinology* 141:1571-1584
285. Kaulsay KK, Zhu T, Bennett W, Lee K, Lobie PE (2001) The effects of autocrine human growth hormone (hGH) on human mammary carcinoma cell behavior are mediated via the hGH receptor. *Endocrinology* 142:767-777
286. Keegan AD, Nelms K, Wang LM, Pierce JH, Paul WE (1994) Interleukin 4 receptor: signaling mechanisms. *Immunol Today* 15:423-432
287. Kelly PA, Posner BI, Tsushima T, Friesen HG (1974) Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: ontogenesis, effects of sex and pregnancy. *Endocrinology* 95:532-539
288. Kember NF (1978) Cell kinetics and the control of growth in long bones. *Cell Tissue Kinet* 11:477-485
289. Keresztes M, Boonstra J (1999) Import(ance) of growth factors in(to) the nucleus. *J Cell Biol* 145:421-424
290. Kern FG, Cheville AL, Liu YL (1990) Growth factor receptors and the progression of breast cancer. *Semin Cancer Biol* 1:317-328

291. Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93:605-615
292. King APJ, Tseng MJ, Logsdon CD, Billestrup N, Carter-Su C (1996) Distinct cytoplasmic domains of the growth hormone receptor are required for glucocorticoid and phorbol ester-induced decreases in growth hormone (GH) binding. *J Biol Chem* 271:18088-18094
293. Kirchhausen T (2000) Clathrin. *Annu Rev Biochem* 69:699-727
294. Kirchhausen T, Bonifacino JS, Riezman H (1997) Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9:488-495
295. Kirpensteijn J, Timmermans-Sprang EP, van Garderen E, Rutteman GR, Lantinga-van Leeuwen IS, Mol JA (2002) Growth hormone gene expression in canine normal growth plates and spontaneous osteosarcoma. *Mol Cell Endocrinol* 197:179-185
296. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285:1-24
297. Kitamura T, Ogorochi T, Miyajima A (1994) Multimeric cytokine receptors. *Trends Endocrinol Metab* 5:8-13
298. Klemke RL, Leng J, Molander R, Brooks PC, Vuori K, Cheresch DA (1998) CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J Cell Biol* 140:961-972
299. Klemke RL, Leng J, Molander R, Brooks PC, Vuori K, Cheresch DA (1998) CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J Cell Biol* 140:961-972
300. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakasato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth hormone-releasing acrylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660
301. Kollé S, Sinowatz F, Boie G, Temmim-Baker L, Lincoln D (1999) Expression of growth hormone receptor in human prostatic carcinoma and hyperplasia. *Int J Oncol* 14:911-916
302. Kononen J, Honkaniemi J, Gustafsson JA, Pelto-Huikko M (1993) Glucocorticoid receptor colocalization with pituitary hormones in the rat pituitary gland. *Mol Cell Endocrinol* 93:97-103
303. Konzak KE, Moore DD (1992) Functional isoforms of Pit-1 generated by alternative messenger RNA splicing. *Mol Endocrinol* 6:241-247
304. Kooijman R, Berus D, Malur A, Delhase M, Hooghe-Peters EL (1997) Human neutrophils express GH-N gene transcripts and the pituitary transcription factor Pit-1b. *Endocrinology* 138:4481-4484
305. Kopchick JJ, Andry JM (2000) Minireview Growth hormone (GH), GH receptor, and Signal transduction. *Mol Genet Metab* 71:293-314
306. Kopchick JJ, Parkinson C, Stevens EC, Trainer PJ (2002) Growth hormone receptor antagonists: discovery, development, and use in patients with acromegaly. *Endocr Rev* 23:623-626
307. Korbonits M, Little JA, Camacho-Hubner C, Trainer PJ, Besser GM, Grossman AB (1996) Insulin-like growth factor I and II in combination inhibit the release of growth hormone-releasing hormone from the rat hypothalamus *in vitro*. *Growth Regul* 6:110-120
308. Krebs DL, Hilton DJ (2000) SOCS: physiologic suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 113:2813-2819
309. Krebs DL, Hilton DJ (2001) SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19:378-387

310. Kuhn ER, Vleurick L, Edery M, Decuypere E, Darras VM (2002) Internalization of the chicken growth hormone receptor complex and its effect on biological functions. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 132:299-308
311. Kurosumi K, Koyama T, Tosaka H (1986) Three types of growth hormone cells of the rat anterior pituitary as revealed by electron microscopy using a colloidal gold antibody method. *Arch Histol Jpn* 49:227-242
312. Kurtz A, Bristol LA, Toth BE, Lazar-Wesley E, Takacs L, Kacsoh B (1993) Mammary epithelial cells of lactating rats express prolactin messenger ribonucleic acid. *Biol Reprod* 48:1095-1103

L

313. Ladas SD, Thalassinos NC, Ioannides G, Raptis SA (1994) Does acromegaly really predispose to an increased prevalence of gastrointestinal tumours? *Clin Endocrinol (Oxf)* 41:597-601
314. Lai ZN, Emtner M, Roos P, Nyberg F (1991) Characterization of putative growth hormone receptors in human choroid plexus. *Brain Res* 546:222-226
315. Lamaze C, Schmid SL (1995) The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr Opin Cell Biol* 7:573-580
316. Lantinga-van Leeuwen IS, Oudshoorn M, Mol JA (1999) Canine mammary growth hormone gene transcription initiates at the pituitary-specific start site in the absence of Pit-1. *Mol Cell Endocrinol* 150:121-128
317. Lantinga-van Leeuwen IS, van Garderen E, Rutteman GR, Mol JA (2000) Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 75:219-228
318. Lawton LN, Bonaldo MF, Jelenc PC, Qiu L, Baumes SA, Marcelino RA, de Jesus GM, Wellington S, Knowles JA, Warburton D, Brown S, Soares MB (1997) Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta. *Gene* 203:17-26
319. Lechan RM, Molitch ME, Jackson IM (1983) Distribution of immunoreactive human growth hormone-like material and thyrotropin-releasing hormone in the rat central nervous system: evidence for their coexistence in the same neurons. *Endocrinology* 112:877-884
320. Lechan RM, Nestler JL, Molitch ME (1981) Immunohistochemical identification of a novel substance with human growth hormone-like immunoreactivity in rat brain. *Endocrinology* 109:1950-1962
321. Lefevre C, Imagawa M, Dana S, Grindlay J, Bodner M, Karin M (1987) Tissue-specific expression of the human growth factor gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. *EMBO J* 6:971-981
322. Lemaigre FP, Lafontaine DA, Courtois SJ, Durviauz SM, Rousseau GG (1990) SP1 can displace GHF-1 from its distal binding site and stimulate transcription from the growth hormone gene promoter. *Mol Cell Biol* 10:1811-1814
323. Leonard WJ, O'Shea JJ (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16:293-322
324. Lesniak MA, Roth J (1976) Regulation of receptor concentration by homologous hormone: effect of human growth hormone on its receptor in IM-9 lymphocytes. *J Biol Chem* 251:3720-3729
325. Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds RG, Collins C, Henzel WJ, Barnard R, Waters MJ, Wood WI (1987) Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 330:537-543

326. Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, Beguinot L, Geiger B, Yarden Y (1998) c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* 12:3663-3674
327. Levy DE, Darnell JE Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:651-62
328. Lewis AJ, Wester TJ, Burrin DG, Dauncey MJ (2000) Exogenous growth hormone induces somatotrophic gene expression in neonatal liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 278:R838-R844
329. Lewis UJ (1984) Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications. *Annu Rev Physiol* 46:33-42
330. Li CH, Dixon JS (1971) Human pituitary growth hormone. XXXII. The primary structure of the hormone: revision. *Arch Biochem Biophys* 146:233-236
331. Li CH, Evans HM (1944) The isolation of pituitary growth hormone. *Science* 99:183-184
332. Li CH, Evans HM, Simpson ME (1945) Isolation and properties of the anterior hypophyseal growth hormone. *J Biol Chem* 159:353-366
333. Li CH, Papkoff H (1956) Preparation and properties of growth hormone from human and monkey pituitary glands. *Science* 124:1293-1294
334. Li JY, Dubois MP, Dubois PM (1977) Somatotrophs in the human fetal anterior pituitary. An electronmicroscopic immunocytological study. *Cell Tissue Res* 181, 4:545-552
335. Li S, Chen S, Xu X, Sundstedt A, Paulsson KM, Anderson P, Karlsson S, Sjogren HO, Wang P (2000) Cytokine-induced Src homology 2 protein (CIS) promotes T cell receptor-mediated proliferation and prolongs survival of activated T cells. *J Exp Med* 19:985-994
336. Liang L, Jiang J, Frank SJ (2000) Insulin receptor substrate-1-mediated enhancement of growth hormone-induced mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 141:3328-3336
337. Liberti JP, Antoni BA, Chlebowski JF (1985) Naturally occurring pituitary growth hormone is phosphorylated. *Biochem Biophys Res Commun* 128:713-714
338. Lin JX, Mietz J, Modi WS, John S, Leonard WJ (1996) Cloning of human Stat5B. Reconstitution of interleukin-2-induced Stat5A and Stat5B DNA binding activity in COS-7 cells. *J Biol Chem* 271:10738-10744
339. Lincoln DT, Water MJ, Breipohl W, Sinowatz F, Lobie PE (1990) Growth hormone receptors expression in the proliferating rat mammary gland. *Acta Histochem Suppl* 40:47-49
340. Lincoln DT, Sinowatz F, el-Hifnawi E, Hughes RL, Waters M (1995) Evidence of a direct role for growth hormone (GH) in mammary gland proliferation and lactation. *Anat Histol Embryol* 24:107-115
341. Lingappa VR, Devillers-Thiery A, Blobel G (1977) Nascent prehormones are intermediates in the biosynthesis of authentic bovine pituitary growth hormone and prolactin. *Proc Natl Acad Sci, USA* 74:2432-2436
342. Linzer DI, Lee SJ, Ogren L, Talamantes F, Nathans D (1985) Identification of proliferin mRNA and protein in mouse placenta. *Proc Natl Acad Sci, USA* 82:4356-4359
343. Lira SA, Kalla KA, Glass CK, Drolet DW, Rosenfeld MG (1993) Synergistic interactions between Pit-1 and other elements are required for effective somatotroph rat growth hormone gene expression in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 7:694-701

344. Lisanti MP, Tang Z, Scherer PE, Kubler E, Koleske AJ, Sargiacomo M (1995) Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation. *Mol Membr Biol* 12:121-124
345. Liu JL, LeRoith D (1999) Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocrinology* 140:5178-5184
346. Liu N, Mertani HC, Norstedt G, Tornell J, Lobie PE (1997) Mode of the autocrine/paracrine mechanism of growth hormone action. *Exp Cell Res* 237:196-206
347. Liu SH, Towler MC, Chen E, Chen CY, Song W, Apodaca G, Brodsky FM (2001) A novel clathrin homolog that co-distributes with cytoskeletal components functions in the trans-Golgi network. *EMBO J* 20:272-284
348. Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrest L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen I (1997) Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* 11:179-186
349. Lloyd RV, Jin L, Tsumanuma I, Vidal S, Kovacs K, Horvath E, Scheithauer BW, Couce ME, Burguera B (2001) Leptin and leptin receptor in anterior pituitary function. *Pituitary* 4:33-47
350. Lobie PE, Breipohl W, Waters MJ (1990a) Growth hormone receptor expression in the rat gastrointestinal tract. *Endocrinology* 126:299-306
351. Lobie PE, Breipohl W, Aragon JG, Waters MJ (1990b) Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. *Endocrinology* 126:2214-2221
352. Lobie PE, Barnard R, Waters MJ (1991) The nuclear growth hormone receptor-binding protein. Antigenic and physicochemical characterization. *J Biol Chem* 266:22645-22652
353. Lobie PE, Garcia-Aragon J, Wang BS, Baumbach WR, Waters MJ (1992) Cellular localization of the growth hormone binding protein in the rat. *Endocrinology* 130:3057-3065
354. Lobie PE, Garcia-Aragon J, Lincoln DT, Barnard R, Wilcox JN, Waters MJ (1993) Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 74:225-233
355. Lobie PE, Wood TJJ, Chen CM, Waters MJ, Norstedt G (1994) Nuclear translocation and anchorage of the growth hormone receptor. *J Biol Chem* 269: 31735-31746
356. Lobie PE, Ronsin B, Silvennoinen O, Haldosen LA, Norstedt G, Morel G (1996) Constitutive nuclear localization of Janus kinases 1 and 2. *Endocrinology* 138:4037-4045
357. Lobie PE, Sadir R, Graichen R, Mertani HC, Morel G (1999) Caveolar internalization of growth hormone. *Exp Cell Res* 246:47-55
358. Locatelli V, Rovati S, Miyoshi H, Muller EE (1984) Growth hormone hyperresponsiveness to human pancreatic growth hormone releasing hormone in streptozotocin-diabetic rats. *Horm Metab Res* 16:507
359. Loveridge N, Farquharson C (1993) Studies on growth plate chondrocytes in situ: cell proliferation and differentiation. *Acta Paediatr* 391:42-48
360. Lytras A, Quan N, Vrontakis ME, Shaw JE, Cattini PA, Friesen HG (1993) Growth hormone expression in human Burkitt lymphoma serum-free Ramos cell line. *Endocrinology* 132:620-628

M

361. MacKenzie S, Fleming I, Houslay MD, Anderson NG, Kilgour E (1997) Growth hormone and phorbol esters require specific protein kinase C isoforms to activate mitogen-activated protein kinases in 3T3-F442A cells. *Biochem J* 324:159-165

362. MacLeod JN, Worsley I, Ray J, Friesen HG, Liebhaber SA, Cooke NE (1991) Human growth hormone-variant is a biologically active somatogen and lactogen. *Endocrinology* 128:1298-1302
363. Maiter D, Koenig JI, Kaplan LM (1991) Sexually dimorphic expression of the growth hormone-releasing hormone gene is not mediated by circulating gonadal hormones in the adult rat. *Endocrinology* 128:1709-1716
364. Maiter D, Underwood LE, Maes M, Ketelslegers JM (1988) Acute Down-regulation of the somatogenic receptors in rat liver by a single injection of growth hormone. *Endocrinology* 122:1291-1296
365. Mandel S, Moreland E, Nichols V, Hanna C, Lafranchi S (1995) Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-binding protein-3, growth hormone (GH)-binding protein, erythrocyte IGF-I receptors, and growth rate during GH treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 80:190-194
366. Marelli M, Lusk CP, Chan H, Aitchison JD, Wozniak RW (2001) A link between the synthesis of nucleoporins and the biogenesis of the nuclear envelope. *J Cell Biol.* 153:709-724
367. Marine JC, McKay C, Wang D, Topham DJ, Parganas E, Nukajima H, Sasaki A, Yoshimura A, Ihle JN (1999) SOCS-3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell* 98:617-627
368. Marks B, Stowell MH, Vallis Y, Mills IG, Gibson A, Hopkins CR, McMahon HT (2001) GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* 410:231-235
369. Martial JA, Hallewell RA, Baxter JD, Goodman HM (1979) Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science* 205:602-607
370. Martin FC, Yeo AL, Sonksen PH (1997) Growth hormone secretion in the elderly: ageing and the somatopause. *J Clin Endocrinol Metab* 11:223-250
371. Martinoli MG, Ouellet J, Rheaume E, Pelletier G (1991) Growth hormone and somatostatin gene expression in adult and aging rats as measured by quantitative in situ hybridization. *Neuroendocrinology* 54:607-615
372. Martul P, Pineda J, Dieguez C, Casanueva FF (1992) Corticoid-induced growth hormone (GH) secretion in GH-deficient and normal children. *J Clin Endocrinol Metab* 75:536-539
373. Matsubara S, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Takahara J (1995) Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology* 136:4147-4150
374. Matsumoto A, Seki Y, Kubo M, Ohtsuka S, Suzuki R, Hayashi I, Tsuji K, Nakahata T, Okabe M, Yamada S, Yoshimura A (1999) Suppression of STAT5 function in liver, mammary glands and T-Cells in cytokine inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* 19:6396-6407
375. Mattaj IW, Englmeier L (1998) Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67:265-306
376. Matuoka K, Miki H, Takahashi K, Takenawa T (1997) A novel ligand for an SH3 domain of the adaptor protein Nck bears an SH2 domain and nuclear signaling motifs. *Biochem Biophys Res Commun* 239:488-492
377. Mayo KE (1990) Molecular cloning and expression of a pituitary specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 6:1734-1744
378. McBride KM, Banninger G, McDonald C, Reich NC (2002) Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *EMBO J* 21:1754-1763

379. McBride KM, McDonald C, Reich NC (2000) Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J* 19:6196-6206
380. Meacham LR, Brown MR, Murphy TL, Keret R, Silbergeld A, Laron Z, Parks JS (1993) Characterization of a noncontiguous gene deletion of the growth hormone receptor in Laron's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1379-83
381. Melmed S (1984) Insulin suppresses growth hormone secretion by rat pituitary cells. *J Clin Invest* 73:1425-1433
382. Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD (1996) Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84:431-442
383. Mertani HC, Waters MJ, Jambou R, Gossard F, Morel G (1994) Growth hormone receptor binding protein in rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 59:483-494
384. Mertani HC, Morel G (1995) In situ gene expression of growth hormone (GH) receptor and GH binding protein in adult male rat tissues. *Mol Cell Endocrinol* 109:47-61
385. Mertani HC, Pechoux C, Garcia-Caballero T, Waters MJ, Morel G (1995) Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the human anterior pituitary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3361-3367
386. Mertani HC, Garcia-Caballero T, Lambert A, Gerard F, Palayer C, Boutin JM, Vonderhaar BK, Waters MJ, Lobie PE, Morel G (1998) Cellular expression of growth hormone and prolactin receptors in human breast disorders. *Int J Cancer* 79:202-211
387. Mertani HC, Morel G, Lobie PE (1999) Cytoplasmic and nuclear cytokine receptor complexes. *Vitam Horm* 57:79-121
388. Mertani HC, Zhu T, Goh EL, Lee KO, Morel G, Lobie PE (2001) Autocrine human growth hormone (hGH) regulation of human mammary carcinoma cell gene expression. Identification of CHOP as a mediator of hGH-stimulated human mammary carcinoma cell survival. *J Biol Chem* 276:21464-21475
389. Metcalf D, Greenhalgh CJ, Viney E, Willson TA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS (2000) Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature* 404:1069-1073
390. Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM (1996) Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 379:645-648
391. Meyer DJ, Campbell GS, Cochran BH, Argetsinger LS, Larner AC, Finbloom DS, Carter-Su C, Schwartz J (1994) Growth hormone induces a DNA binding factor related to the interferon-stimulated 91-kDa transcription factor. *J Biol Chem* 269:4701-4704
392. Miller WL, Eberhardt NL (1983) Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr Rev* 4:97-130
393. Miller WL, Martial JA, Baxter JD (1980) Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J Biol Chem* 255:7521-7524
394. Minami S, Kamegai J, Hasegawa O, Sugihara H, Okada K, Wakabayashi I (1993) Expression of growth hormone receptor gene in rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 5:691-696
395. Misdorp W (1988) Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Vet Q* 10:26-33

396. Mitra I (1984) Somatomedins and proteolytic bioactivation of prolactin and growth hormone. *Cell* 38:347-348
397. Mizobuchi M, Downs TR, Frohman LA (1995) Growth hormone-releasing hormone immunoreactivity in mouse placenta, maternal blood, and amniotic fluid: molecular characterization and secretion from primary cell cultures in vitro. *Endocrinology* 136:1731-1736
398. Mol JA, Henzen-Logmans SC, Hageman P, Misdorp W, Blankenstein MA, Rijnberk A (1995a) Expression of the gene encoding growth hormone in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3094-3096
399. Mol JA, van Garderen E, Selman PJ, Wolfswinkel J, Rijnberk A, Rutteman GR (1995b) Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats. *J Clin Invest* 95:2028-2034
400. Mol JA, van Garderen E, Rutteman GR, Rijnberk A (1996) New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57:67-71
401. Montero M, Yon L, Kikuyama S, Dufour S, Vaudry H (2000) Molecular evolution of the growth hormone-releasing hormone / pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene family. Functional implication in the regulation of growth hormone secretion. *J Mol Endocrinol* 25:157-168
402. Moore DD, Marks AR, Buckley DI, Kapler G, Payvar F, Goodman HM (1985) The first intron of the human growth hormone gene contains a binding site for glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci, USA* 82:699-702
403. Moore MS (1998) Ran and nuclear transport. *J Biol Chem* 273:22857-22860
404. Morel A, Nicolas P, Cohen P (1985) Evidence for a predominant form of Mr = 15,000 prosomatostatin in the mouse hypothalamus. Relationship with somatostatin-14 and -28. *J Biol Chem* 258:8273-8276
405. Morel G, Chavassieux P, Barenton B, Dubois PM, Meunier PJ, Boivin G (1993) Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. *Cell Tissue Res* 273:279-286
406. Morel G, Dihl F, Gossard F (1989) Ultrastructural distribution of growth hormone (GH) mRNA and GH intron I sequences in rat pituitary gland: effects of GH-releasing factor and somatostatin. *Mol Cell Endocrinol*, 65:81-90
407. Morikawa M, Nixon T, Green H (1982) Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell* 29:783-789
408. Mueller H, Flury N, Eppenberger-Castori S, Kueng W, David F, Eppenberger U (2000) Potential prognostic value of mitogen-activated protein kinase activity for disease-free survival of primary breast cancer patients. *Int J Cancer* 89:384-388
409. Mullis PE, Lund T, Patel MS, Brook CG, Brickell PM (1991) Regulation of human growth hormone receptor gene expression by human growth hormone in a human hepatoma cell line. *Mol Cell Endocrinol* 76:125-133
410. Mullis PE, Wagner JK, Eble A, Nuoffer JM, Postel-Vinay MC (1997) Regulation of human growth hormone receptor gene transcription by human growth hormone binding protein. *Mol Cell Endocrinol* 131:89-96
411. Mullis PE, O'Donovan N, Eble A, Marti U, Diem P, Burgi U, Peter HJ (2000) Growth hormone regulates growth hormone receptor gene transcription in primary human thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* 166:111-119
412. Murphy LJ, Lazarus L (1984) The mouse fibroblast growth hormone receptor: ligand processing and receptor modulation and turnover. *Endocrinology* 115:1625-1632

413. Murphy D, Pardy K, Seah V, Carter D (1992) Post-transcriptional regulation of rat growth hormone gene expression: increased message stability and nuclear polyadenylation accompany thyroid hormone depletion. *Mol Cell Biol* 12:2624-2632
414. Muruais C, Cordido F, Morales MJ, Casanueva FF, Dieguez C (1991) Corticosteroid-induced growth hormone secretion in normal and obese subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 35:485-490
415. Musgrove EA, Hui R, Sweeney KJ, Watts CK, Sutherland RL (1996) Cyclins and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1:153-162
416. Myers MG Jr, White MF (1996) Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:615-658

N

417. Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387:924-929
418. Nakamoto JM, Gertner JM, Press CM, Hintz RI, Rosenfeld RG, Genel M (1986) Suppression of the growth hormone (GH) response to clonidine and GH-releasing hormone by exogenous GH. *J Clin Endocrinol Metab* 62:822-826
419. Namba H, Morita S, Melmed S (1989) Insulin-like growth factor-I action on growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels: interaction with somatostatin. *Endocrinology* 124:1794-1799
420. Narayan P, Towle HC. (1985) Stabilization of a specific nuclear mRNA precursor by thyroid hormone. *Mol Cell Biol* 5:2642-2646
421. Narazaki M, Fujimoto M, Matsumoto T, Morita Y, Saito H, Kajita T, Yoshizaki K, Naka T, Kishimoto T (1998) Three distinct domains of SSI/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin-6 signaling. *Proc Natl Acad Sci, USA* 95:13130-13134
422. Newmyer SL, Schmid SL (2001) Dominant-interfering Hsc70 mutants disrupt multiple stages of the clathrin-coated vesicle cycle in vivo. *J Cell Biol* 152:607-620
423. Ng ST, Zhou J, Adesanya OO, Wang J, LeRoith D, Bondy CA (1997) Growth hormone treatment induces mammary gland hyperplasia in aging primates. *Nat Med* 3:1141-1144
424. Nguyen AP, Chandorkar A, Gupta C (1996) The role of growth hormone in fetal mouse reproductive tract differentiation. *Endocrinology* 137:3659-3666
425. Niall HD, Hogan ML, Sauer R, Rosenblum IY, Greenwood FC (1971) Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene replication. *Proc Natl Acad Sci, USA* 68:866-869
426. Nicholson SE, Willson TA, Farley Y, Starr R, Zhang JG, Baca M, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA (1999) Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *EMBO J* 18:375-385
427. Nicholson SE, De Souza D, Fabri IJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG, Silva A, Asimakia M, Farley A, Nash AD, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M (2000) Suppressor of signaling-3 preferentially binds to the SHP-2 binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci, USA* 97:6493-6498
428. Nicola NA (1994) Cytokine pleiotropy and redundancy: a view from the receptor. *Stem Cells* 1:3-12
429. Nicola NA, Greenhalgh CJ (2000) The suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins: important feedback inhibitors of cytokine action. *Exp Haematol* 28:1105-1112

430. Nicoll CS, Mayer GL, Russell SM (1986) Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocr Rev* 7:169-203
431. Nilsson A, Carlsson B, Mathews L, Isaksson OG (1990) Growth hormone regulation of the growth hormone receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes. *Mol Cell Endocrinol* 70:237-246
432. Nishio H, Otsuka M, Kinoshita S, Tokuoka T, Nakajima M, Noda Y, Fukuyama Y, Suzuki K (2002) Phosphorylation of c-Cbl protooncogene product following ethanol administration in rat cerebellum: possible involvement of Fyn kinase. *Brain Res* 950:203-209
433. Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H (2002) Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 21:2000-2008
434. Nogami H, Suzuki K, Enomoto H, Ishikawa H (1989) Studies on the development of growth hormone and prolactin cells in the rat pituitary gland by *in situ* hybridization. *Cell Tissue Res* 255:23-29
435. Noteborn HP, van Balen PP, van der Gugten AA, Hart IC, Ebels I, Salemink CA (1993) Presence of immunoreactive growth hormone and prolactin in the ovine pineal gland. *J Pineal Res* 14:11-22
436. Nuoffer JM, Flück C, Deladoëy J, Eblé A, Dattani MT, Mullis PE (2000) Regulation of human GH receptor gene transcription by 20 and 22 kDa GH in a human hepatoma cell line. *J Endocrinol* 165:313-320
437. Nyberg F, Burman P (1996) Growth hormone and its receptors in the central nervous system-location and functional significance. *Horm Res* 45:18-22

O

438. Ogueta S, Olazabal I, Santos I, Delgado-Baeza E, Garcia-Ruiz JP (2000) Transgenic mice expressing bovine GH develop arthritic disorder and self-antibodies. *J Endocrinol* 165:321-328
439. Ohtani T, Ishihara K, atsumi T, Nishida K, Kaneko Y, Miyata T, Itoh S, Narimatsu M, Maeda H, Fukada T, Itoh M, Okano H, Hibi M, Hirano T (2000) Dissection of signaling cascades through gp130 *in vivo*: reciprocal roles of STAT3- and SHP2-mediated signals in immune response. *Immunity* 12:95-105
440. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane *J Biol Chem* 273:5419-5422
441. O'Neal KD, Yu-Lee LY (1993) The proline-rich motif (PRM): a novel feature of the cytokine/hematopoietin receptor superfamily. *Lymphokine Cytokine Res* 12:309-312
442. Ono M, Takayama Y, Rand-Weaver M, Sakata S, Yasunuga T, Noso T, Kawauchi H (1990) cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin. *Proc Natl Acad Sci, USA* 87:4330-4334
443. Orme SM, McNally RJ, Cartwright RA, Belchetz PE (1998) Mortality and cancer incidence in acromegaly: a retrospective cohort study. United Kingdom Acromegaly Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2730-2734
444. Oved S, Yarden Y (2002) Signal transduction: molecular ticket to enter cells. *Nature* 416:133-136

P

445. Page GS, Smith S, Goodman HM (1981) Sequence of the rat growth hormone gene: location of the 5' terminus of the growth hormone mRNA and identification of an internal transposon-like element. *Nucleic Acids Res* 9:2087-2104

446. Pagesy P, Li JY, rentier-Delrue F, Le Bouc Y, Martial JA, Peillon F (1989) Evidence of pre-prosomatostatin mRNA in human normal and tumoral anterior pituitary gland. *Mol Endocrinol* 3:1289-1294
447. Paik S, Hazan R, Fisher ER, Sass RE, Fisher B, Redmond C, Schlessinger J, Lippman ME, King CR (1990) Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 8:103-112
448. Palade GE (1953) Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* 24:1424
449. Paladini AC, Pena C, Poskus E (1983) Molecular biology of growth hormone. *Crit Rev Biochem* 15:25-26
450. Palomino T, Baretino D, Aranda A (1998) Role of GHF-1 in the regulation of the rat growth hormone gene promoter by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *J Biol Chem* 273:27541-27542
451. Pankov YA (1999) Growth hormone and a partial mediator of its biological action, insulin-like growth factor I. *Biochemistry (Mosc)* 64:1-7
452. Pantaleon M, Harvey MB, Barnard R, Waters MJ, Kaye PL (1997) Functional GH receptors and GH are expressed by preimplantation mouse embryos: A role for GH in early embryogenesis? *Proc Natl Acad Sci, USA* 94:5125-5130
453. Park DS, Lee H, Frank PG, Razani B, Nguyen AV, Parlow AF, Russell RG, Hult J, Pestell RG, Lisanti MP (2002) Caveolin-1-deficient mice show accelerated mammary gland development during pregnancy, premature lactation, and hyperactivation of the Jak-2/STAT5a signaling cascade. *Mol Biol Cell* 13:3416-3430
454. Park SH, Liu X, Hennighausen L, Davey HW, Waxman DJ (1999) Distinctive roles of STAT5a and STAT5b in sexual dimorphism of hepatic P450 gene expression. Impact of STAT5a gene disruption. *J Biol Chem* 274:7421-7430
455. Parker ML, Hammonds JM, Daughaday WH (1967) The arginin-provocative test: an aid in the diagnosis of hyposomatotropinism. *J Clin Endocrinol Metab* 27:1129-1136
456. Patel N, Alsat E, Igout A, Baron F, Hennen G, Porquet D, Evain-Brion D (1995) Glucose inhibits human placental GH secretion in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1743-1746
457. Pearse BM (1975) Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J Mol Biol* 97:93-98
458. Peeters S, Friesen HG (1977) A growth hormone-binding factor in the serum of pregnant mice. *Endocrinology* 101:1164-1184
459. Pellegrini E, Bluet-Pajot MT, Mounier F, Bennett P, Kordon C, Epelbaum J (1996) Central administration of a growth hormone (GH) receptor mRNA antisense increases GH pulsatility and decreases hypothalamic somatostatin expression in rats. *J Neurosci* 16:8140-8148
460. Penn LJ, Brooks MW, Laufer EM, Land H (1990) Negative autoregulation of c-myc transcription. *EMBO J* 9:1113-1121
461. Perez FM, Rose JC, Schwartz J (1995) Anterior pituitary cells: getting to know their neighbors. *Mol Cell Endocrinol* 111:C1-6
462. Petrelli A, Gilestro GF, Lanzardo S, Comoglio PM, Migone N, Giordano S (2002) The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* 416:187-190

463. Petridou E, Dessypris N, Spanos E, Mantzoros C, Skalkidou A, Kalmanti M, Kolioukas D, Kosmidis H, Panagiotou JP, Piperopoulou F, Tzortzotou F, Trichopoulos D (1999) Insulin-like growth factor-I and binding protein-3 in relation to childhood leukaemia. *Int J Cancer* 80:494-496
464. Pike MC, Spicer DV, Dahmouh L, Press MF (1993) Estrogens, progestagens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15:17-35
465. Popovic V, Damjanovic S, Micic D, Manojlovic D, Micic J, Casanueva FF (1993) Modulation by glucocorticoids of growth hormone secretion in patients with different pituitary tumors. *Neuroendocrinology* 8:465-72.
466. Popovic V, Damjanovic S, Micic D, Nesovic M, Djurovic M, Petakov M, Obradovic S, Zoric S, Simic M, Penezic Z, Marinkovic J (1998) Increased incidence of neoplasia in patients with pituitary adenomas. The Pituitary Study Group. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49:441-445
467. Popovic V, Damjanovic S, Dieguez C, Casanueva FF (2001) Leptin and the pituitary. *Pituitary* 4:7-14
468. Posner BI, Patel B, Vezinhet A, Charrier J (1980) pituitary-dependent growth hormone receptors in rabbit and sheep liver. *Endocrinology* 107:1954-1958
469. Postel-Vinay MC, Kayser C, Desbuquois B (1982) Fate of injected human growth hormone in the female rat liver in vivo. *Endocrinology* 111:244-251
470. Postel-Vinay MC, Tar A, Hocquette JF, Clot JP, Fontoura M, Brauner R, Rappaport R (1991) Human plasma growth hormone (GH) binding proteins are regulated by GH and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 73:197-202
471. Pradhananga S, Wilkinson I, Ross RJ (2002) Pegvisomant: structure and function. *J Mol Endocrinol* 29:11-14
472. Press M, Tamborlane WV, Thorner MO, Rivier J, Gertner JM, Sherwin RS (1984) Pituitary response to growth hormone-releasing factor in diabetes. Failure of glucose-mediated suppression. *Diabetes* 33:804-806

R

473. Ram PA, Waxman DJ (1997) Interaction of growth hormone-activated STATs with SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1 and nuclear JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem* 272:17694-17702
474. Ram PA, Waxman DJ (1999) SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 274:35553-35561
475. Ram PA, Waxman DJ (2000) Role of the cytokine-inducible SH2 protein CIS in desensitization of STAT5b signalling by continuous growth hormone. *J Biol Chem* 275:39487-39496
476. Ramsey MM, Ingram RL, Cashion AB, Ng AH, Cline JM, Parlow AF, Sonntag WE (2002) Growth hormone-deficient dwarf animals are resistant to dimethylbenzanthracene (DMBA)-induced mammary carcinogenesis. *Endocrinology* 143:4139-4142
477. Rand-Weaver M, Kawauchi H, Ono M (1993) Evolution of the structure of growth hormone and prolactin family. In: Schreibman MP, Scanes CG and Pang PKT (eds) *The endocrinology of Growth, Development and Metabolism in vertebrates*. Academic Press Inc., New York, pp 13-42
478. Rapaport E (1995) Involvement of Elevated Intracellular and Extracellular ATP in the Regulation of Insulin Secretion: Therapeutic Targets in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Am J Ther* 2:283-289

479. Rauch C, Li JY, Croissandeau G, Berthet M, Peillon F, Pagesy P (1995) Characterization and localization of an immunoreactive growth hormone-releasing hormone precursor form in normal and tumoral human anterior pituitaries. *Endocrinology* 136:2594-2601
480. Reiter E, Bonnet P, Sente B, Dombrowicz D, de Leval J, Closset J, Hennen G (1992) Growth hormone and prolactin stimulate androgen receptor, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor levels in the prostate of immature rats. *Mol Cell Endocrinol* 88:77-87
481. Rekasi Z, Czompoly T, Schally AV, Halmos G (2000) Isolation and sequencing of cDNAs for splice variants of growth hormone-releasing hormone receptors from human cancers. *Proc Natl Acad Sci, USA* 97:10561-10566
482. Rene E, Willoughby J, Brazeau P (1982) Differentiation between the somatostatin inhibition and the post-somatostatin rebound observed on growth hormone secretion in vitro. *Regul Pept* 4:325-331
483. Ridderstrale M, Degerman E, Tornqvist H (1995) Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in primary adipocytes. *J Biol Chem* 270:3471-3474
484. Rieutort M (1974) Pituitary content and plasma levels of growth hormone in fetal and weanling rats. *J Endocrinol* 60:261-268
485. Rui L, Mathews LS, Hotta K, Gustafson TA, Carter-Su C (1997) Identification of SH2-Bbeta as a substrate of the tyrosine kinase JAK2 involved in growth hormone signaling. *Mol Cell Biol* 17:6633-6644
486. Rui L, Herrington J, Carter-Su C (1999) SH2-B, a membrane-associated adapter, is phosphorylated on multiple serines/threonines in response to nerve growth factor by kinases within the MEK/ERK cascade. *J Biol Chem* 274:26485-26492
487. Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W (1982) Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumor. *Nature* 300:276-278
488. Robben JH, Visser-Wisselaar HA, Rutteman GR, van Rijk PP, van Dongen AJ, Voorhout G, van den Ingh TS, Hofland LJ, Lamberts SW (1997) In vitro and in vivo detection of functional somatostatin receptors in canine insulinomas. *J Nucl Med* 38:1036-1042
489. Robben JH, Van Garderen E, Mol JA, Wolfswinkel J, Rijnberk A (2002) Locally produced growth hormone in canine insulinomas. *Mol Cell Endocrinol* 197:187-195
490. Roby KF, Deb S, Gibori G, Szpirer C, Levan G, Kwok SC, Soares MJ (1993) Decidual prolactin-related protein: Identification, molecular cloning and characterization. *J Biol Chem* 268:3136-3142
491. Romero F, Ramos-Morales F, Dominguez A, Rios RM, Schweighoffer F, Tocque B, Pintor-Toro JA, Fischer S, Tortolero M (1998) Grb2 and its apoptotic isoform Grb3-3 associate with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C, and these interactions are modulated by poly(U) RNA. *J Biol Chem* 273:7776-7781.
492. Ron E, Gridley G, Hrubec Z, Page W, Arora S, Fraumeni JF Jr (1991) Acromegaly and gastrointestinal cancer. *Cancer* 68:1673-1677
493. Rosenfeld RG, Rosenbloom AL, Guevara-Aguirre J (1994) Growth hormone (GH) insensitivity due to primary GH receptor deficiency. *Endocr Rev* 15:369-390
494. Roupas P, Herington AC (1987) Receptor-mediated endocytosis and degradative processing of growth hormone by rat adipocytes in primary culture. *Endocrinology* 120:2158-2165
495. Roupas P, Herington AC 1989 Cellular mechanisms in the processing of growth hormone and its receptor. *Mol Cell Endocrinol* 61:1-12

496. Rousseau GG (1992) Growth hormone gene regulation by *trans*-acting factors. *Horm Res* 37:88-92
497. Rout MP, Aitchison JD (2001) The nuclear pore complex as a transport machine. *J Biol Chem* 276:16593-16596
498. Rout MP, Aitchison JD, Suprpto A, Hjertaas K, Zhao Y, Chait BT (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* 148:635-651
499. Rowlinson SW, Behncken SN, Rowland JE, Clarkson RW, Strasburger CJ, Wu Z, Baumbach W, Waters MJ (1998) Activation of chimeric and full-length growth hormone receptors by growth hormone receptor monoclonal antibodies. A specific conformational change may be required for full-length. *J Biol Chem* 273:5307-5314
500. Russo IH, Russo J (1998) Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:49-61
501. Rutteman GR (1992) Contraceptive steroids and the mammary gland: is there a hazard? -Insights from animal studies. *Breast Cancer Res Treat* 23:29-41
502. Ryan KJ, Wentz SR (2000) The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 12:361-371

S

503. Sachse M, van Kerkhof P, Strous GJ, Klumperman J (2001) The ubiquitin-dependent endocytosis motif is required for efficient incorporation of growth hormone receptor in clathrin-coated pits, but not clathrin-coated lattices. *J Cell Sci* 114:3943-3952
504. Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O (2000) Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 20:3387-3395
505. Salh B, Marotta A, Matthewson C, Ahluwalia M, Flint J, Owen D, Pelech S (1999) Investigation of the Mek-MAP kinase-Rsk pathway in human breast cancer. *Anticancer Res* 19:731-740
506. Salvatori R, Fan X, Mullis PE, haile A, Levine MA (2002) Decreased expression of the GHGH receptor gene due to a mutation in a Pit-1 binding site. *Mol Endocrinol* 16:450-458
507. Samuels HH, Aranda A, Casanova J, Copp RP, Flug F, Forman BM, Horowitz ZD, Janocko L, Park HY, Pascual A (1988) Identification of the cis-acting elements and trans-acting factors that mediate cell-specific and thyroid hormone stimulation of growth hormone gene expression. *Recent Prog Horm Res* 44:53-114
508. Sanchez-Pacheco A, Pena P, Palomino T, Guell A, Castrillo JL, Aranda A (1998) The transcription factor GHF-1, but not the splice variant GHF-2, cooperates with thyroid hormone and retinoic acid receptors to stimulate rat growth hormone gene expression. *FEBS Lett* 422:103-107
509. Santen RJ, Song RX, McPherson R, Kumar R, Adam L, Jeng MH, Yue W (2002) The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80:239-256
510. Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A (2000) CIS/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signalling by binding to the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem* 275:29338-29347
511. 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

512. Schally AV (1999) LH-RH analogues: I. Their impact on reproductive medicine. *Gynecol Endocrinol* 13:401-409
513. Schally AV, Comaru-Schally AM, Nagy A, Kovacs M, Szepeshazi K, Plonovski A, Varga JL, Halmos G (2001) Hypothalamic hormones and cancer. *Front Neuroendocrinol* 22:248-291
514. Schepper JM, Hughes EF, Postel-Vinay MC, Hughes JP (1984) Cleavage of growth hormone by rabbit liver plasmalemma enhances binding. *J Biol Chem* 259:12945-12948
515. Schindler C, Strehlow I (2000) Cytokines and STAT signaling. *Adv Pharmacol* 47:113-174
516. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ (1999) Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 71:435-478
517. Schlechter NL, Russell SM, Spencer EM, Nicoll CS (1986) Evidence suggesting that the direct growth-promoting effect of growth hormone on cartilage in vivo is mediated by local production of somatomedin. *Proc Natl Acad Sci, USA* 83:7932-7934
518. Schlegel A, Lisanti MP (2001) Caveolae and their coat proteins, the caveolins: from electron microscopic novelty to biological launching pad. *J Cell Physiol* 186:329-337
519. Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F (2000) SOCS-3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* 275:12848-12856
520. Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 127:1217-1232
521. Schwartz J, Gracia-Navarro F (1996) Ain't misbehavin': reflections on the functional differences among anterior pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* 123:1-6
522. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kujper JL, Foster D, Lasser G, Prunkard DE, Porte D, Woods SC, Seeley RJ, Weigle DS (1996) Specificity of leptin action on elevated blood-glucose levels and hypothalamic neuropeptide-Y gene-expression in ob/ob mice. *Diabetes* 45:531-535
523. Seeburg PH, Shine J, Martial JA, Baxter JD, Goodman HM (1977) Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. *Nature* 270:486-494
524. Seeburg PH, Sias S, Adelman J, de Boer HA, Hayflick J, Jhurani P, Goeddel DV, Heyneker HL (1983) Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones *DNA* 2:37-45
525. Sekimoto T, Imamoto N, Nakajima K, Hirano T, Yoneda Y (1997) Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO J* 16:7067-7077
526. Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, Rijnberk A (1994) Progestin treatment in the dog. II. Effects on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Eur J Endocrinol* 131:422-430
527. Serel TA, Kecelioglu M (2000) Serum insulin-like growth factor is not a useful marker of prostate cancer. *BJU Int* 85:559-560
528. Seto ES, Bellen HJ, Lloyd TE (2002) When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes Dev* 16:1314-1336
529. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-1111

530. Sherr CJ (1995) Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc Assoc Am Physicians* 107:181-186
531. Shibasaki T, Hotta M, Masuda A, Imaki T, Obara N, Demura H, Ling N, Shizume K (1985) Plasma GH response to GHRH and insulin-induced hypoglycemia in man. *J Clin Endocrinol Metab* 60:1265-1267
532. Shuai K (1999) The STAT family of proteins in cytokine signaling. *Prog Biophys Mol Biol* 1:405-422
533. Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL (1996) Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 13:247-254
534. Shuto Y, Nakano T, Sanno N, Domoto H, Sugihara H, Wakabayashi I (1999) Reduced growth hormone receptor messenger ribonucleic acid in an aged man with chronic malnutrition and growth hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2320-2323
535. Silva CM, Day RN, Weber MJ, Thorner MO (1993) Human growth hormone (GH) receptor is characterized as the 134-kilodalton tyrosine-phosphorylated protein activated by GH treatment in IM-9 cells. *Endocrinology* 133:2307-2312
536. Simionescu N, Siminoescu M, Palade GE (1975) Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J Cell Biol* 64:586-607
537. Sinha YN, Gilligan TA (1984) A « 20K » form of growth hormone in the murine pituitary gland. *Proc Soc Exp Biol Med* 177:465-474
538. Sinha YN, Lewis UJ (1986) A lectin-binding immunoassay indicates a possible glycosylated growth hormone in the human pituitary gland. *Biochem Biophys Res Commun* 140:491-497
539. Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H (2002) Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 21:2000-2008
540. Sivaraman VS, Wang H, Nuovo GJ, Malbon CC (1997) Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest* 99:1478-1483
541. Slater EP, Rabenau O, Karin M, Baxter JD, Beato M (1985) Glucocorticoid receptor binding and activation of a heterologous promoter by dexamethasone by the first intron of the human growth hormone gene. *Mol Cell Biol* 5:2984-2992
542. Smal J, De Meyts P (1987) Role of kinase C in the insulin-like effects of human growth hormone in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 147:1232-1240
543. Smit LS, Meyer DJ, Billestrup N, Norstedt G, Schwartz J, Carter-Su C (1996) The role of the growth hormone (GH) receptor and JAK1 and JAK2 kinases in the activation of Stats 1, 3, and 5 by GH. *Mol Endocrinol* 10:519-533
544. Smit LS, Meyer DJ, Argetsinger LS, Schwartz J, Carter-Su C (1999) Molecular events in growth hormone-receptor interaction and signaling. In: Hormonal control of growth. Kostyo JL and Goodman HM (eds). Handbook of physiology volume V. Oxford university press, New York, Oxford, 445-480
545. Smith PE (1927) The disabilities caused by hypophysectomy and their repair *J Am Med Assoc* 88:158-161
546. Sonksen P, Jacobs H, Orme S, Belchetz P (1997) Acromegaly and colonic cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* 47:647-648
547. Sotiropoulos A, Moutoussamy S, Binart N, Kelly PA, Finidori J (1995) The membrane proximal region of the cytoplasmic domain of the growth hormone receptor is involved in the activation of Stat 3. *FEBS Lett* 369:169-172

548. Sotiropoulos A, Perrot-Appianat M, Dinerstein H, Pallier A, Postel-Vinay MC, Finidori J, Kelly PA (1994) Distinct cytoplasmic regions of the growth hormone receptor are required for activation of JAK2, mitogen-activated protein kinase, and transcription. *Endocrinology* 135:1292-1298
549. Soto JL, Castrillo JL, Dominguez F, Dieguez C (1995) Regulation of the pituitary specific transcription factor GHF-1/Pit-1 messenger ribonucleic acid levels by growth hormone-secretagogues in rat anterior pituitary cells in monolayer culture. *Endocrinology* 136:3863-3870
550. Soubeyran P, Kowanetz K, Szymkiewicz I, Langdon WY, Dikic I (2002) Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* 416:183-187
551. Spencer SA, Hammonds RG, Henzel WJ, Rodriguez H, Waters MJ, Wood WI (1988) Rabbit liver growth hormone receptor and serum binding protein: purification, characterization, and sequence. *J Biol Chem* 263:7862-7667
552. Stachura ME, Costoff A, Tyler JM (1986) Structural correlates of stimulated and inhibited secretion: electron microscopic observations of somatotrophs in perfused rat pituitary. *Neuroendocrinology* 42:383-391
553. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. *Nature* 387:917-921
554. Starr R, Metcalf D, Elephanty AG, Brysha M, Willson TA, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS (1998) Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signalling. *Proc Natl Acad Sci, USA* 95:14395-14399
555. Stenmark H, Zerial M (2001) Molecular mechanisms of membrane fusion in the endocytic pathway. In *Frontiers in molecular biology* (ed. M. Marsh) Oxford University Press, New York, NY, pp. 94-110
556. Stephanou A, Knight RA, Lightman SL (1991) Production of a growth hormone-releasing hormone-like peptide and its mRNA by human lymphocytes. *Neuroendocrinology* 53:628-633
557. Strauss DS, Takemoto CD (1990) Effect of fasting on Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and growth hormone receptor mRNA levels and IGF-I gene transcription in rat liver. *Mol Endocrinol* 4:91-100
558. Strobl JS, Thomas MJ (1994) Human Growth hormone. *Pharmacol Rev* 46:1-34
559. Strous GJ, Van Kerkhof P (2001) The ubiquitin-proteasome pathway regulates lysosomal degradation of the growth hormone receptor and its ligand. *Biochem Soc Transactions* 29:488-493
560. Strous GJ, van Kerkhof P, Govers R, Rotwein P, Schwartz AL (1997) Growth hormone-induced signal transduction depends on an intact ubiquitin system. *J Biol Chem* 272:40-43
561. Struthers RS, Gaddy-Kurten D, Vale WW (1992) Activin inhibits binding of transcription factor Pit-1 to the growth hormone promoter. *Proc Natl Acad Sci, USA* 89:11451-11455
562. Sugase T, Nonaka K, Yoshida T, Morishita S, Toyoshima H, Tarui S, Shima K (1976) Comparison of the changes in plasma human growth hormone (hGH) and immuno-reactive glucagon (IRG) after intravenous and subcutaneous injection of glucagon. *Endocrinol Jpn* 23:187-93
563. Sugihara H, Minami S, Okada K, Kamegai J, Hasegawa O, Wakabayashi I (1993) Somatostatin reduces transcription of the growth hormone gene in rats. *Endocrinology* 132:1225-1229
564. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG Jr, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF (1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377:173-177
565. Sussman PM, Tushinski RJ, Bancroft RC (1976) Pregrowth hormone: product of the translation in vitro of messenger RNA coding for growth hormone. *Proc Natl Acad Sci, USA* 73:29-33

566. Swanlund DJ, N'Diaye MR, Loseth KJ, Pryor JL, Crabo BG (1995) Diverse testicular responses to exogenous growth hormone and follicle-stimulating hormone in prepubertal boars. *Biol Reprod* 53:749-757
567. Swanson SM, Unterman TG (2002) The growth hormone-deficient Spontaneous Dwarf rat is resistant to chemically induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 23:977-982

T

568. Takano K, Hizuka N, Shizume K, Hirose N, Ling N (1984) Plasma growth hormone secretion during constant growth hormone-releasing factor infusion. *Endocrinol Jpn* 31:681-685
569. Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, Akira S (1998) Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol* 161:4652-4660
570. Talamantes F (1994) The structure and regulation of expression of the mouse growth hormone receptors and binding protein. *Proc Soc Exp Biol Med* 206:254-256
571. Tan M, Wang Y, Guan K, Sun Y (2000) PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci, USA* 97:109-114
572. Taniguchi T (1995) Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268:251-255
573. Tannenbaum GS (1993) Genesis of episodic growth hormone secretion. *J Pediatr Endocrinol* 6:273-282
574. Tannenbaum GS (1994) Multiple levels of cross-talk between somatostatin (SRIF) and growth hormone (GH)-releasing factor in genesis of pulsatile GH secretion. *Clin Pediatr Endocrinol* 3:97-110
575. Tannenbaum GS, Martin JB (1976) Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 130:3395-3401
576. Tanner JW, Davis SK, McArthur NH, French JT, Welsh TH Jr. (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
577. Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN (1998) Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93:841-850
578. Teh LC, Murphy LJ, Huq NL, Surus AS, Friesen HG, Lazarus L, Chapman GE (1987) Methionine oxidation in human growth hormone and human chorionic somatomammotropin. Effects on receptor binding and biological activities. *J Biol Chem* 262:6472-6477
579. ten Hoeve J, de Jesus Ibarra-Sanchez M, Fu Y, Zhu W, Tremblay M, David M, Shuai K (2002) Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 22:5662-5668
580. Tentler JJ, Hadcock JR, Gutierrez-hartmann A (1997) Somatostatin acts by inhibiting the cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate (cAMP) / protein kinase pathway, cAMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation, and CREB transcription potency. *Mol Endocrinol* 11:859-866
581. Theill LE, Hattori K, Lazzaro D, Castrillo JL, Karin M (1992) Differential splicing of the GHF-1 primary transcript gives rise to two functionally distinct homeodomain proteins. *EMBO J* 11:2261-2269
582. Theill LE, Karin M (1993) Transcriptional control of GH expression and anterior pituitary development. *Endocr Rev* 14:670-689

583. Thirone AC, Carvalho CR, Saad MJ (1999) Growth hormone stimulates the tyrosine kinase activity of JAK2 and induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates and Shc in rat tissues. *Endocrinology* 140:55-62
584. Thomas MJ (1998) The molecular basis of growth hormone action. *Growth Horm IGF Res* 8:3-11
585. Thorner MO, Chapman IM, Gaylinn BD, Pezzoli SS, Hartman ML (1997) Growth hormone-releasing hormone and growth hormone-releasing peptide as therapeutic agents to enhance growth hormone secretion in disease and aging. *Recent Prog Horm Res* 52:215-244
586. Thorner MO, Strasburger CJ, Wu Z, Straume M, Bidlingmaier M, Pezzoli SS, Zib K, Scarlett JC, Bennett WF (1999) Growth hormone (GH) receptor blockade with a PEG-modified GH (B2036-PEG) lowers serum insulin-like growth factor-I but does not acutely stimulate serum GH. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2098-2103
587. Toker A, Meyer M, Reddy KK, Falck JR, Aneja R, Aneja S, Parra A, Burns DJ, Ballas LM, Cantley LC (1994) Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J Biol Chem* 269:32358-32367
588. Tollet-Egnell P, Flores-Morales A, Stavreus-Evers A, Sahlin L, Norstedt G (1999) Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology* 140:3693-3704
589. Tornell J, Carlsson B, Pohjanen P, Wennbo H, Rymo L, Isaksson O (1992) High frequency of mammary adenocarcinomas in metallothionein promoter-human growth hormone transgenic mice created from two different strains of mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:237-242
590. Turkson J, Ryan D, Kim JS, Zhang Y, Chen Z, Haura E, Laudano A, Sefti S, Hamilton AD, Jove R (2001) Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem* 276:45443-45455

U

591. Ueki I, Ooi GT, Tremblay ML, Hurst KR, Bach LA, Boisclair YR (2000) Inactivation of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system. *Proc Natl Acad Sci, USA* 97:6868-6873
592. Untergasser G, Kranewitter W, Walser F, Madersbacher S, Dirnhofer S, Berger P (1996) The testis as eutopic production site of human growth hormone, placental lactogen and prolactin: possible autocrine/paracrine effects on testicular function. *Wien Klin Wochenschr* 108:541-546

V

593. Vahl N, Jorgensen JOL, Skjaerback C, Veldhuis JD, Weltman A (1997) Abdominal adiposity rather than age and sex predicts the mass and patterned regularity of growth hormone secretion in mid-life healthy adults. *Am J Physiol* 272:E1108-E1116
594. van Garderen E, Schalken JA (2002) Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. *Mol Cell Endocrinol* 197:153-165
595. van Garderen E, Swennenhuis JF, Hellmen E, Schalken JA (2001) Growth hormone induces tyrosyl phosphorylation of the transcription factors Stat5a and Stat5b in CMT-U335 canine mammary tumor cells. *Domest Anim Endocrinol* 20:123-135
596. van Garderen E, van der Poel HJA, Swennenhuis JF, Wissink EHJ, Rutteman GR, Hellmén E, Mol JA, Schalken JA (1999) Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumors. *Endocrinology* 140:5907-5914

597. van Kerkhof P, Alves dos Santos CM, Sachse M, Klumperman J, Bu G, Strous GJ (2001) Proteasome inhibitors block a late step in lysosomal transport of selected membrane but not soluble proteins. *Mol Biol Cell* 12:2556-2566
598. van Kerkhof P, Smeets M, Strous GJ (2002) The ubiquitin-proteasome pathway regulates the availability of the GH receptor. *Endocrinology* 143:1243-1252
599. VanderKuur JA, Wang X, Zhang L, Campbell GS, Allevato G, Billestrup N, Norstedt G, Carter-Su C (1994) Domains of the growth hormone receptor required for association and activation of JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem* 269:21709-21717
600. Veldhuis JD, Anderson SM, Shah N, Bray M, Vick T, Gentili A, Mulligan T, Johnson ML, Weltman A, Evans WS, Iranmanesh A (2001) Neurophysiological regulation and target-tissue impact of the pulsatile mode of growth hormone secretion in the human. *Growth Horm IGF Res* 11:S25-37
601. Veldhuis JD, Liem AY, South S, Weltman A, Weltman J, Clemmons DA, Abbot R, Mulligan T, Johnson ML, Pincus SM, Straume M, Iranmanesh A (1993) Differential impact of age, sex-steroid hormone and obesity on basal vs pulsatile growth hormone secretion in men as assessed in an ultrasensitive chemiluminescence assay. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3209-3222
602. Verdier F, Chretien S, Muller O, Varlet P, Yoshimura A, Gisselbrecht S, Lacombe C, Mayeux P (1998) Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated CIS protein. *J Biol Chem* 273:28185-28190
603. Verstreken P, Kjaerulff O, Lloyd TE, Atkinson R, Zhou Y, Meinertzhagen IA, Bellen HJ (2002) *Drosophila* endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release. *Cell* 109:101-112
604. Vleurick L, Van Veldhoven P, Decuypere E, Kuhn ER (1998) Intracellular growth hormone receptors in chicken liver. *Ann N Y Acad Sci* 839:538-540
605. Vleurick L, Kuhn ER, Decuypere E, Burnside J, Pezet A, Edery M (1999) Generation of chicken growth hormone-binding proteins by proteolysis. *Gen Comp Endocrinol* 113:283-289
606. von Lintig FC, Dreilinger AD, Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR (2000) Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 62:51-62
607. von Lintig H, Flury N, Eppenberger-Castori S, Kueng W, David F, Eppenberger U (2000) Potential prognostic value of mitogen-activated protein kinase activity for disease-free survival of primary breast cancer patients. *Int J Cancer* 89:384-388

W

608. Walker JL, Moats-Staats BM, Stiles AD, Underwood LE (1992) Tissue-specific developmental regulation of the messenger ribonucleic acids encoding the growth hormone receptor and the growth hormone binding protein in rat fetal and postnatal tissues. *Pediatr Res* 31:335-339
609. Wallis M (1981) The molecular evolution of pituitary growth hormone, prolactin and placental lactogen: a protein family showing variable rates of evolution. *J Mol Evol* 17:10-18
610. Wang J, Zhou J, Bondy CA (1999) IGF1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB J* 13:1985-1990
611. Wang TC, Cardiff RD, Zukerberg L, Lees E, Arnold A, Schmidt EV (1994) Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* 369:669-671

612. Wang Y, Pennock S, Chen X, Wang Z (2002) Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. *Mol Cell Biol* 22:7279-7290
613. Wang YD, Wong K, Wood WI (1995) Intracellular tyrosine residues of the human growth hormone receptor are not required for the signaling of proliferation or Jak-STAT activation. *J Biol Chem* 270:7021-7024
614. Wang Z, Zhou YT, Kakuma T, Lee Y, Kalra SP, Kalra PS, Pan W, Unger RH (2000) Leptin resistance of adipocytes in obesity: the role of suppressors of cytokine signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 277:20-26
615. Waters MJ (1997) The growth hormone receptor. In: Kostyo JL (ed.). *Handbook of Physiology*, Oxford University Press Vol 5, Ch. 14 (p 1301-1348)
616. Waters MJ (1999) The GH receptor. In: Kostyo JL (ed.). *Handbook of Physiology*, Oxford University Press Vol 5. Ch. 13 (p 397-442)
617. Waxman DJ, Ram PA, Pampori NA, Shapiro BH (1995) Growth hormone regulation of male-specific rat liver P450s 2A2 and 3A2: induction by intermittent growth hormone pulses in male but not female rats rendered growth hormone deficient by neonatal monosodium glutamate. *Mol Pharmacol* 48:790-7
618. Waxman DJ (2000) Growth hormone pulse-activated STAT5 signalling: a unique regulatory mechanism governing sexual dimorphism of liver gene expression. *Novartis Found Symp* 227:61-74
619. Wehrenberg WB, Ling N (1983) The absence of an age-related change in the pituitary response to growth hormone-releasing factor in rats. *Neuroendocrinology* 37:463-466
620. Wehrenberg WB, Corder R, Keher P, Muller AF, Gaillard RC (1987) The role of growth hormone-releasing factor and growth hormone inhibiting hormone in young, neonatal and pubertal somatic growth. *Endocrinol Jpn* 34:1-8
621. Wei LL, Hawkins P, Baker C, Norris B, Sheridan PL, Quinn PG (1996) An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 10:1379-1387
622. Weigent DA, Riley JE, Galin FS, LeBoeuf RD, Blalock JE (1991a) Detection of growth hormone and growth hormone-releasing hormone-related messenger RNA in rat leukocytes by the polymerase chain reaction. *Proc Soc Exp Biol Med* 198:643-648
623. Weigent DA, Blalock JE, LeBoeuf RD (1991b) An antisense oligodeoxynucleotide to growth hormone messenger ribonucleic acid inhibits lymphocyte proliferation. *Endocrinology* 128:2053-2057
624. Wells JA (1996) Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc Natl Acad Sci, USA* 93:1-6
625. Wells JA, Cunningham BC, Fuh G, Lowman HB, Bass SH, Mulkerrin MG, Ultsch M, Devos AM (1993) The molecular basis for growth hormone-receptor interactions. *Recent Prog Horm Res* 48:253-275
626. Weltman A, Weltman JY, Hartman ML, Abbot RA, Rogol AD, Evans WS, Veldhuis JD (1994) Relationship between age, percentage body fat, fitness and 24 hour growth hormone release in healthy young adults: effects of gender. *J Clin Endocrinol Metab* 78:543-548
627. Wennbo H, Gebre-Medhin M, Gritli-Linde A, Ohlsson C, Isaksson OG, Tornell J (1997) Activation of the prolactin receptor but not the growth hormone receptor is important for induction of mammary tumors in transgenic mice. *J Clin Invest* 100:2744-2751
628. Werther GA, Haynes K, Waters MJ (1993) Growth hormone (GH) receptors are expressed on human fetal mesenchymal tissues – Identification of messenger ribonucleic acid and GH-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 76:1638-1644

629. Werther GA, Haynes KM, Barnard R, Waters MJ (1990) Visual demonstration of growth hormone receptors on human growth plate chondrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1725-1731
630. White MF (1998) The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Prog Horm Res* 53:119-138
631. Winer LM, Shaw MA, Baumann G (1990) Basal plasma growth hormone levels in man: new evidence for rhythmicity of growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1678-1686
632. Winston LA, Bertics PJ (1992) Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation of 42- and 45-kDa ERK-related proteins. *J Biol Chem* 267:4747-4751
633. Wolf RF, Heslin MJ, Newman E, Pearlstone DB, Gonenne A, Brennan MF (1992) Growth hormone and insulin combine to improve whole-body and skeletal muscle protein kinetics. *Surgery* 112:284-291
634. Wozniak RW, Rout MP, Aitchison JD (1998) Karyopherins and kissing cousins. *Trends Cell Biol* 8:184-188
635. Wu H, Devi R, Malarkey WB (1996) Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system a clinical Research Center study. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1278-1282
636. Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsura M, Katz D, FitzGerald MJ, Rothstein TL, Sherr DH, Sonenshein GE (1996) Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J* 15:4682-4690

X

637. Xu X, Sun YL, Hoey T (1996) Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 273:794-797

Y

638. Yamada E (1995) The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1:445-458
639. Yamasaki H, Prager D, Gebremedhin S, Melmed S (1991) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) attenuation of growth hormone is enhanced by overexpression of pituitary IGF-I receptors. *Mol Endocrinol* 5:890-896.
640. Yamashita S, Melmed S (1986) Insulin regulation of rat growth hormone gene transcription. *J Clin Invest* 78:1008-1014
641. Yamashita S, Slanina S, Kado H, Melmed S (1986) Autoregulation of pituitary growth hormone messenger ribonucleic acid levels in rats bearing transplantable mammo-somatotrophic pituitary tumors. *Endocrinology* 118:915-918
642. Yamashita S, Ong J, Melmed S (1987) Regulation of human growth hormone gene expression by insulin-like growth factor I in transfected cells. *J Biol Chem* 262:13254-13257
643. Yamauchi H, O'Neill A, Gelman R, Carney W, Tenney DY, Hosch S, Hayes DF (1997) Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast cancer patients by pretreatment circulating levels of extracellular domain of the HER-2/c-neu protein. *J Clin Oncol* 15:2518-2525
644. Yang XF, Beamer WG, Huynh H, Pollak M (1996) Reduced growth of human breast cancer xenografts in hosts homozygous for the lit mutation. *Cancer Res* 56:1509-1511

645. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto, Masuhara M, Sasaki A, Wakiota T, Otsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN, Yoshimura A (1999) The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 18:1309-1320
646. Yazukawa H, Sasaki A, Yoshimura A (2000) Negative regulation of cytokine signalling pathways. *Annu Rev Immunol* 18:143-164
647. Ye ZS, Forman BM, Aranda A, Pascual A, Park HY, Casanova J, Samuals HH (1988) Rat growth hormone gene expression: Both cell-specific and thyroid hormone response elements are required for thyroid hormone regulation. *J Biol Chem* 263:7821-7822
648. Yee D (2001) Are the insulin-like growth factors relevant to cancer? *Growth Horm IGF Res* 11:339-345
649. Yenush L, White MF (1997) The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. *Bioessays* 19:491-500
650. Yoshimura A, Ohkubo T, Kigushi T, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Hara T, Miyajima A (1995) A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J* 14:2816-2826
651. You M, Yu DH, Feng GS (1999) Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol Cell Biol* 19:2416-2424
652. Young WG (1999) Growth hormone and insulin like growth factor-1 in odontogenesis. *Int J Dev Biol* 39:263-272
653. Yu H, Rohan T (2000) Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 92:1472-1489

Z

654. Zhang CZ, Li H, Young WG, Bartold PM, Chen C, Waters MJ (1997) Evidence for a local action of growth hormone in embryonic tooth development in the rat. *Growth Factors* 14:131-143
655. Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ, Moritz RL, Cary D, Richardson R, Hausmann G (1999) The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signalling binds to elongin B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci, USA* 96:2071-2076
656. Zhang W, Brooks RL, silversides DW, West BL, Leidig F, Baxter JD (1992) Negative thyroid hormone control of human growth hormone gene expression is mediated by 3'-untranslated/3'-flanking DNA. *J Biol Chem* 267:15056-15063
657. Zhang X, Zhu T, Chen Y, Mertani HC, Lee KO, Lobie PE (2003) Human Growth Hormone-regulated HOXA1 Is a Human Mammary Epithelial Oncogene. *J Biol Chem* 278:7580-7590
658. Zhou Y, Xu B, Wang X, Chen WY, Kopchick JJ (1994) Functional expression of a mouse growth hormone receptor cDNA in transfected mouse L cells. *Receptor* 4:143-155
659. Zhu T, Goh EL, LeRoith D, Lobie PE (1998a) Growth hormone stimulates the formation of a multiprotein signaling complex involving p130(Cas) and CrkII. Resultant activation of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK). *J Biol Chem* 273:33864-33875
660. Zhu T, Goh EL, Lobie PE (1998b) Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation and association of p125 focal adhesion kinase (FAK) with JAK2. Fak is not required for stat-mediated transcription. *J Biol Chem* 273:10682-10689

661. Zhu T, Goh EL, Graichen R, Ling L, Lobie PE (2001) Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal* 13:599-616
662. Zhu T, Lobie PE (2000) Janus kinase 2-dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinase by growth hormone. Resultant transcriptional activation of ATF-2 and CHOP, cytoskeletal re-organization and mitogenesis. *J Biol Chem* 275:2103-2014
663. Zogopoulos G, Albrecht S, Pietsch T, Alpert L, von Schweinitz D, Lefebvre Y, Goodyer CG (1996) Fetal- and tumor-specific regulation of growth hormone receptor mRNA expression in human liver. *Cancer Res* 56:2949-2953

Résumé : L'hormone de croissance (GH) est une hormone paradoxale. Historiquement reconnue comme responsable de la croissance post-natale, elle est actuellement considérée comme une véritable cytokine, synthétisée en de nombreux sites extra-hypophysaires et impliquée, lorsque dérégulée, dans les processus de tumorigénèse. Le travail présenté dans cette thèse a permis de caractériser et localiser par RT-PCR *in situ*, les cellules capables de synthétiser la GH dans le système immunitaire du fœtus et du rat adulte, puis dans les différents systèmes de prolifération cellulaire du carcinome canalaire mammaire humain montrant ainsi que la GH, par son action autocrine / paracrine est non seulement impliquée dans le développement embryonnaire mais participe à la progression tumorale. Nos travaux *in vitro* montrent que l'internalisation et la translocation nucléaire de la GH complexée à son récepteur sont indépendantes de l'activation de JAK2 « Janus Kinase 2 », cependant indispensable à son exportation hors du noyau. L'étude du système de régulation négative du signal induit par la GH nous a permis de mettre en évidence une surexpression de la protéine CIS « Cytokine-Inducible SH2-containing protein », dans les zones de prolifération tumorale des différents carcinomes étudiés et dans 8 lignées tumorales mammaires. La surexpression de CIS, *in vitro*, inhibe la voie de signalisation JAK/STAT « Signal Transducer and Activator of Transcription » et active la voie des MAPK « Mitogen Activated Protein Kinases ». Nous avons pour finir, corrélé l'activation prédominante de CIS à la synthèse de GH « autocrine » dans les cellules tumorales mammaires MCF-hGH. La localisation tant nucléaire que cytoplasmique de la GH et de toutes les molécules informatives laisse entrevoir des mécanismes de régulation encore inconnus. Les travaux futurs tenteront de répondre à la question maintenant cruciale : la GH, hormone de jeunesse ou véritable oncogène ?

Intitulé en anglais : Growth hormone : a cytokine

Summary: Growth hormone (GH) is a paradoxical hormone. Historically described as the major regulator of postnatal growth it is now recognised as a cytokine synthesized in many extrapituitary sites and involved in tumorigenesis. The work presented in this thesis described the characterisation and localisation of GH production in the immune system of adult and foetal rat and in different disorders of the human mammary gland. Using *in situ* RT-PCR, we show that autocrine/paracrine GH is involved in embryonic development as well as in breast tumour progression. We have also demonstrated in a model system that activation of JAK2 « Janus Kinase 2 » is not required for internalisation and nuclear translocation of GH but is pivotal for the removal of the hormone from the nucleus. We also studied the negative regulation of cytokine signalling and demonstrated the overexpression of CIS protein « Cytokine-Inducible SH2-containing protein » in breast disorders and 8 breast carcinoma cell lines, where it induces the inhibition of the JAK/STAT « Signal Transducer and Activator of Transcription » pathway and the activation of the MAP kinase « Mitogen Activated Protein Kinases » pathway. We finally demonstrated that CIS overexpression in breast carcinoma cells is correlated to the autocrine/paracrine production of GH. The nuclear and cytoplasmic localisation of GH and its signalling molecules might explain the multiple physiological effects of GH. Future work is now required to answer a crucial question: GH, fountain of youth or oncogene?

Mots clés : GH extra-hypophysaire, GHR, cytokine, autocrine / paracrine, système immunitaire, carcinome mammaire, signalisation, internalisation, SOCS, CIS.

Discipline : Sciences de la vie

Laboratoire EPHE : Laboratoire de reproduction et développement des vertébrés, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 25 Rue du Plat, 69002 Lyon

Laboratoire d'accueil : CNRS - UMR 5123 - Physiologie intégrative, cellulaire et moléculaire - Université Claude Bernard Lyon-1, Bâtiment Raphaël Dubois, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex

Directeur scientifique : Dr. Gérard Morel