Mécanisme et conséquences métaboliques de l'internalisation de l'hormone de croissance

Cécile Vivancos

▶ **To cite this version:**

Cécile Vivancos. Mécanisme et conséquences métaboliques de l'internalisation de l'hormone de croissance. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2004. Français. NNT : . tel-00012032

HAL Id: tel-00012032
https://theses.hal.science/tel-00012032

Submitted on 24 Mar 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.

N° Année 2004

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le 2 Février 2004

par

M^{elle} VIVANCOS Cécile

MECANISME ET CONSEQUENCES METABOLIQUES DE L'INTERNALISATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE

Directeur de thèse : M. Gérard MOREL

JURY : M. J. DJIANE
M. S. FAKAN
M. G. MOREL
M. JM. PEQUIGNOT
M. Y. USSON

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université	M. le Professeur D. DEBOUZIE
Vice-Président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J.F. MORNEX
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. le Professeur R. GARRONE
Vice-Présidente du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur G. ANNAT
Secrétaire Général	M. J.P. BONHOTAL

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec	Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche	Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
UFR de Médecine Lyon-Nord	Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE
UFR de Médecine Lyon-Sud	Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur J.DOURY
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Institut Techniques de Réadaptation	Directeur : Mme le Professeur D. BOISSON
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE
Département de Formation à la Recherche et à l'Evaluation Pédagogiques	Directeur : M. le Professeur M. LAVILLE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique	Directeur : M. le Professeur J.L. VIALLE
UFR de Biologie	Directeur : M. le Professeur G. BOSQUET
UFR de Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
UFR de Génie Electrique et des Procédés	Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET
UFR Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
UFR de Mathématiques	Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE
UFR d'Informatique	Directeur : M. le Professeur M. EGEA
UFR de Chimie Biochimie	Directeur : M. le Professeur J.P. SCHARFF
UFR STAPS	Directeur : M. P. THIRIET Maître de Conférences
Observatoire de Lyon	Directeur : M. le Professeur R. BACON
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J.P. PUAUX
Département de 1er cycle Sciences	Directeur : M. J.C. DUPLAN Maître de Conférences
IUT A	Directeur : M. le Professeur M. ODIN
IUT B	Directeur : M. le Professeur G. MAREST
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur D. SERANT

09/07/03

REMERCIEMENTS

Pour m'avoir accueillie il y a environ 5 ans en tant que stagiaire dans son laboratoire puis intégrée dans son équipe, je tiens à remercier très sincèrement le **Docteur Gérard Morel**. Il m'a comprise et a su obtenir le meilleur de moi-même en croyant en mes capacités. Il m'a fait bénéficier, avec beaucoup de disponibilité, de ses conseils et connaissances me permettant de continuer de d'apprendre, de progresser, de m'affirmer dans mon travail et de mener à bien cette étude. Qu'il soit assuré de mon éternelle gratitude.

Je tiens à remercier vivement le **Professeur Jean-Marc Pequignot** pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de participer à mon jury de thèse malgré les importantes fonctions qu'il a à assurer au sein de l'unité. Qu'il soit assuré de ma reconnaissance.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au **Docteur Jean Djiane** qui a accepté la charge de travail supplémentaire que constitue son rôle de rapporteur en jugeant cette étude. Ses compétences scientifiques dans l'univers que constitue l'endocrinologie sont essentielles et incontestables. Qu'il soit assuré de ma sincère considération.

Je suis particulièrement honorée de la présence du **Professeur Stanislav Fakan** en tant que rapporteur de ce projet. Son savoir scientifique est une référence dans le monde de la microscopie électronique. C'est avec une humilité et émotion que je lui soumets mon manuscrit. J'espère que cette épreuve marquera le début d'une aventure enrichissante et fructueuse au sein de son laboratoire à Lausanne.

Je tiens également à remercier vivement le **Docteur Yves Usson** qui me gratifie de sa présence à mon jury de thèse. Bien que la microscopie confocale soit apparue dans la dernière ligne droite de mon doctorat, il a su prendre une place importante par sa formation et ses conseils exemplaires dans mon projet. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

A ma famille

A mes parents

Sans vous, jamais je ne serais arrivée à un tel niveau. L'éducation et les valeurs que vous m'avez inculquées jusqu'ici m'ont permis de m'épanouir et d'être capable de réaliser mes propres choix. Votre soutien inconditionnel, votre chaleur et votre amour m'ont donné la force de me surpasser lors des moments les plus difficiles à vivre. Veuillez trouver dans ce travail ma plus profonde reconnaissance et l'accepter en gage de mon amour pour vous. Merci, je vous aime.

A Cédric

Qui aurait cru que nous en arriverions là ? Que de changements vécus depuis notre rencontre…L'année 2004 continue sur la même voie. Après ton intégration dans une nouvelle entreprise, tu as choisi de m'aider dans ma vie professionnelle en me suivant. Pour le refuge que tu m'offres tous les jours, pour ton amour, ta confiance et ton enthousiasme, pour notre mariage à venir, pour la vie que nous construisons ensemble et qui se présente à nous, je tenais à exprimer toute la force et la sincérité de l'amour que je te porte.

A ma sœur Véro

Quand on se retourne sur notre vie commune, que de moments inoubliables passés ensemble. Depuis notre tendre enfance en passant par l'adolescence et puis aujourd'hui encore, tu es là *ma sister* même si les kilomètres nous ont séparées depuis bientôt 9 ans. Pour ta présence, ton écoute, tes conseils, pour ce que tu es, je tenais à te remercier.

A mes grands-parents

Quelle chance de nos jours d'avoir encore près de soi ses 4 grands-parents. Je tenais à vous remercier de votre enthousiasme, de votre soutien et de votre amour. Les vacances de mon enfance, actuelles et à venir à St Hippo furent, demeurent et constitueront de véritables moments de joie et de bonheur grâce à vous. Que ce travail vous témoigne toute mon affection.

A tous les autres membres de ma famille, Marraine et tant d'autres, qui m'ont soutenue durant ces années, soyez assurés de toute mon affection.

A mes amis

Pour notre complémentarité professionnelle et personnelle, je tiens à remercier chaleureusement Aude. Nos 2 années de collaboration nous ont permis d'évoluer ensemble sans perdre de vue nos convictions personnelles. Dans les moments les plus difficiles, nous avons su nous encourager mutuellement et nous relancer. Qu'elle soit assurée de ma plus grande considération et de ma plus profonde amitié.

A Sophie, pour ses conseils lors de mon arrivée dans le laboratoire, pour m'avoir donné sa confiance et son amitié, merci.

A Yves Marrouin, pour m'avoir aidée à me construire depuis mon arrivée au FCL, pour m'avoir protégée lors du départ de mes parents et pour son aide précieuse lors de ma préparation de soutenance de thèse, mille mercis. Qu'il soit assuré de mon affection et de toute mon estime.

Mon année passée aux côtés d'Annie m'a permis de continuer d'apprendre à utiliser la microscopie électronique. Peut-être serons-nous à même de collaborer dans le futur ? Merci pour ton soutien et la reconnaissance que tu as su porter à mon travail.

A Ghislou, Nathalie, merci pour votre amitié qui me touche profondément.

Je ne peux oublier de remercier Rabia qui a su me transmettre sa passion pour la recherche.

A l'équipe du laboratoire

Je souhaite remercier chacune des personnes qui ont constitué à un moment donné l'équipe de Gérard Morel ; Mireille, Hichem, Elara, Patricia, Bérangère, Céline, Marie, Laurent, Sébastien et Khedidja pour avoir contribué par leur aide précieuse et leur objectivité, par leurs conseils, à l'élaboration de ce travail. Je voudrais également remercier Caroline, Stéphane, Brigitte, Elodie sans qui une grande partie des expérimentations n'auraient pas vu le jour. Merci à Roger pour son exemplaire disponibilité lors des moments de solitudes vécus face à l'outil informatique. Merci à Jean-Louis pour ses nombreux conseils sur la vie cellulaire ainsi qu'aux autres membres de l'unité pour leur aide précieuse.

Merci à toute l'**équipe du centre de microscopie électronique :** Béatrice, Marilyne, Christelle, Bernadette et Albert pour leurs soutien et conseils très précieux.

SOMMAIRE

LISTE DES ABBREVIATIONS 13

INTRODUCTION 19

I. L'HORMONE DE CROISSANCE 21

I.1. L'hypophyse, lieu privilégié de synthèse de la GH 21

I.2. Du gène à l'hormone 22

I.2.1. Le gène de la GH 22

I.2.2. La structure de la GH 24

I.3. Expression ectopique de la GH 25

I.4. La sécrétion de la GH 26

I.4.1. Rythme sécrétoire de la GH 26

I.4.2. Régulation de la sécrétion de GH 27

II. LE RECEPTEUR DE L'HORMONE DE CROISSANCE 31

II.1. Le récepteur de la GH est un récepteur de cytokine 31

II.2. La structure du GHR 32

II.2.1. Domaine extracellulaire 32

II.2.2. Domaine intracellulaire 33

III. LA TRANSDUCTION DU SIGNAL INDUITE PAR L'HORMONE DE CROISSANCE 36

III.1. Dimérisation du GHR 36

III.2. Evénement d'initiation de la transduction du signal 41

III.3. Les différentes voies de transduction du signal induites par la GH 43

III.3.1. Complexes multiprotéiques 43

III.3.2. La voie de la régulation de la transcription des gènes par la GH : la voie des Ras-MAPK et des Jak/STAT 45

III.3.2.1. La voie des MAPK 46

III.3.2.2. La voie des Jak/STAT 48

III.3.2.3. Les RTK : les récepteurs à activité tyrosine kinase 51

III.3.3. La voie de la PI-3 kinase 51

III.3.4. La voie de la phospholipase C/PKC/Ca^{2+} 53

III.4. La régulation de la transduction du signal 55

III.4.1.La régulation négative de la signalisation de la GH 55

III.4.1.1. Régulation de la disponibilité de GHR à la surface cellulaire 55

III.4.1.2. Régulation par les déphosphorylations 56

III.4.1.3. La régulation négative de la voie des Jak/STAT 57

III.4.1.3.1. Au niveau du récepteur 57

III.4.1.3.2. Au niveau de Jak2 57

III.4.1.3.3. Au niveau des STAT **58**
III.4.1.3.4. La régulation négative par les CIS/SOCS **59**
III.4.2. La régulation positive de la voie Jak/STAT **60**
III.4.2.1. Au niveau de Jak2 **60**
III.4.2.2. Au niveau des STAT **60**

IV. L'INTERNALISATION DU COMPLEXE HORMONE-RECEPTEUR **61**
IV.1. L'internalisation dépendante de la voie des vésicules à clathrine **62**
IV.1.1. Le système ubiquitine-protéasome **62**
IV.1.2. La conjugaison de l'ubiquitine au GHR **64**
IV.2. L'endocytose du complexe hormone-récepteur par la voie des vésicules à clathrine **66**
IV.2.1 Mécanisme général **66**
IV.2.1.1. Description des vésicules à clathrine **66**
IV.2.1.2. Constitution des vésicules d'internalisation recouvertes de clathrine **67**
IV.2.2. L'internalisation du complexe GH-GHR_2 par les vésicules à clathrine et sa régulation **71**
IV.2.3. Le tri protéique endosomal suivi de la dégradation lysosomale du complexe GH-GHR_2 **72**
IV.2.3.1. L'étape de tri protéique et de recyclage endosomal **72**
IV.2.3.2. La dégradation lysosomale du complexe GH-GHR_2 **74**
IV.2.4. La régulation de la disponibilité en GHR **76**
IV.3. L'internalisation indépendante des vésicules à clathrine **78**
IV.3.1. Les différentes voies indépendantes du manteau de clathrine **78**
IV.3.2. La voie des cavéoles **79**
IV.3.2.1. Description structurale des cavéoles **79**
IV.3.2.2. Composition des cavéoles **81**
IV.3.2.2.1. La famille des cavéolines **81**
IV.3.2.2.2. Formation du manteau des cavéoles **84**
IV.3.2.2.3. Implication d'autres protéines dans la structure des cavéoles **86**
IV.3.2.2.4. Composition lipidique **86**
IV.3.2.3. Rôle des cavéoles et de la cavéoline dans les fonctions cellulaires **87**
IV.3.2.3.1. Rôle dans le processus d'endocytose **87**
IV.3.2.3.1.1. La dynamique des cavéoles **87**
IV. 3.2.3.1.2. Le mécanisme d'internalisation par les cavéoles **88**
IV.3.2.3.1.3. Internalisation du complexe GH-GHR_2 par les cavéoles **90**
IV.3.2.3.2. Rôle dans la transduction du signal et l'homéostasie du cholestérol **91**
IV.3.2.3.3. Rôle dans le transport lipidique : hypothèse de la structure lipidique **94**

V. LES EFFETS PHYSIOLOGIQUES ET METABOLIQUES DE L'HORMONE DE CROISSANCE **99**
V.1. Effets sur la multiplication cellulaire et la croissance **100**
V.2. Effets sur la vieillesse et la longévité **102**
V.3. Effets métaboliques **103**

V.3.1. Effets sur le métabolisme lipidique **103**
V.3.2. Effets sur le métabolisme glucidique **104**
V.3.3. Implication de la signalisation de la GH sur les métabolismes lipidique et glucidique **105**
V.3.4. Effets sur le métabolisme protéique **107**
V.3.5. Effets sur la composition corporelle **107**
V.3.6. Effets sur le métabolisme énergétique **109**
V.3.6.1. Effets sur le métabolisme et la fonction mitochondriale **109**
V.3.6.2. Effets anti-apoptotiques de la GH **111**
V.3.6.3. Organisation structurale de la mitochondrie **112**
V.3.6.4. Les voies d'entrées dans la mitochondrie **114**
V.3.6.4.1. Import classique de protéines cytosoliques **114**
V.3.6.4.2. Transport des métabolites et des protéines au niveau des points de contact **118**
V.3.6.5. La chaîne respiratoire mitochondriale **123**
OBJECTIFS **127**
RESULTATS **129**
I. Implication de la boîte 1 du GHR dans la consommation d'oxygène mitochondriale en réponse à une stimulation par la GH **131**
II. Rôle de la cavéoline-1 dans le transport de la GH vers la mitochondrie **181**
III. Action directe de la GH sur la fonction mitochondriale **227**
DISCUSSION GENERALE **267**
CONCLUSION **279**
PERSPECTIVES **281**
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **285**

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACTH	« AdrenoCorticoTropin Hormone »
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ANT	« Adenine Nucleotide Translocase »
AP-2	« Adaptator Protein » 2
ARNm	Acide RiboNucléique
ATF-2	« Activator Transcription Factor » 2
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
ATPase	ATP synthétase
CALM	« Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid leukemia »
CDD	« Coiled-Coiled Domain »
C/EBP	« CCAAT/Enhancer Binding Protein »
CHO	« Chinese Hamster Ovary »
CHOP	« C/EBP HOmologous Protein »
CIS	« Cytokine Inhibiting Signaling »
CNTF	« Ciliary NeurTrophic Factor »
Cox	cytochrome c oxydase
CSD	« Caveolin Scaffolding Domain »
DAG	DiAcylGlycérol
DBD	« DNA Binding Domain »
E1, 2, 3	« Ubiquitin activating enzyme » 1, 2, 3
EE	« Early Endosome »
EGF	« Epidermal Growth Factor »
EGF-R	« EGF recpetor »
eNOS	« endothelial Nitric Oxide Synthase »
EPO	Erythropoïétine
FAD	Flavine Adenine Dinucléotide
FAK	« Focal Adhesion Kinase »
FMN	Flavine MonoNucléotide
FRAP	« Fluorescence Redistribution After Photobleaching »
FSH	« Folliculing Stimulating Hormone »
GABA	« Gamma Amino-Butyric Acid »
GFP	« Green Fluorescent Protein »
GH	« Growth Hormone »

GHBP	« Growth Hormone Binding Protein »
GH-G120R	antagoniste de la GH muté en position 120
GHR	« Growth Hormone Receptor »
GHRH	« Growth Hormone Releasing Hormone »
GHsR	« Growth Hormone secretagogue Receptor »
GM-CSF	« Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor »
GMPc	Guanosine MonoPhosphate cyclique
Grb2	Growth factor receptor –bound protein 2
GTP	Guanosine TriPhosphate
GTPase	Guanosine TriPhosphate synthase
HDL	« High Density Lipoprotein »
hsp	« heat shock protein »
IFN	interferon
IGF-1	« Insulin-like Growth Factor » 1
IL	Interleukine
IP3	Inositol TriPhosphate
IRS	« Insulin RTeceptor Substrate »
Jak	« Janus kinase »
JNK/SAPK	« c-Jun N-terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase »
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
LH	« Luteinizing Hormone »
LIF	« Leukemia Inhibitory Factor »
MAM	« Mitochondrial-Associated Membrane »
MAPK	« Mitogen-Activated Protein Kinase »
MCF-7	lignée de cellules cancéreuses de glande mammaire humaines
MEK	« MAP-Extracellular signal Related Kinase »
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
MPK	Phosphatase MAPK
MPP	« Mitochondrial Processing Peptidase »
MSF	« Mitochondrial import Stimulating Factor »
mtCK	« mitochondrial Creatin Kinase »
mt-Hsp	« mitochondrial Heat shock protein »
MVB	« Multi-Vesicular Body »
NADH	« Nicotinamide adenine dinucleotide »
Nck	Proteine adaptatrice

NGF	« Nerve Growth Factor »
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NSF	« N-ethylmaleimide-Sensitive Factor »
Ob	Leptine
OSCP	Protéine conférant la sensibilité à l'Oligomycine
PDGF	« Platelet-Derived Growth Factor »
PDGF-R	« PDGF Receptor »
PI-3 kinase	PhosphatidylInositol 3-kinase
PIAS	« Protein Inhibitor of Activated STAT »
PKC	Protéine Kinase C
PL	Hormone lactogène placentaire
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PRL	Prolactine
RING	Type de domaine à doigts de zinc
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
SH2, 3	« Src Homology »
SHC	« SH2-containing sequence »
SHP	« SH2-containing phosphotyrosine phosphatase »
SIE	« *Sis*-Inducible Element »
SIRP-α	« SIgnal-Regulatory Phosphatase » alpha
SNAP	« Soluble NSF Attachment protein receptor Protein »
SOCS	« Suppressor Of Cytokine Signaling »
SOS	« Son Of Sevenless »
SRB1	« Scavenger Receptor B1 »
SS	Somatostatine
STAM	Protéine phosphorylée sur ses résidus tyrosine contenant des domaines SH3
STAT	« Signal Transducer and Activator of Transcription »
TACE	« TNFAlpha Converting Enzyme »
TAD	« Transcriptional Activation Domain »
TGF	« Transforming Growth Factor »
TIM	« Translocase of the Inner Membrane »
TNFα	« Tumor Necrosis Factor » alpha
TOM	« Translocase of the Outer Membrane »
TRH	« Thyrotropin-Releasing Hormone »
TSH	« Thyroid Stimulating Hormone »

Tyk	Tyrosine kinase
UbE	« Ubiquitin-dependent Endocytosis »
UCP	« UnCoupling Protein »
VAMP	« Vesicle-Associated Membrane Protein »
VDAC	« Voltage-Dependent Anion Chanel »
VIP	Peptide intestinal vasoactif
VIP21	« Vesicular Integral Protein of 21 kDa »
v-src	virus de sarcome de Rous

Acides aminés	Abréviations à 3 lettres	Symbolisation par une lettre
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartate	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamate	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

INTRODUCTION

L'hormone de croissance (GH) est synthétisée principalement par les cellules somatotropes du lobe antérieur de l'hypophyse (Horvath et Kovacks, 1988). Une fois libérée dans la circulation sanguine, elle va agir au niveau de ses tissus-cibles afin de générer ses effets biologiques. Jusqu'aux années 1980, les connaissances de son mode d'action se limitaient à la stimulation de la production de somatomédine C ou IGF-1 (« Insulin-like Growth Factor ») au niveau du foie, son unique tissu-cible, afin d'induire la croissance et ses effets métaboliques spécifiques. Ce n'est qu'en 1983 que la corrélation entre l'effet biologique de la GH et l'interaction avec un récepteur spécifique (GHR) présent au niveau de la membrane plasmique des cellules-cibles a été démontrée (Gritching *et al*., 1983) même si l'existence du GHR avait été montrée 10 ans auparavant (Tsushima et Friesen, 1973). A partir de là, la communauté scientifique a admis la corrélation entre les effets métaboliques de l'hormone et son interaction avec son récepteur spécifique. L'action de la GH se traduit par de nombreux effets pléiotropes sur la différenciation et la prolifération cellulaires, et le métabolisme (Isaksson *et al*., 1985). Parmi ce dernier, les modifications du métabolisme énergétique mitochondrial apparaissent fondamentales et régulent le contrôle de l'activité respiratoire cellulaire (Maddaiah et *al*., 1970 ; Groves *et al*., 1972 ; Katkocin *et al*., 1979 ; Clejan *et al*., 1980 ; Maddaiah *et al*., 1981 ; Maddaiah et Clejan, 1986). L'action de la GH résulte de sa liaison à un dimère de GHR qui permet l'activation de molécules de signalisation intracellulaire mettant en place plusieurs voies de transduction du signal dont celle des Jak/STAT (« Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription ») est privilégiée (pour revue, Herrington et Carter-Su, 2001).

En parallèle à l'activation des voies de transduction du signal, le complexe GH-GHR_2 est internalisé dans les compartiments cellulaires. L'implication des vésicules recouvertes de clathrine a été rapportée dans la voie de dégradation lysosomale dépendante du système ubiquitine-protéasome (Strous *et al*., 1996). Cependant, l'hormone ainsi que son récepteur ont été localisés au niveau d'autres compartiments non impliqués dans la voie de dégradation tels que le noyau, l'appareil de Golgi et les mitochondries (Lobie *et al*., 1994 ; Mertani *et al*., 1996, 2003). L'existence d'une autre voie d'internalisation, celle constituée par les cavéoles, serait impliquée dans ce trafic intracellulaire (Lobie *et al*., 1999). Les cavéoles induisent en effet l'internalisation de la GH et de son récepteur dans des cellules CHO exprimant le GHR. Elles sont caractérisées par leur enrichissement en une protéine particulière, la cavéoline (Rothberg *et al*., 1992). Une isoforme de cette protéine, la cavéoline-1 a été détectée

récemment au niveau de la mitochondrie (Liu *et al.*, 2001). De par la présence de la GH et de la cavéoline-1 dans cet organite, nous avons suspecté la voie des cavéoles comme responsable de l'adressage de la GH aux mitochondries.

Depuis leur découverte à la fin du XIX^{ème} siècle, la seule fonction attribuée aux mitochondries était de subvenir aux besoins énergétiques de la cellule par la production d'ATP. Au cours des années 1990, la découverte de pathologies impliquant des déficiences mitochondriales, le contrôle exercé par les mitochondries sur les décisions de vie et de mort cellulaire ont accru l'intérêt porté à cet organite. La localisation particulière de la GH au niveau de la mitochondrie pose alors le problème de son mécanisme d'action au niveau de la fonction mitochondriale.

Après une présentation générale de la GH, de son interaction avec le GHR, puis de la transduction du signal, de l'internalisation et des effets de l'hormone qui résultent de la formation du complexe hormone-récepteur, une vue rapide et globale de la fonction mitochondriale sera indiquée. Les résultats sont présentés selon 3 articles et une discussion générale prendra place afin d'analyser et de replacer dans le contexte cellulaire l'implication de la GH et de son récepteur dans l'activité mitochondriale ainsi que le rôle joué par la voie des cavéoles dans l'adressage de la GH et/ou du GHR à la mitochondrie.

I. L'HORMONE DE CROISSANCE

Un grand nombre d'hormones, facteurs nutritionnels et régulateurs cellulaires contribuent à la régulation de la croissance et du développement des mammifères ; cependant, seule l'hormone de croissance (GH) stimule la croissance longitudinale osseuse d'une façon spécifique et dépendante de la dose de GH (Simpson *et al.*, 1950 ; Cheek et Hill, 1974). C'est en 1909 que Harvey Cushing a décrit les relations entre l'hyperactivité hypophysaire et le gigantisme, et entre l'insuffisance hypophysaire et le nanisme. Par la suite, il a été démontré que des extraits d'hypophyse antérieure bovine induisaient la croissance anormalement élevée chez le rat intact et qu'à l'inverse, l'hypophysectomie conduisait à son arrêt (Evans et Long, 1921). La molécule responsable, la GH, a été isolée pour la première fois en 1944 (Li et Evans, 1944 ; Li *et al.*, 1945), et la GH purifiée a permis la restauration de la croissance chez les rats hypophysectomisés (Simpson *et al.*, 1950). A partir de ces découvertes, un véritable engouement pour l'étude de cette hormone s'est mis en place et les GH humaine (hGH), de singe (Li et Papkoff, 1956) et d'autres espèces ont été caractérisées. Il a alors été possible de préciser sa structure, son gène, sa régulation, son mode d'action par interaction avec un récepteur membranaire spécifique présent sur ses tissus-cibles (Gritching *et al.*, 1983) et ses effets biologiques.

I.1. L'hypophyse, lieu privilégié de synthèse de la GH

La GH est synthétisée, stockée et libérée par les cellules somatotropes du lobe antérieur de l'hypophyse (Horvath et Kovacks, 1988). L'antéhypophyse est constituée de 5 populations cellulaires endocrines ayant des caractéristiques morphologiques propres (Nakane, 1970). Les cellules somatotropes représentent environ 50% des cellules de lobe antérieur chez l'homme, 40% chez le rat mâle adulte (Dada *et al.*, 1984). Environ 10% du poids sec de l'hypophyse est constitué par la GH (Lewis, 1992). L'hétérogénéité de ces cellules a été définie par des études immunocytologiques en microscopie électronique. Elle est caractérisée au niveau des tailles des granules de sécrétion et de leurs morphologies. Les cellules somatotropes sont divisées en 3 sous populations : le type I (70%) comprenant les cellules constituées des granules de 350 nm de diamètre, le type II (20%) de 150 à 350 nm de diamètre et le type III de 150 nm de diamètre (Takahashi, 1992). Les autre types cellulaires endocrines constituant le lobe antérieur de l'hypophyse sont les cellules gonadotropes responsables de la sécrétion de la LH (« Luteinizing Hormone ») et de la FSH (« Folliculing

Stimulating Hormone ») ; les cellules lactotropes de la PRL (« Prolactin ») ; les cellules corticotropes de l'ACTH (« Adrenocorticotropin Hormone ») et la cellules thyréotropes de la TSH (« Thyroid Stimulating Hormone »).

Il existe également des cellules à double potentialité pouvant exprimer et/ou synthétiser 2 hormones. C'est le cas des cellules somatolactotropes qui cosynthétisent la GH et la PRL (Frawley *et al*., 1985 ; Nickitovitch-Winer *et al*., 1987 ; Frawley et Bookfor, 1991) et qui, en réponse à différents stimuli et facteurs environnementaux se mettent à sécréter une seule hormone (Frawley et Bookfor, 1991). Il a alors été supposé que les cellules somatotropes et lactotropes dérivaient d'une même souche cellulaire (Borelli *et al*., 1989). D'autres cellules ayant le même type de caractéristiques ont ensuite été découvertes, exprimant à la fois la PRL et la TSH, la GH et la TSH, les LH/FSH et la GH (Losinski *et al*., 1989 ; Childs *et al*., 1994a, b ; Seuntjens *et al*., 2002a, b).

I.2. Du gène à l'hormone

I.2.1. Le gène de la GH

Le gène de la hGH est localisé dans un groupe de 5 gènes apparentés structurellement et fonctionnellement. Deux gènes de hGH, hGH-N (Normal) ou « hGH vraie » et hGH-V (Variant), et 3 gènes de l'hormone lactogène placentaire (PL), constituent ce groupe couvrant environ 66 kpb du bras long du chromosome 17 chez l'homme (Chen *et al*., 1989) (Figure 1). Le groupe de gènes GH-PL est supposé avoir évolué à partir d'un gène ancestral de plus de 350 millions d'années, expliquant la présence de ces deux hormones chez tous les vertébrés terrestres. Cette évolution s'est effectuée selon un processus impliquant des duplications de gènes au moment de l'expansion des mammifères (Miller et Eberhardt, 1983 ; Rand-Weaver *et al*., 1993), l'insertion d'éléments régulateurs de gènes, et au moins un événement de conversion génique. Ces 5 gènes possèdent plus de 92% d'homologie dans leur séquence nucléotidique et présentent une architecture génique identique (Figure 1).

Il existe 2 isoformes de hGH-N de 20 et 22 kDa dont les messagers sont générés par les cellules somatotropes du lobe antérieur de l'hypophyse selon un processus d'épissage différentiel du transcrit primaire (Figure 1).

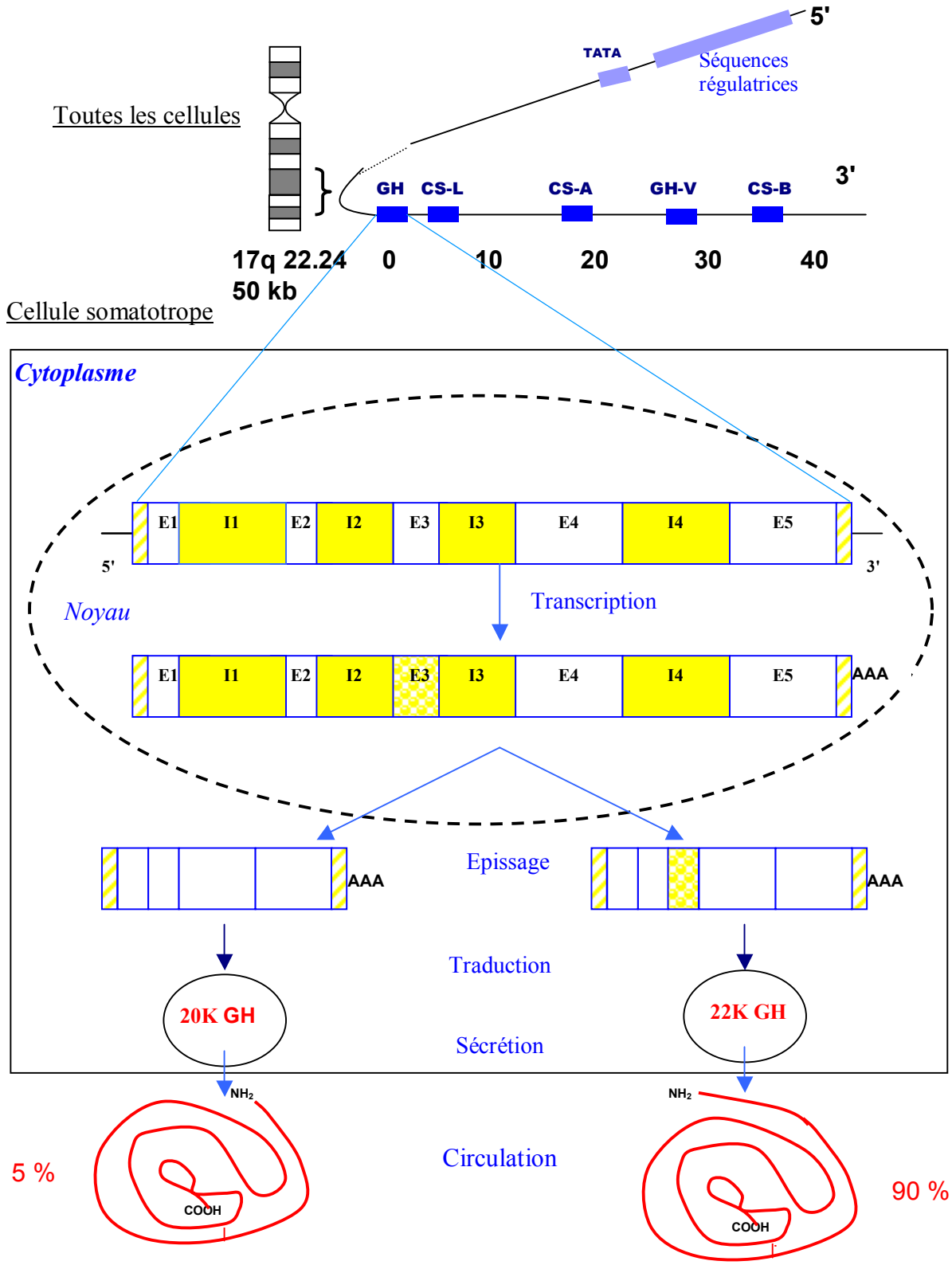


Figure 1 : Biosynthèse de la GH humaine

Représentation schématique du gène codant pour la GH humaine, de sa transcription et de sa traduction. La GH de 22 kDa résulte d'une traduction complète de l'ARNm et représente la forme majoritairement synthétisée par les cellules somatotropes de l'hypophyse, alors que le variant de 20 kDa, constituant une forme très minoritaire, résulte de l'épissage alternatif de l'exon 3.

La hGH-N de 22 kDa représente la forme majeure de l'hormone exprimée et constitue 90% des ARNm codant pour la GH dans l'hypophyse. La forme de 20 kDa est identique à celle de 22 kDa, délétée des résidus aminés 32-46 de l'exon 2. Le gène hGH-V quant à lui est transcrit puis exprimé par le placenta où le produit protéique de 22 kDa est sécrété durant la gestation.

La comparaison des séquences nucléotidiques et en acides aminés de la GH indique une homologie de séquence entre la GH et le PL chez l'homme (87%) supérieure à celle d'autres espèces (65-73% d'homologie de séquence entre les gènes de la GH et du PL chez le porc, le bovin, l'ovin, le cheval et le murin). Malgré cette similarité, hPL ne possède pas plus de 1% du potentiel de la hGH pour induire la croissance. L'homologie entre la GH et les membres de la famille de la PRL est considérablement plus basse (environ 27% d'identité de séquence nucléotidique). La GH de primate, au contraire de la GH d'autres espèces, peut se lier au récepteur humain de la GH. Sous certaines conditions, la hGH peut également se lier et activer le récepteur de la PRL chez le rat.

I.2.2. La structure de la GH

La GH est synthétisée par les cellules somatotropes sous la forme d'une pré-hormone contenant un peptide signal hydrophobe de 26 acides aminés à l'extrémité N-terminale qui est supprimé lors de la sécrétion (Seeburg *et al*., 1977 ; Martial *et al.*, 1979 ; Seeburg, 1982). La hGH-N mature de 22 kDa, polypeptide composé d'une seule chaîne non-glycosylée de 191 acides aminés (Li et Dixon, 1971 ; Niall *et al*., 1971), est l'isoforme la plus abondante de hGH plasmatique (elle représente 90% de la hGH dans le sang). Chez l'homme, sa demie-vie est d'environ 25 minutes. Des ponts disulfures entrent également dans la composition de la hGH entre les résidus Cys35 et Cys165, Cys182 et Cys189 ; permettant la formation d'une grande et d'une petite boucle. Chez le rat, la GH est composée de 190 acides aminés (Seeburg *et al*., 1977).

La structure tridimensionnelle de la GH hypophysaire de 22 kDa de mammifère a été déterminée par cristallographie (Figure 2). Cette analyse révèle une protéine globulaire asymétrique où 4 hélices α anti-parallèles sont chacune composée de 21-30 acides aminés. Ces hélices sont reliées entre elles par des segments flexibles impliqués dans la liaison aux récepteurs. L'interface des hélices 1 et 4 constituent le site 1 de liaison de haute affinité

représentant plus de 85% de l'activité totale de liaison à son récepteur, alors que les résidus de l'extrémité N-terminale et des hélices 1 et 3 composent le site 2 de plus faible affinité qui ne possède que 8% de l'activité de liaison au premier récepteur (de Vos *et al*., 1992 ; Thomas, 1998). Le cœur central de la molécule de GH est composé d'environ 20 acides aminés hydrophobes. Des groupes plus petits de résidus aminés stabilisent les 4 hélices α.

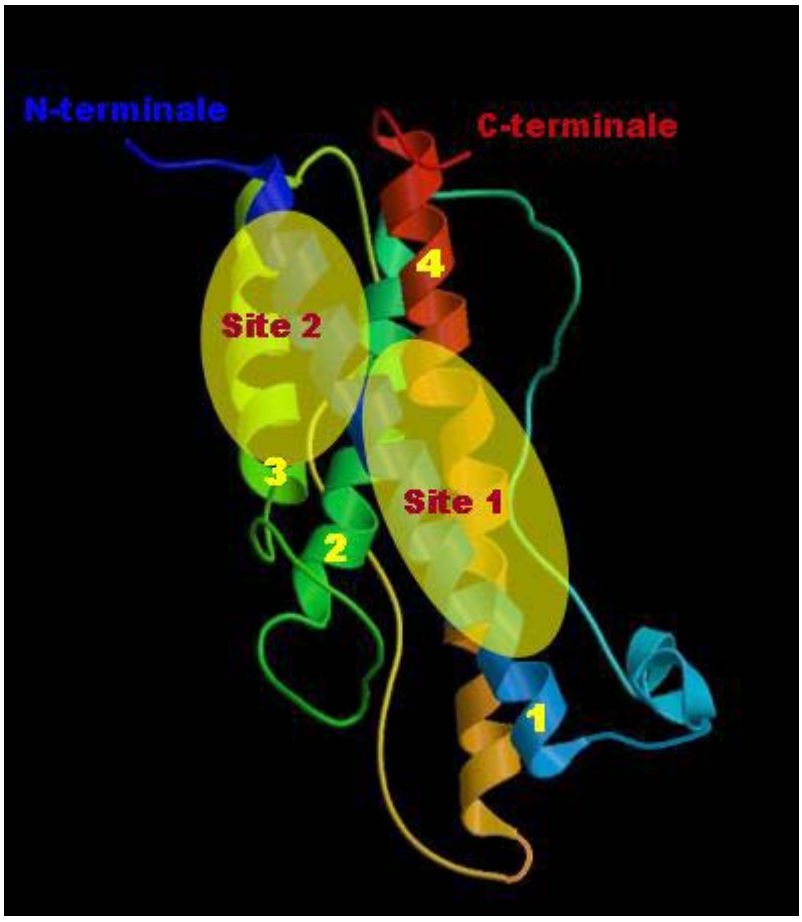


Figure 2 : Structure tridimensionnelle de la GH humaine

La GH est une protéine globulaire asymétrique composée de 4 hélices α anti-parallèles numérotées de 1 à 4. Les sites de liaison 1 et 2 de forte et faible affinité sont représentés par les disques jaunes translucides.

I.3. Expression ectopique de la GH

L'expression non hypophysaire de la GH de 22 kDa a été suspectée à la fin des années 80, au niveau des cellules syncytiotrophoblastiques du placenta (Frankenne *et al*., 1987). Depuis, la GH est de plus en plus considérée comme une cytokine exerçant des fonctions autocrines et/ou paracrines. Elle est synthétisée par le système nerveux central (Selman *et al*., 1994 ; Gossard *et al*., 1987), le système immunitaire (Weigent *et al*., 1988 ;

Recher *et al*., 2001), le système reproducteur (Untergasser *et al*., 1997), la glande mammaire (Mol *et al*., 1995 ; Raccurt *et al*., 2002), les fibroblastes (Palmetshofer *et al*., 1995) et l'embryon (Binder *et al*., 1994 ; Recher *et al*., 2001).

I.4. La sécrétion de la GH

La GH est stockée dans les granules de sécrétion des cellules somatotropes jusqu'à ce qu'un signal de sécrétion conduisant à une entrée de Ca^{2+} dans la cellule obtenue par une augmentation d'AMPc stimule la sécrétion de l'hormone. La libération de GH par les cellules somatotropes a lieu d'une manière pulsatile chez toutes les espèces (Jansson *et al*., 1985 ; MacLeod *et al*., 1991) et est sujette à un contrôle neuroendocrine différent en fonction du sexe et de l'espèce (Figure 3).

I.4.1. Rythme sécrétoire de la GH

Chez le jeune adulte, la GH est sécrétée selon un cycle circadien sur une période de 24 heures, caractérisé par une sécrétion nocturne plus importante quelque soit le moment de l'entrée en phase de sommeil. Cependant, la libération de GH est facilitée lorsque les phases de sommeil lent coïncident avec le pic circadien normal. Les deux sexes voient leur fréquence pulsatile augmentée durant les heures nocturnes. Chez l'homme, le rythme ultradien se traduit par 4 à 5 pics journaliers, les plus importants s'établissant lors des premières heures de sommeil. Chez la femme, les concentrations sériques moyennes sont plus élevées que chez l'homme avec des pics de sécrétion beaucoup plus fréquents. Les différences sexuelles dans les profils de GH plasmatique sont plus manifestes chez les rongeurs. Ils entraînent des différences marquées dans la signalisation intracellulaire induite par la GH et dans le pattern d'expression génique dans le foie en fonction du sexe.

Chez l'Homme, la sécrétion de GH s'effectue tout au long de la vie (Rudman *et al*., 1981), mais décline avec l'âge chez les deux sexes (Corpas *et al*., 1993) se traduisant par une diminution de l'amplitude des pics sans perturbation de leur fréquence (Martin *et al.,* 1997). Cette diminution hormonale conduit à une augmentation de la masse graisseuse corporelle corrélée à une réduction de la masse musculaire, de la masse osseuse et de la synthèse protéique (D'Costa *et al.,* 1993) associées à une diminution de la production d'un facteur hormonal synthétisé par le foie sous le contrôle de la GH, l'IGF-1 (« Insulin-like Growth Factor-1 »).

I.4.2. Régulation de la sécrétion de la GH

La sécrétion de GH est contrôlée principalement par l'action opposée de deux hormones stimulant la sécrétion de GH, la GHRH (« Growth Hormone Releasing Hormone ») et la ghréline, et un peptide hypothalamique, la somatostatine (SS) inhibant sa libération et qui aide à l'établissement de l'amplitude et de la fréquence des pulses (Tuggle et Trenkle, 1996) (Figure 3).

La régulation positive de la synthèse de la hGH a lieu au niveau de la stimulation de la transcription du gène hGH-N par la GHRH, peptide hypothalamique libéré dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (Bloch *et al.,* 1983, 1984 ; Barinaga *et al.,* 1985 ; Morel *et al.,* 1989). Elle est produite par les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus sous forme d'un peptide de 44 acides aminés. Ce dernier se lie et active un récepteur qui lui est spécifique situé à la surface des cellules somatotropes hypophysaires (Morel *et al.,* 1999). Ce récepteur est couplé à une protéine G et son activation par la GHRH induit une augmentation de l'AMPc intracellulaire conduisant à l'ouverture des canaux calciques responsables de l'exocytose des granules de sécrétion contenant la GH (Barinaga *et al.,* 1983). L'AMPc active en retour la protéine kinase A, conduisant à une augmentation de la concentration de Pit-1 dans la cellule somatotrope. Pit-1 est un membre de la famille des facteurs de transcription à homéodomaines POU et se lie à 2 sites de liaison présents dans le promoteur proximal du gène hGH-N. Ainsi, la transcription du gène de hGH-N stimulée par la GHRH est dépendante de Pit-1 (Mayo *et al*., 2000).

La ghréline est un polypeptide produit par la muqueuse gastrique et l'hypothalamus (pour revue, Rosicka *et al*., 2002) qui induit, suite à son interaction avec le récepteur sécrétagogue de la GH (GHsR), l'augmentation des taux de Ca^{2+} au niveau des cellules somatotropes (Figure 3). Elle agit en synergie avec la production d'AMPc obtenue en réponse à la GHRH pour stimuler la sécrétion hypophysaire de GH.

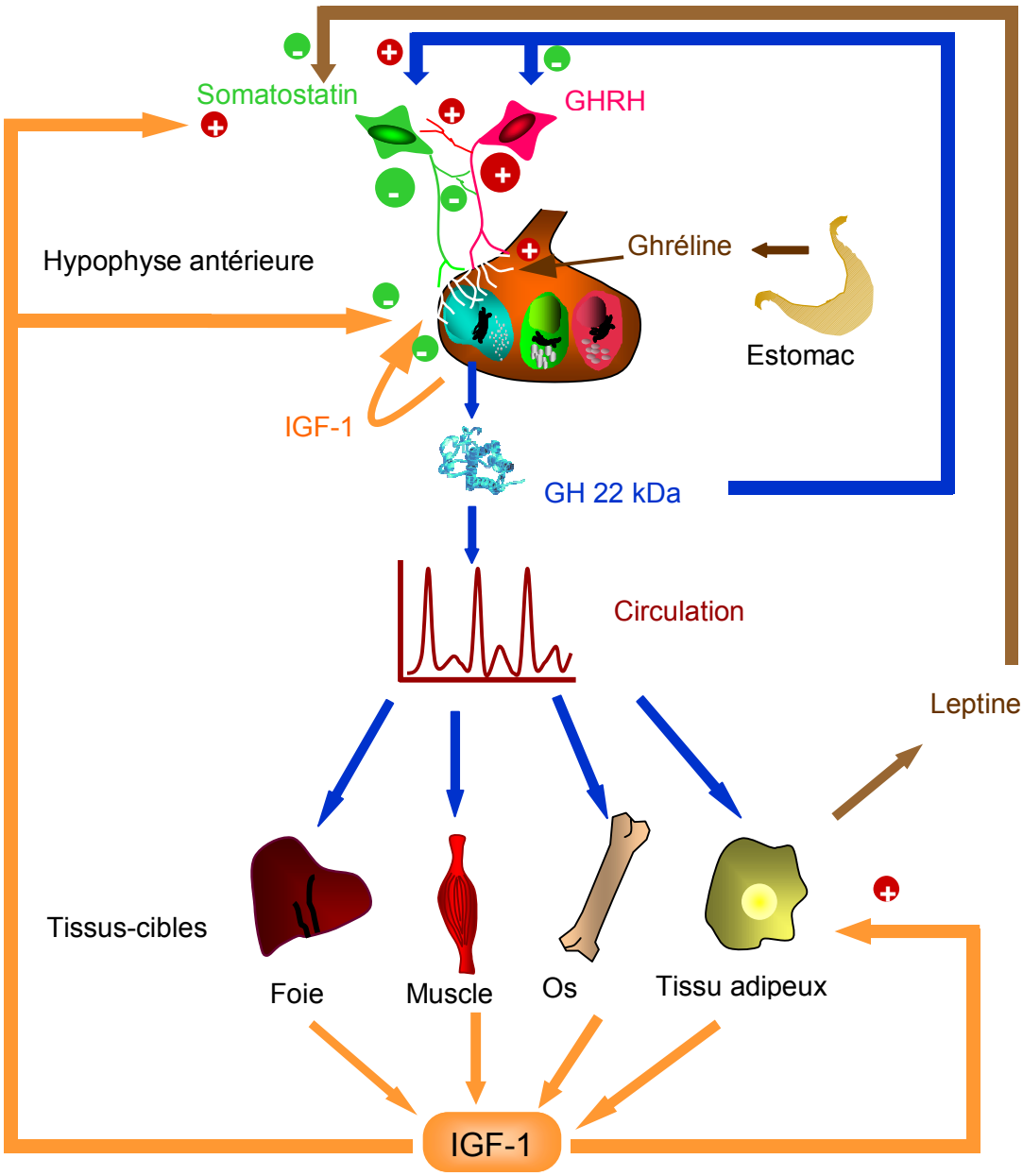


Figure 3 : Représentation schématique de la sécrétion de la GH et de sa régulation

La somatostatine et la GHRH (« Growth Hormone-Releasing Hormone ») produites par l'hypothalamus se contrôlent l'une l'autre par des connexions synaptiques directes. Elles régulent la sécrétion de la GH au niveau des cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure. La GH stimule la sécrétion d'IGF-1 (« Insulin-like Growth Factor ») au niveau de ces cellules-cibles afin de générer une boucle de rétrocontrôle négatif, puis par liaison à son récepteur présent sur ses cellules-cibles, induit la sécrétion paracrine ou endocrine d'IGF-1 de façon à réguler négativement la sécrétion de l'hormone selon une grande boucle de rétrocontrôle négatif. La ghréline, libérée par l'estomac est supposée agir directement au niveau des cellules somatotropes. La leptine, hormone sécrétée par le tissu adipeux, est libérée dans la circulation et induit une stimulation de la sécrétion de GH lors de l'état de jeûne en régulant négativement la somatostatine (d'après, Cheek et Hill, 1974; Kopchick et Andry, 2000).

La sécrétion de GH peut également être régulée par la leptine, hormone peptidique sécrétée par le tissu adipeux impliquée dans la sensation de satiété (Campfield *et al.*, 1995 ; Halaas *et al.*, 1995 ; Pelleymounter *et al.*, 1995), par l'intermédiaire de ses effets exercés sur les activités de la GHRH et de la SS (Figure 3). La leptine constitue un signal majeur du tissu adipeux responsable de l'influence du statut nutritionnel sur la sécrétion de GH. En effet, elle induit une augmentation de l'amplitude de la sécrétion de GH lors de l'état de jeûne (Carro *et al.*, 1997).

En revanche, la sécrétion de hGH-N au niveau de la cellule somatotrope est directement inhibée par la SS, protéine de 28 ou 14 acides aminés, synthétisée par les noyaux péri- et para-ventriculaires de l'hypothalamus (Figures 3, 4).

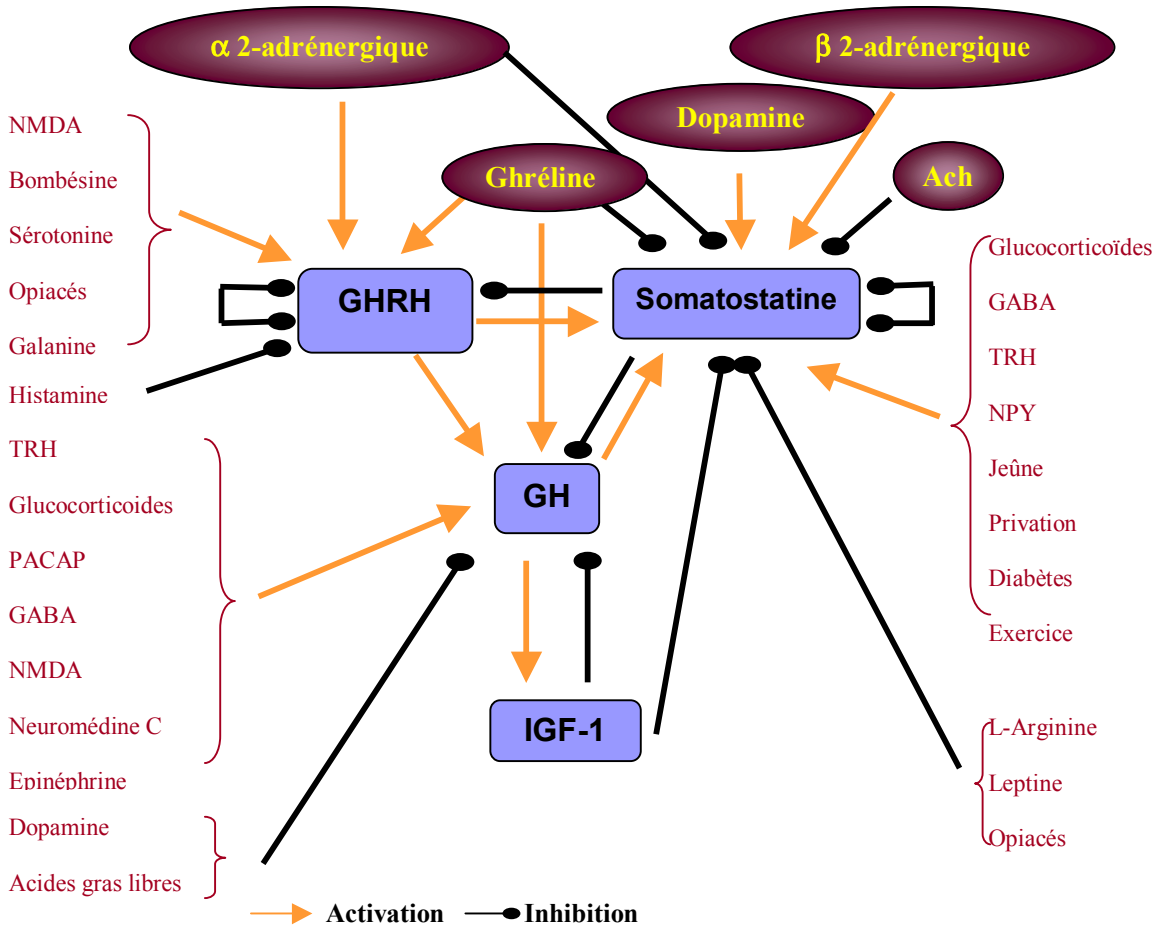


Figure 4 : Régulation de la sécrétion de la GH
(d'après Giustina et Veldhui, 1998)

La GH est libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (Epelbaum *et al.,* 1977) et active d'une manière spécifique un récepteur couplé à une protéine G situé sur la membrane plasmique des cellules somatotropes (Brazeau *et al.,* 1973). La liaison à son récepteur conduit à une diminution des taux d'AMPc intracellulaires bloquant de ce fait l'arrivée consécutive de calcium dans la cellule (Reichlin, 1983 ; Reisine et Bell, 1995). Cependant, son mode d'action est assez complexe. Elle implique une interaction réciproque et constante au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus entre la GHRH, les hormones circulantes et d'autres peptides modulatoires additionnels tels que l'acétylcholine, les monoamines (dopamine, sérotonine, noradrénaline, adrénaline), l'acides gamma amino-butirique (GABA), l'histamine, le peptide intestinal vasoactif (VIP), la galanine, le neuropeptide Y, l'angiotensine II, la « thyrotropin-releasing hormone » (TRH) (Advis *et al.,* 1981 ; Frohman *et al.,* 1992 ; Bluet-Pajot *et al.,* 1993 ; Morel, 1994 ; pour revue, Giustina et Veldhui, 1998) (Figure 4).

Les stéroïdes gonadiques jouent un rôle important dans la modulation des patterns sécrétoires de GH, les œstrogènes agissant au niveau hypothalamique afin d'induire des pulses de sécrétion plus fréquents. L'intervention de ces stéroïdes sexuels conduit à la mise en place de profils de GH plasmatique dépendants du sexe chez plusieurs espèces, notamment chez l'Homme.

Le rétrocontrôle négatif de la libération de la GH est induit par l'hormone elle-même et par l'IGF-1 qui voit son expression stimulée dans le foie mais aussi dans de nombreux autres tissus. Lorsque des animaux hypophysectomisés sont traités avec la GH, une augmentation de l'expression du gène de l'IGF-1 est observée dans le foie, le pancréas, le muscle, l'intestin, la rein, le cerveau et le tissu adipeux (Roberts *et al.*, 1987). Ceci a conduit les investigateurs à conclure à une synthèse tissulaire d'IGF-1 en réponse à la GH. Les effets directs de la GH sur l'hypothalamus agissent par des boucles de rétro-action courtes, alors que ceux induits par l'IGF-1 et autres facteurs circulants influencés par la GH, tels que les acides gras libres et le glucose, impliquent des systèmes d'action beaucoup plus longs. Le rétrocontrôle de la sécrétion de la GH engage alors de nombreux facteurs qui sont activés en fonction des besoins cellulaires et de l'état physiologique tels que l'âge, le sexe, la gestation, la nutrition, l'exercice physique (Hartman *et al.,* 1993 ; Dieguez et Casanueva, 1995 ; pour revue, Giustina et Veldhui, 1998).

Une fois libérée dans le sang, la GH agit au niveau de ses tissus-cibles par l'intermédiaire d'un récepteur qui lui est spécifique ancré dans la membrane plasmique des cellules concernées.

II. LE RECEPTEUR DE L'HORMONE DE CROISSANCE

II.1. Le récepteur de l'hormone de croissance est un récepteur de cytokine

Le récepteur de la GH (GHR) fait partie de la super famille des récepteurs des cytokines (Cosman *et al.,* 1990 ; Ihle *et al.,* 1995) dont l'appartenance est basée sur des similarités mécanistiques et structurelles. En l'occurrence, ce sont des glycoprotéines à un seul domaine transmembranaire dépourvues d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Le GHR a été le premier membre identifié de la classe I, auquel ont été adjoints par la suite les récepteurs de la PRL (prolactine), Ob (leptine), EPO (érythropoïétine), CNTF (« Ciliary Neurotrophic Factor »), la thrombopoiétine, GM-CSF (« Granulocyte-Macrophage Stimulatory Factor »), TNFα (« Tumor Necrosis Factor alpha »), LIF (« Leukaemia Inhibitory Factor »), oncostatine, Il-2 (« Interleukine-2 »), -7, -9, -11, -12, -15 (Bazan, 1989 ; Cosman *et al.,* 1990 ; Cosman, 1993 ; Kitamura *et al.,* 1994). Cette classe renferme également les sous unités d'autres récepteurs, telles que la chaîne α du récepteur de Il-12 et β du récepteur de Il-3 (O'shea *et al.,* 1997). La classe II quant à elle regroupe les récepteurs des IFN (« Interferon ») et les sous unités de récepteurs dont la protéine gp130, la sous unité β du récepteur de LIF, la chaîne γ du récepteur de IL-2 et β du récepteur de IL-3 ainsi que les sous unités α et β des récepteurs de l'IFN-γ (« Interferon gamma ») et de l'Il-10 (Kitamura *et al.,* 1994).

L'existence d'un récepteur pour la GH a été montrée pour la première fois chez le lapin par Tsushima et Friesen en 1973, puis sa purification et sa caractérisation physicochimique ont été rapportées en 1979 par Waters et Friesen. La corrélation entre l'effet biologique de la GH et l'interaction avec son récepteur a été démontrée dès 1983 sur des cultures d'adipocytes (Grichting *et al.,* 1983). Le séquençage de la protéine et le clonage de sa séquence ont été réalisés pour la première fois chez le lapin (Leung *et al.,* 1987), puis chez d'autres espèces telles que l'homme (Godowski *et al.,* 1989 ; Zou *et al.,* 1997), le rat (Mathews *et al.,* 1989), la souris (Smith *et al.,* 1989 ; Menon *et al.,* 1995), le bovin (Hauser

et al., 1990), le porc (Cioffi *et al.,* 1990 ; Bingham *et al.,* 1994), le mouton (Adams *et al.,* 1990) et le poulet (Burnside *et al.,* 1991).

Le gène codant pour le GHR humain contient 9 exons répartis sur 87 kb du chromosome 5 (Godowski *et al.,* 1989). L'ADNc du GHR code pour une protéine native de 638 acides aminés contenant un peptide signal de 18 acides aminés à son extrémité N-terminale. Le GHR humain mature se présente sous la forme d'une chaîne glycoprotéique unique de 620 acides aminés, constituée d'un domaine extracellulaire de 246 acides aminés, d'un seul domaine transmembranaire de 24 acides aminés et d'un domaine intracellulaire de 350 acides aminés impliqué dans la transduction du signal (Leung *et al.,* 1987). Le poids moléculaire du GHR calculé à partir de cette séquence d'acides aminés est de 70 kDa, cependant, la masse réelle est comprise entre 100 et 130 kDa (Leung *et al.,* 1987 ; Spencer *et al.,* 1988, 1990) en fonction du degré des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation et les liaisons multiples à une protéine particulière, l'ubiquitine (*cf.* §IV.1.2).

II.2. La structure du GHR (Figure 5)

II.2.1. Domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire du GHR constitue le site de liaison spécifique du ligand, la GH. La structure de la région extracellulaire du GHR a été déterminée par cristallographie aux rayons X (de Vos *et al.,* 1992). Ce domaine est subdivisé en 2 sous domaines : le domaine I, N-terminal, situé entre les acides aminés 1 et 123 et le domaine II, C-terminal localisé entre les acides aminés 128 et 238, reliés entre eux par une région charnière composée de 4 acides aminés. Chacun de ces sous domaines est composé de 7 brins β organisés en 2 feuillets β antiparallèles.

Ces sous domaines sont bien conservés entre les membres de la première classe des récepteurs des cytokines puisqu'il existe entre eux une homologie de séquence comprise entre 14 et 44% (Bazan, 1989 ; Patthy, 1990*)*. Le sous domaine I possède 5 sites potentiels de N-glycosylation et 7 résidus cystéine dont 6 d'entre eux contribuent à la constitution de 3 ponts disulfures (Cys38-Cys48, Cys83-Cys94, Cys108-Cys122) (Leung *et al.,* 1987) entraînant une stabilité à l'ensemble du domaine extracellulaire. Cette dernière est renforcée par la présence de liaisons hydrogène entre Arg43 et Glu169 et d'un pont salin entre Arg39 et Arg123. Le premier pont disulfure interagit avec la GH *via* des interactions électrostatiques et hydrophobes. Le sous domaine II comprend un motif bien conservé impliqué dans la

liaison du ligand de type WSXWS (trp, ser, X, trp, ser) ou YXXFS chez les mammifères (YGEFS pour le GHR). Les deux sous domaines sont liés par un pont salin (de Vos *et al.,* 1992).

Il existe une forme soluble du GHR, la GHBP ou « Growth Hormone Binding Protein ». Elle est différentiellement générée parmi les espèces puisqu'elle résulte de l'épissage alternatif du gène codant pour le GHR chez les rongeurs (rat, souris) (Baumbach, 1989) avec addition d'une queue hydrophobe dans la partie C-terminale ; ou de la protéolyse de la forme liée à la membrane plasmique chez les autres espèces (Smith *et al.,* 1989). Le clivage protéolytique est catalysé par une métalloprotéase récemment identifiée appelée enzyme de conversion du TNFα (TACE ou ADAM-17) (Zhang *et al.,* 2000 ; Baumann et Frank, 2002). La GHBP est par conséquent identique au domaine extracellulaire du GHR lorsqu'elle est générée par protéolyse. Son véritable rôle physiologique est encore mal connu même si elle lie la GH avec une forte affinité. Jusqu'à 60% de la GH plasmatique est liée à la GHBP, créant ainsi un réservoir circulant de GH, permettant de prolonger la demi-vie de l'hormone en la protégeant de la dégradation et en diminuant son taux de clairance (Baumann *et al.,* 1988 ; Clark *et al.,* 1996 ; Lobie et Waxman, 2003). Elle améliorerait par conséquent l'activité biologique de l'hormone *in vivo* et agirait comme régulateur négatif des effets de la GH par compétition avec le GHR pour la liaison de la GH (Mannor *et al.,* 1991).

II.2.2. Domaine intracellulaire

Ses principales caractéristiques partagées avec les autres membres de la super famille des récepteurs des cytokines sont l'absence de séquence tyrosine kinase, l'existence de 2 courts domaines particuliers riches en proline appelés boîte 1 et boîte 2 (Bazan, 1989 ; Patthy, 1990), et la présence de résidus tyrosine, chacun étant phosphorylé suite à l'activation du récepteur par le ligand.

La boîte 1, représentant le motif le mieux connu, est située dans la région du domaine cytoplasmique proche de la membrane (Smit *et al.,* 1999) entre les résidus 297 et 311, après les 20 premiers acides aminés du domaine intracellulaire. Elle représente le site de liaison à une protéine de la famille des Janus tyrosine kinases (Jak) nommée Jak2 pour le GHR (Wilks et Harpur, 1994) dont l'interaction permet l'activation de la plupart des voies de transduction du signal induites par la GH (Goujon *et al.,* 1994 ; VanderKuur *et al.,* 1994 ; Frank *et al.,* 1995) (*cf.* §III).

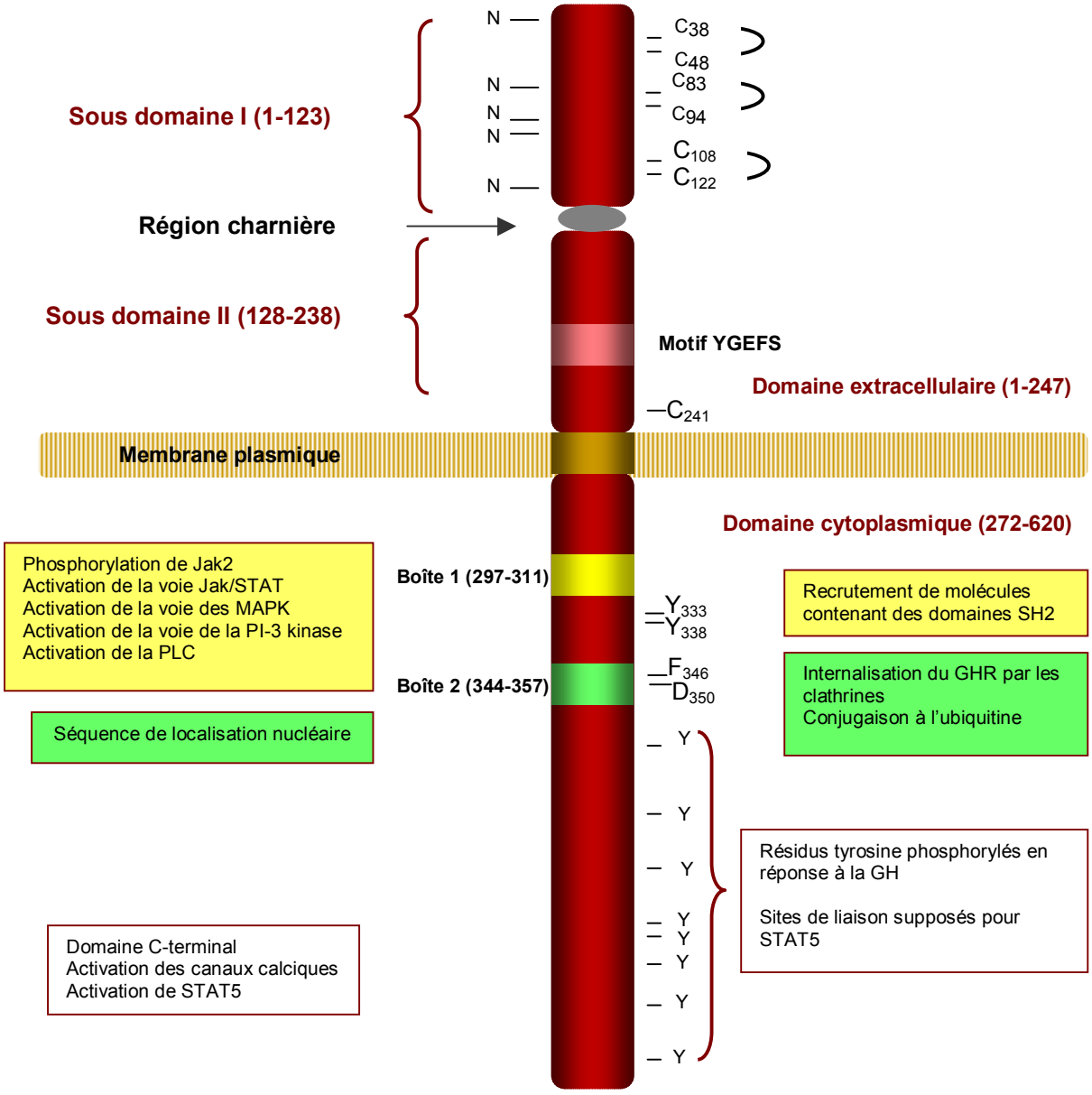


Figure 5 : Structure primaire du GHR de rat

Le domaine extracellulaire est divisé en deux sous domaines (I et II) reliés entre eux par une région charnière. Le sous domaine II semble s'arrêter au niveau du résidu 238 (De Vos *et al.*, 1992) d'après les études réalisées sur la GHBP (« Growth Hormone Binding Protein »). Le résidu Cys241 serait impliqué dans la formation d'un dimère de GHR stabilisé par des ponts disulfure (Goldsmith *et al.*, 1997). Le domaine intracellulaire contient 2 motifs particuliers, la boîte 1 impliquée dans la liaison du GHR avec une protéine kinase (Wilks et Harpur, 1994) et la boîte 2 contenant le résidu responsable de la conjugaison de l'ubiquitine au GHR (Govers *et al.*, 1999). Ce domaine présente également de nombreux sites de phosphorylation constitués par les résidus tyrosine (Y) (Bazan, 1989; Patthy, 1990).

De ce fait, la boîte 1 représente un point critique pour la plupart des fonctions cellulaires stimulées par la GH (Goujon *et al.,* 1994 ; VanderKuur *et al.,* 1994 ; Wang *et al.,* 1994 ;

Frank *et al.,* 1995) mais nécessite la mise à disposition d'autres résidus situés plus en aval du domaine.

En effet, un récepteur privé de son domaine C-terminal, toujours capable d'interagir avec Jak2, ne peut activer des molécules de signalisation majeures, notamment STAT-5 « Signal Transducer and Activator of Transcription » (Argetsinger *et al.,* 1996). La mutation des résidus proline de la boîte 1 en alanine empêche la transduction du signal induite par la GH, tout comme une délétion complète de cette région (Goujon *et al.,* 1994). Les résidus tyrosine 333 et 338, phosphorylés en réponse à la GH sembleraient participer au recrutement de certaines molécules de signalisation contenant des domaines SH2, spécifiques de la signalisation induite par la GH (Vanderkuur *et al.,* 1995).

La boîte 2 est moins bien définie et n'est conservée que chez 50% des membres de la famille des récepteurs des cytokines. Elle est située environ à 30 acides aminés en aval de la boîte 1 et comprend une quinzaine de résidus. Elle débute par un ensemble de résidus hydrophobes et se termine par 1 ou 2 acides aminés chargés positivement (Jans *et al.,* 1998).

Plusieurs motifs, appelés codes d'endocytose ou signaux d'internalisation, sont nécessaire à l'internalisation efficace des récepteurs des cytokines (Trowbridge *et al.,* 1993 ; Kirchhausen *et al.,* 1997). Un résidu particulier impliqué dans le processus d'internalisation a été identifié par l'équipe de Nielsen en 1995. Il s'agit du résidu F346 chez le rat (Allevato *et al.,* 1995) ou F327 chez le lapin (Govers *et al.,* 1997). Les études qui ont suivi ont permis d'inclure ce résidu dans un motif particulier nommé UbE pour « ubiquitin-dependent endocytosis » dont la séquence comprend 10 acides aminés : ^{322}DSWVEFIELD^{331} (Govers *et al.,* 1999). L'équipe de Strous a permis de mettre en évidence l'implication de ce domaine dans la liaison du récepteur à l'ubiquitine, une protéine impliquée dans les processus d'internalisation (Govers *et al.,* 1999). Aussi, la présence de 7 tétrapeptides est envisagée dans la structure primaire du GHR de rat pour adopter une configuration particulière appelée « β-turn » (Chou et Fasman, 1978), dont l'existence a été démontrée dans la structure du récepteur de la prolactine de rat (Vincent *et al.,* 1997). En effet, une première configuration serait envisagée et se terminerait par 2 résidus leucine adjacents : Asp311-Pro312-Asp313-Leu314-Leu315. Trois autres configurations « β-turn » seraient positionnées entre les résidus 330 et 344 faisant partie d'une région contiguë au résidu F346 (Vleurick *et al.,* 1999).

Une séquence supposée de localisation nucléaire (NLS pour « Nuclear Localisation Sequence ») a été proposée pour le GHR humain dont le motif caractéristique est VRVRSRQRN (Jans *et al.,* 1998). En effet, une forme de récepteur dépourvue du résidu 255

ne présente pas de NLS supposée et ne se retrouve pas dans le noyau. Cependant, la forme soluble du GHR, la GHBP, peut s'accumuler dans le compartiment nucléaire alors que sa séquence ne présente pas de NLS (Graichen *et al*., 2003). Depuis, aucune étude n'a corroboré la présence de cette NLS au niveau du GHR.

En plus de ces motifs, le GHR possède 19 sites potentiels de conjugaison à l'ubiquitine, constitués par des résidus lysine, un résidu pouvant lier plusieurs motifs d'ubiquitine. La partie N-terminale du récepteur contient également un certain nombre de résidus tyrosine susceptibles d'être phosphorylés suite à la liaison de la GH à son récepteur.

Afin d'exercer ses effets sur ses tissu-cibles, la GH se lie à son récepteur d'une manière séquentielle induisant la formation d'un complexe GH-GHR_2 initiateur de la transduction intracellulaire du signal.

III. LA TRANSDUCTION DU SIGNAL INDUITE PAR LA GH

III.1. Dimérisation du GHR

Afin de pallier l'absence d'activité tyrosine kinase intrinsèque, le récepteur de la GH est lié de façon constitutive à une protéine tyrosine kinase Jak2 (*cf.* §III.2) (Franck *et al*., 1994a). Cette interaction, découverte également pour d'autres membres de cette famille de récepteurs, nécessite la présence d'une région proche de la membrane riche en résidus proline, la boîte 1. Cependant, malgré cette association indépendante du ligand, diverses études ont montré que l'interaction entre Jak2 et le GHR est améliorée en présence de GH (Argetsinger *et al*., 1993 ; Franck *et al*., 1994b). L'augmentation de cette interaction reflèterait la capacité du ligand à induire un changement structurel dans l'organisation ou l'orientation du domaine extracellulaire du GHR conférant au domaine cytoplasmique la capacité de lier Jak2 avec une meilleure affinité et productivité.

Cependant, l'homodimérisation elle-même du GHR ne suffit pas pour activer la transduction du signal puisque l'administration d'anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire du GHR provoque la dimérisation du GHR mais échoue dans l'induction de la transduction du signal (Rowlinson *et al.*, 1998). Avec un anticorps dirigé contre la région charnière située entre les 2 sous domaines du domaine extracellulaire (Mellado *et al.*, 1997), un changement de conformation a été mis en évidence suite à la liaison du ligand. La

reconnaissance du GHR par cet anticorps est améliorée après liaison de la GH, mais pas lorsqu'un antagoniste de la GH, le GH-G120R (obtenu par mutation ponctuelle du résidu glycine de la hGH en arginine), comprenant un seul site de liaison au GHR, est utilisé (Mellado *et al.*, 1997). Récemment, Ross *et al.* (2001) ont démontré une augmentation du nombre de sites de liaison pour la GH suite à une incubation avec un anticorps monoclonal dirigé contre le sous domaine II, probablement en empêchant la formation du dimère. Une augmentation similaire a été observée lorsque l'antagoniste monovalent B2036 était utilisé. Les auteurs ont suggéré la liaison de l'antagoniste à un homodimère préformé en l'absence d'anticorps monoclonal.

Jusqu'à présent, seule la structure du complexe GH-GHR_2 a pu être mise en évidence (de Vos *et al.*, 1992). Toutefois, l'idée prédominante favorisait l'hypothèse selon laquelle la GH initiait la dimérisation, au vu de mesures obtenues sur des systèmes de culture cellulaire où l'action de la GH dépendait de sa concentration (Fuh *et al.*, 1992). Le modèle généralement admis postule qu'une molécule de GH se lie dans un premier temps sur un premier récepteur *via* son site 1 de haute affinité, puis un second récepteur est recruté et la GH s'y associe *via* son site 2 de plus faible affinité (Figure 6). Le complexe ainsi établi est capable d'initier la transduction du signal et d'être internalisé.

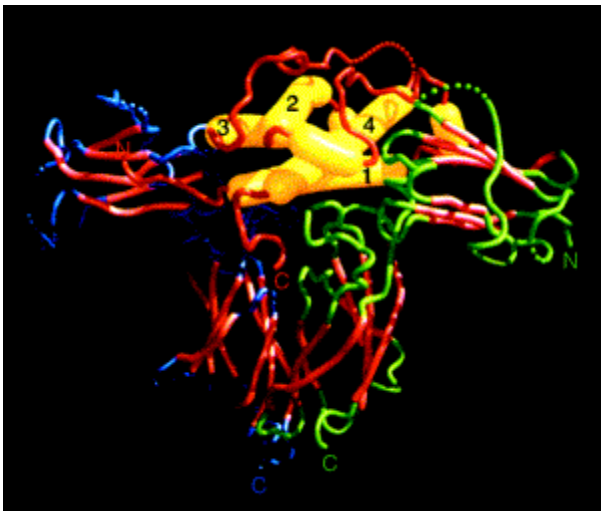


Figure 6 : Modèle de la hGH complexée à ses récepteurs

Les deux molécules de hGHR utilisent les mêmes déterminants afin de reconnaître sites de liaison de la GH de différentes affinités (de Vos *et al.*, 1992).

L'équipe de Frank (1994a) a observé dans plusieurs lignées cellulaires la formation d'un homodimère de GHR induite par la GH détectable uniquement dans des conditions non dénaturantes (Frank *et al.*, 1994a ; Goldsmith *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1999a, 2001). Cette forme de GHR liée par des ponts disulfures s'annule lorsque le résidu Cys241 proche de la membrane plasmique est muté. Ce résidu cystéine est hautement conservé parmi les espèces. Son rôle est encore incertain, mais les premiers résultats suggèrent qu'un dimère de GHR lié par un pont disulfure bénéficierait d'un trafic intracellulaire différent d'un dimère de GHR dépourvu de cette liaison covalente en réponse à la GH (Goldsmith *et al.*, 1997).

Alors que l'état de dimérisation est important pour l'endocytose dépendante de l'ubiquitine, protéine impliquée dans le processus d'internalisation (*cf.* §IV.1.1), la dimérisation aurait probablement lieu dans le réticulum endoplasmique (Figure 7). Comme pour la plupart des complexes multiprotéiques, le réticulum endoplasmique offre le meilleur environnement pour la formation de dimères par la présence de protéines chaperonnes à de hautes concentrations. De plus, durant ou immédiatement après la translocation dans la lumière du réticulum endoplasmique, les concentrations locales de GHR sont vraisemblablement élevées puisque un polyribosome programmé pour traduire un ARNm codant pour un unique GHR insère de multiples précurseurs de GHR adjacents dans la membrane du réticulum endoplasmique (Palade, 1975). Une fois dimérisés, il semblerait que les GHR restent associés pendant le transport vers la membrane cellulaire. La présence de ces dimères à la surface cellulaire offre une plus grande rapidité dans la mise en place de la transduction du signal. Premièrement, comme la liaison de la GH est supposée être séquentielle (Cunningham *et al.*, 1991), le recrutement d'un deuxième GHR est réalisée efficacement, sans perte de temps. Deuxièmement, de basses concentrations de ligand seraient toujours capables d'initier la signalisation du GHR, ce qui est particulièrement avantageux pour les cellules présentant de faibles taux de GHR. La structure cristallographique a montré que le complexe ternaire GH-GHR_2 est stabilisé par l'interaction entre les deux récepteurs adjacents *via* le sous domaine II de chaque domaine extracellulaire (de Vos *et al*., 1992) dans une région assez vaste dénommée interface d'interaction. Cette interface inclut 6 ponts intermoléculaires entre les 2 domaines extracellulaires et occupe 500 $Å^2$, comparé aux surfaces qui sont d'environ de 1230 $Å^2$ pour l'interaction du site 1 de la GH au premier GHR et de 900 $Å^2$ pour celle du site 2 de la GH au deuxième GHR. Initialement, cette interaction était supposée avoir pour but de stabiliser la liaison du second récepteur au complexe (Cunningham et Wells, 1993 ; Wells *et al*., 1993).

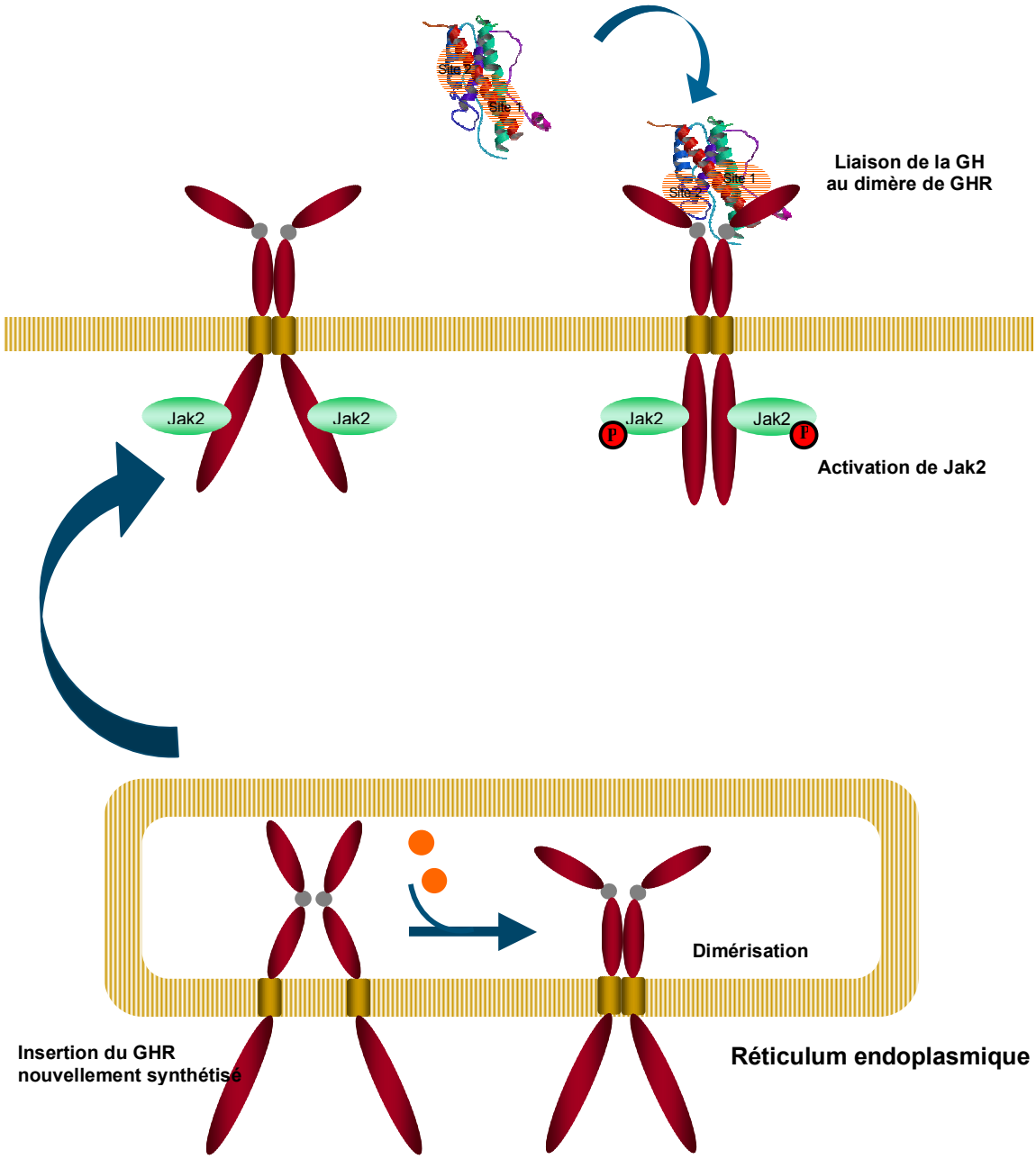


Figure 7 : Modèle d'homodimérisation du GHR indépendante du ligand

Dans le réticulum endoplasmique, la dimérisation des GHR endoplasmique est assistée de protéines chaperonnes (●). Elle débute par l'interaction des sous domaines II puis est stabilisée par l'interaction des domaines transmembranaires. Le dimère ainsi formé est acheminé à la membrane plasmique où la liaison de la GH induit un changement conformationnel permettant aux molécules Jak2 d'être activées (d'après Gent *et al*., 2002).

Une analyse de mutagenèse de la structure cristallographique du complexe GH-GHR_2 avait révélé l'importance des résidus S145, H150, D152, Y200 et S201 (de Vos *et al*., 1992 ; Chen *et al*., 1997). L'équipe de Strous (Gent *et al*., 2003) a montré que les mutations ponctuelles (D152H, Y200D et S201K) dans le sous domaine II n'avaient aucune influence

sur la dimérisation du GHR indépendante du ligand. Un traitement par la protéinase K a montré que le domaine extracellulaire n'est pas suffisant au maintien de la dimérisation, ce qui implique que soit le domaine transmembranaire, soit le domaine cytoplasmique, ou les 2, contiennent le domaine de dimérisation. La co-transfection d'un GHR entier et d'un mutant du GHR délété de la quasi-totalité du domaine intracellulaire, diminue la capacité de signalisation de ces cellules vraisemblablement par la formation d'hétérodimères (Ross *et al*., 1997).

Par conséquent, la dimérisation du GHR serait entreprise par le domaine transmembranaire indépendamment du ligand, ce qui corrobore les découvertes concernant le récepteur de l'EPO (Constantinescu *et al*., 2001), l'EGF (Mendrola *et al*., 2002), les sous unités α et β des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC-II) (Cosson et Bonifacino, 1992) et la glycophorine A (Lemmon *et al*., 1992). Bien que le domaine transmembranaire soit nécessaire à la dimérisation, il ne semble pas suffisant. Les protéines cytosoliques ou de la lumière du RE faciliteraient le repliement et le positionnement des domaines extra et intracellulaires de sorte que les domaines transmembranaires puissent dimériser. De plus, l'absence de dimérisation résulte seulement de la délétion du domaine extracellulaire du GHR. Ainsi, le domaine extracellulaire, quoique non impliqué dans le maintien de la dimérisation, fonctionnerait dans le processus d'assemblage (Gent *et al.,* 2002).

En résumé, ces résultats supposent une révision du modèle de dimérisation du GHR induite par la GH (Figure 7). L'équipe de Strous (Gent *et al.,* 2002) propose que la dimérisation du GHR a lieu dans le réticulum endoplasmique, ce qui nécessiterait une interaction initiale entre les sous domaines II des domaines extracellulaires facilitée par la présence des protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique. Puis les domaines transmembranaires interagissent et verrouillent le GHR sous forme d'homodimère. Le domaine extracellulaire n'est alors plus nécessaire à la dimérisation. Il semblerait que les récepteurs restent associés durant le transport vers la membrane plasmique. Là, la liaison de la GH au complexe induit un changement conformationnel permettant l'activation des Jak2. Ce modèle est en accord avec l'absence d'initiation de la transduction du signal lorsqu'une GH monovalente antagoniste est trouvée dans un complexe ternaire comprenant 2 molécules de GHR (Harding *et al*., 1996 ; van Kerkhof *et al*., 2002). L'inhibition des réponses cellulaires observées avec de hautes concentrations de GH semblerait résulter de la formation d'un monomère non fonctionnel d'une molécule de GH liée à un récepteur par l'intermédiaire de son site 1 de haute affinité (pour revue, Frank, 2002).

La dimérisation du récepteur de la GH fournit probablement le signal pour générer la réponse biologique (Fuh *et al*., 1992 ; Wells *et al*., 1993). Cette dimérisation est impliquée dans la transduction du signal de la même manière que d'autres récepteurs des cytokines (Kishimoto *et al.,* 1994).

III.2. Evénement d'initiation de la transduction du signal

Comme nous venons de le voir, le GHR, de la même façon que les récepteurs des cytokines, se trouve associé de façon constitutive à une protéine Janus tyrosine kinase (Jak). La famille des tyrosines kinases Janus est supposée représenter le type prédominant de kinases non récepteurs nécessaire à l'initiation de la transduction du signal de la GH (Foster *et al*., 1988 ; Argetsinger *et al*., 1993 ; Silva *et al*., 1993). Les membres de la famille Jak incluent jusqu'à présent, Jak1, 2, 3 et Tyk2 (Ihle *et al*., 1995). L'unique caractéristique commune des Janus kinases est l'absence de domaine SH2 ou SH3 et la présence de 7 régions conservées JH (JH1-JH7), où JH1 est un domaine catalytique fonctionnel et JH2 un domaine pseudokinase. Ce dernier régule négativement l'activité de Jak2 probablement *via* une interaction avec son domaine kinase et est nécessaire au maintien de Jak2 sous forme inactive en l'absence de stimulus (Saharinen *et al*., 2000).

La protéine Jak impliquée de façon prédominante dans la transduction du signal du GHR est Jak2 (Argestsinger *et al*., 1993 ; Thirone *et al*., 1999), bien que la GH induise la phosphorylation des résidus tyrosine de Jak1 (Smit *et al*., 1996) et Jak3 (Johnston *et al*., 1994).

Suite à la dimérisation du GHR (ou au changement conformationnel résultant de la liaison du ligand au dimère préformé), les Jak associées au GHR adoptent une disposition spatiale permettant leur transphosphorylation et l'activation catalytique du domaine kinase. La région du GHR proche de la membrane riche en proline nommée boîte 1 est nécessaire à l'association et à l'activation de Jak2 (Sotiropoulos *et al*., 1994 ; Vanderkuur *et al*., 1994) (Figure 8). Bien que la boîte 1 soit suffisante pour l'activation de Jak2, l'activation maximale nécessite la présence des résidus plus distaux, apparemment fondamentaux pour la stabilisation de l'interaction entre Jak2 et le GHR. Les Jak ne possèdent pas de domaine SH3 qui lie typiquement les domaines riches en proline. Il est par conséquent possible que l'association de Jak au GHR puisse être assistée d'une protéine adaptatrice contenant un domaine SH3 (Finodori, 2000). A cet égard, la formation de complexes de signalisation multiprotéiques après stimulation par la GH décrite par Zhu *et al*. (2001) offre une

perspective intéressante (*cf.* §III.3.1.). En retour, les Jak phosphorylent le domaine intracellulaire du GHR. Celui-ci et les Jak ainsi phosphorylés fournissent des sites de liaison pour une variété de molécules de signalisation contenant des domaines SH2 ou autres motifs liant les phosphotyrosines.

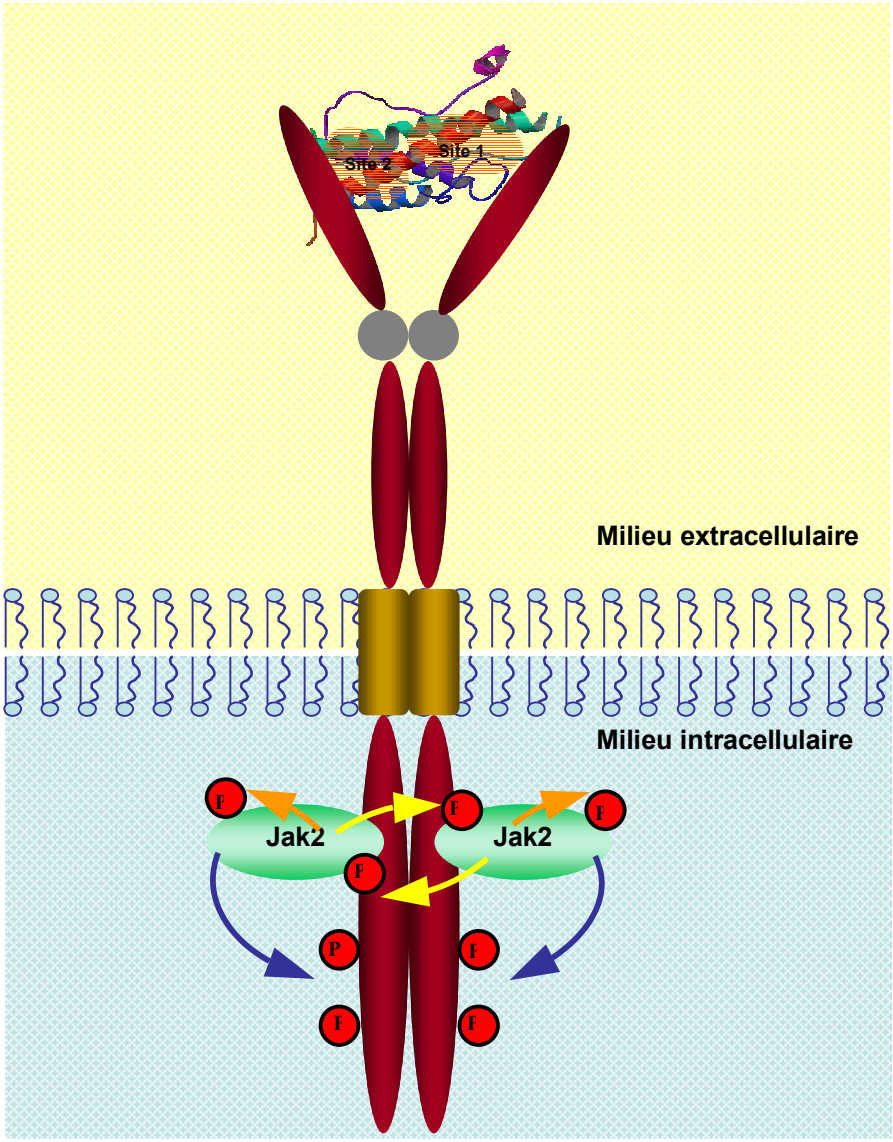


Figure 8 : Modèle de l'activation de la tyrosine kinase Jak2 par la GH

La liaison de la GH au dimère de GHR augmente l'affinité de chaque récepteur pour Jak2. La proximité des GHR permet aux molécules Jak2 de se phosphoryler entre elles sur leurs résidus tyrosine activateurs (flèches jaunes) afin de s'activer. Les Jak2 s'autophosphorylent alors (flèches oranges) et phosphorylent les résidus tyrosine des GHR (flèches bleues). Ces résidus tyrosine phosphorylés constituent des sites de liaison pour les protéines de signalisation (d'après Herrington et Carter-Su, 2001).

Jusqu'à présent, quasiment toutes les voies de signalisation utilisées par la GH nécessitent apparemment l'activité de Jak2. Le seul effet indépendant de Jak2 est l'entrée de calcium *via* les canaux calciques de type L (Billestrup *et al*., 1995) (Figure 9).

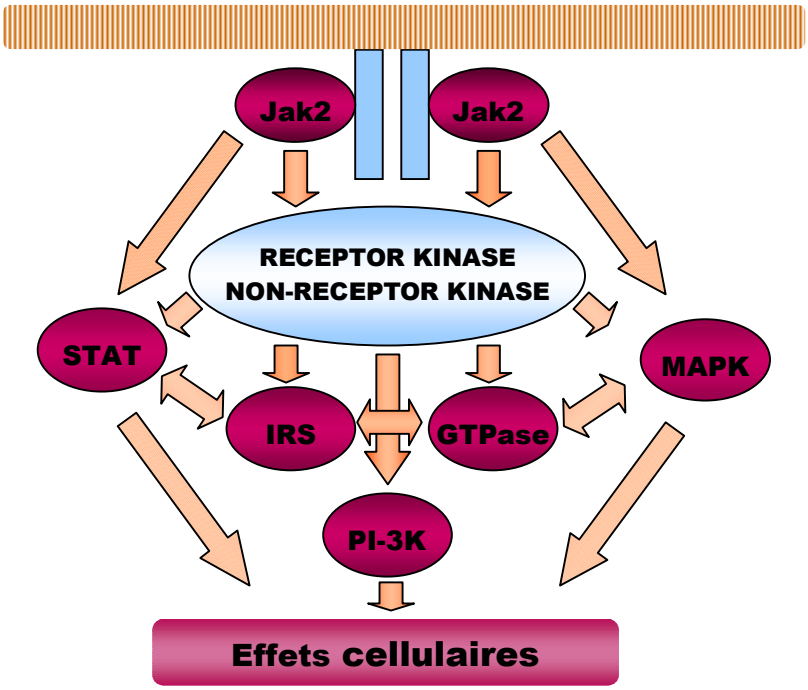


Figure 9 : Représentation simplifiée du mécanisme de transduction du signal de la GH

La liaison de la GH à son récepteur de surface induit la dimérisation du GHR et l'activation de Jak2. Jak2 est responsable de l 'activation consécutive de plusieurs groupes de molécules de signalisation parmi lesquels figurent: 1) d 'autres récepteurs (EGFR) et des kinases (c-Src, c-Fyn, fak), 2) des membres de la famille des MAPK (MAPK p42/44, MAPK p38 et JNK/SAPK), 3) des membres du groupe des IRS (IRS-1, IRS-2 et IRS-3), 4) des petites Ras-like GTPases et 5) des membres de la famille des STAT (STAT1, STAT3, STAT5a et STAT5b) (d'après Zhu *et al*., 2001).

III.3. Les différentes voies de transduction du signal induites par la GH

III.3.1. Complexes multiprotéiques

L'assemblage de complexes de signalisation multiprotéiques représente un mécanisme commun pour la transduction du signal de différents récepteurs (Pawson, 1995). De nombreuses voies de signalisation sont signifiées par l'oligomérisation de protéines en complexes multi-sous unités, incluant différentes enzymes et molécules adaptatrices. Bien

que les molécules adaptatrices ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque, leur habilité à induire les interactions protéine-protéine est vitale pour l'intégration et la propagation de la cascade de transduction du signal. La plupart des molécules adaptatrices identifiées dans la transduction du signal de la GH sont des protéines contenant des domaines SH2/SH3 ou des domaines capables de phoshporyler des résidus tyrosine. La fonction majeure attribuée à ces adaptateurs, tels que Grb2, Nck et Crk, est de recruter des molécules effectrices riches en proline à proximité des kinases phosphorylées ou de leurs substrats. La GH stimule la formation d'un complexe de signalisation multiprotéique centré autour de 2 protéines : CrkII et p130Cas (Figure 10).

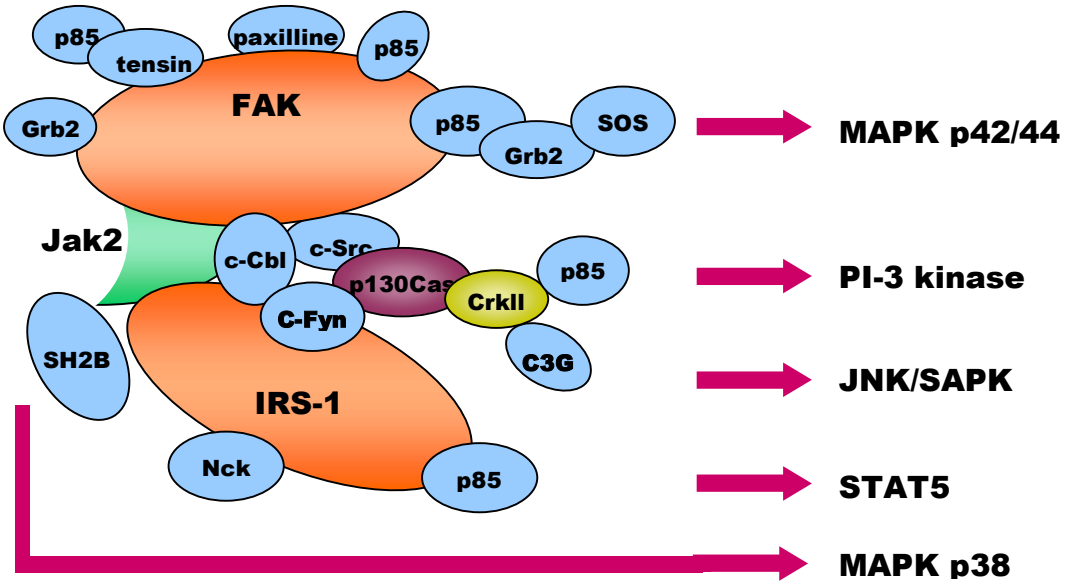


Figure 10 : Représentation schématique du complexe de signalisation multiprotéique après une stimulation par la GH

Le complexe de signalisation multiprotéique régule positivement ou négativement les voies de transduction du signal situées en aval (d'après Zhu *et al.,* 2001).

CrkII est un régulateur positif puissant de l'activité PI-3 kinase stimulée par la GH. La surexpression de CrkII réduit également l'activité de la MAPK p42/44 (« Mitogen-Activated Protein Kinase») stimulée par la GH (Goh *et al.,* 2000). L'activation de Rac par la GH n'a pas encore été rapportée, mais Rac facilite l'activation de Jak2 par d'autres cytokines (Simon *et al.,* 2000).

La formation d'autres complexes plus petits a été décrite en réponse à une stimulation par la GH faisant intervenir le GHR, Jak2, SHP-2 et une glycoprotéine (Kim *et al*., 1998) ou

encore STAT-5, MAPK p42, SHC et une protéine similaire à Akt-1 (Dinerstein-Cali *et al*., 2000).

L'utilisation de la protéine FAK («Focal Adhesion Kinase ») pour la transduction du signal permet au signal de la GH d'être propagé par de multiples voies alternatives. La protéine FAK, a été identifiée à l'origine en tant que protéine abondamment phosphorylée sur ses résidus tyrosine dans les cellules transformées v-Src (Schlaepfer et Hunter, 1997 ; Cary et Guan, 1999 ; Schlaepfer *et al.,* 1999). Elle est localisée principalement au niveau des jonctions cellulaires, d'où le nom qui lui a été attribué (Guan et Chen, 1996 ; Schlaepfer *et al.,* 1999). FAK est capable de lier directement la PI-3 kinase (« Phospatidyl Inositol-3 kinase ») d'une façon dépendante de sa phosphorylation (Chen et Guan, 1994 ; Schlaepfer et Hunter, 1997). Le fait que les protéines CrkII et FAK soient toutes deux capables d'activer la même kinase, la PI-3 kinase, permettrait à la cellule de répondre précisément aux stimuli hormonaux en fonction du type cellulaire et du niveau de différenciation. La GH stimule également l'activation de la MAPK p42/44 *via* SHC et Grb2 associées à Jak2 (Vanderkuur *et al.,* 1994 ; Winston et Hunter, 1995). FAK sert ainsi de site de liaison pour le complexe Grb2-SOS *in vivo* et *in vitro* (Schlaepfer et Hunter, 1997) et pour la protéine SHC. Puisque FAK, SHC et Grb2 sont associées à Jak2, il est possible que l'association de Grb2 et SHC à Jak2 soit induite par FAK. Celle-ci représenterait un intermédiaire amont de la voie des MAPK stimulée par la GH (Schlaepfer et Hunter, 1997). La protéine FAK est fondamentale dans le rôle cellulaire sur le remodelage de la matrice extracellulaire (Guan et Chen, 1996 ; Schlaepfer *et al.,* 1999). Elle intervient dans la médiation de plusieurs réponses cellulaires telles que l'altération de la morphologie cellulaire, la motilité et la prolifération cellulaire (Guan et Chen, 1996 ; Schlaepfer *et al.,* 1999 ; Rodriguez-Fernandez, 1999). La GH active FAK, conduisant à la phosphorylation des résidus tyrosine des 2 substrats associés à FAK, la paxilline et la tensine. La GH, parmi ses actions pléiotropes, stimule la chémotaxie et la migration des monocytes (Zhu *et al.,* 1998a).

III.3.2. La voie de la régulation de la transcription des gènes par la GH : la voie des Ras-MAPK, « Mitogene Activated Protein Kinase » et des Jak/STAT, « Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription »

La GH exerce beaucoup de ses fonctions physiologiques par la régulation de transcription de gènes codant pour une variété de protéines dont IGF-1, les facteurs de transcription et les enzymes. La famille des facteurs de transcription STAT représente des

molécules clé dans ce processus de signalisation. Jak2 activée par la GH phosphoryle au moins 4 membres de cette famille (STAT-1, -3, -5a et -5b) conduisant à leur dimérisation, localisation nucléaire, liaison à l'ADN et activation de la transcription (Herrington *et al*., 2000). Une autre voie importante pour la régulation de la transcription des gènes est celle des Ras-MAPK. La GH active cette voie par une phosphorylation de la protéine SHC *via* Jak2 (Smit *et al*., 1999).

III.3.2.1. La voie des MAPK

Les MAPK activées notamment par la GH, jouent un rôle essentiel dans la régulation de la croissance et de la différenciation (Cobb *et al*., 1991). Cette activation nécessite la présence de la boîte 1 du GHR, région impliquée dans l'activation de Jak2 (Vanderkuur *et al*., 1994). La GH stimule l'association de protéines SHC aux complexes Jak2-GHR par l'intermédiaire du domaine SH2 des protéines SHC qui sont phosphorylées par Jak2, permettant ainsi leur association à Grb2 (Figure 11).

En réponse à la GH (Winston et Hunter, 1995 ; Vanderkuur *et al*., 1997), l'activation de la MAPK p42/44 intervient suite à une cascade de phosphorylations séquentielle impliquant SHC, Grb2, SOS, Ras, Raf et MAP/ERK kinase (MEK) (Lewis *et al*., 1998 ; Cobb, 1999). La GH dispose de différents mécanismes alternatifs afin de stimuler cette voie. L'activité de la PI-3 kinase (Kilgour *et al*., 1996 ; Liang *et al*., 2000) et de la PKC (« Protein Kinase C ») (Mac Kenzie *et al*., 1997) sont toutes deux nécessaires à l'activation complète des MAPK par la GH (Kilgour *et al*., 1996). D'autres voies de transduction du signal régulent la capacité de la GH à activer la MAPK p42/44. Cette activation dépend du type cellulaire (Love *et al*., 1998).

La MAPK p42/44 phosphoryle et/ou active les protéines telles que p70S6K, p90RSK, Sap-1 a (Clarkson *et al*., 1999), la phospholipase A2 (PLA2) (Tollet *et al*., 1995), c-Raf-1, c-jun, le facteur complexe ternaire (p62TCF/Elk1) et les molécules STAT (Campbell *et al*., 1995 ; Sotiropoulos *et al*., 1995 ; Wood *et al*., 1995 ; Lewis *et al*., 1998 ; Cobb, 1999). La GH utilise ces protéines dans les voies de transduction du signal qu'elle active (Argetsinger et Carter-Su, 1996 ; Thomas, 1998 ; Finidori, 2000). L'activation de la PLA2, par exemple, augmente le taux d'acide arachidonique et l'apparition de ses métabolites (Tollet *et al*., 1995). Ces derniers sont impliqués dans la stimulation de la transcription du gène P4502C12 chez le rat, codant pour une enzyme engagée dans la catalyse dépendante du Ca^{2+} de différents composés hydrophobes (Tollet *et al*., 1995). La MAPK p42/44 est également connue pour

réguler la transcription par association directe des molécules STAT et en phosphorylant leurs résidus sérine (Horvath et Darnell, 1997).

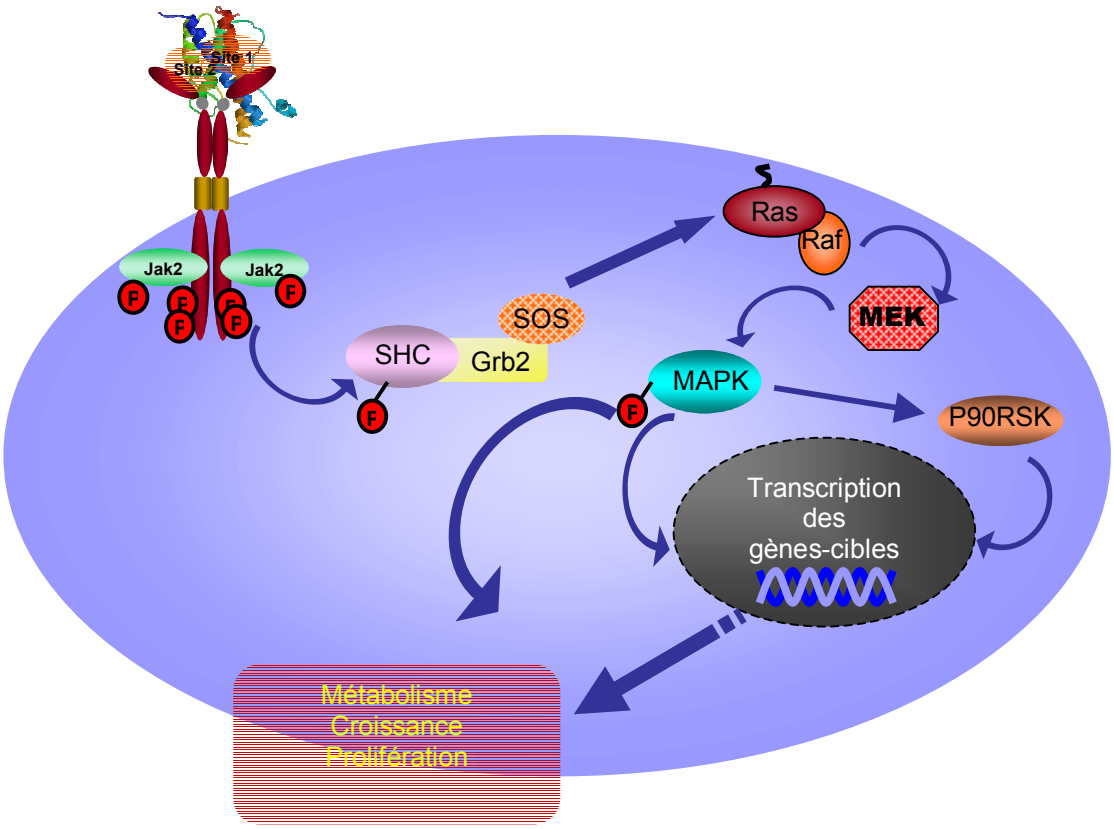


Figure 11 : La voie des MAPK

Jak2 active la protéine SHC, conduisant l'association de Grb2 et SOS. Puis, les MAPK sont phosphorylées par les MEK. Les MAPK interviennent dans la régulation de la transcription des gènes et activent leurs substrats dont p90RSK. MAPK : « mitogen-activated protéin kinase », SHC : «SH2-containing sequence», SOS : « Son Of Sevenless », MEK : « MAP/ERK Kinase » (d'après Carter-Su *et al*., 1996 ; Herrington et Carter-Su, 2001).

La formation du complexe de signalisation multiprotéique centré autour de la protéine FAK (Zhu *et al.,* 1998a) et de p130Cas-CrkII (Zhu *et al.,* 1998b), conduit à l'activation de JNK/SAPK (Zhu *et al.,* 1998b ; Goh *et al.,* 2000). L'activation de ce complexe induit la phosphorylation de la protéine adaptatrice Nck et son intégration avec C3G, protéine d'échange de la guanine, dans le complexe p130Cas-CrkII (Tanaka *et al.,* 1997 ; Su *et al.,* 1997). JNK/SAPK fournit alors une autre voie par laquelle la GH affecterait de nombreuses fonctions cellulaires dont la régulation transcriptionnelle et l'apoptose (Herdegen *et al.,*

1997). L'activation de JNK/SAPK par la GH, comme pour celle de la MAPK p42/44, est dépendante de PI-3 kinase (Goh *et al.,* 2000).

Il a été récemment démontré que la GH phosphoryle et active la p38 MAPK (Zuh et Lobie, 2000) dans des cellules CHO transfectées avec l'ADNc codant pour le GHR d'une façon dépendante de Jak2. La p38 MAPK est nécessaire à l'activation de ATF-2 et à la transcription induite par la protéine CHOP (« C/EBP Homologous Protein ») (Mertani *et al*., 2001). Elle est également nécessaire à la réorganisation du cytosquelette d'actine et à la mitogenèse stimulées par la GH (Zhu et Lobie, 2000). La production autocrine de GH par le carcinome mammaire humain (Raccurt *et al*., 2002) est à l'origine d'une régulation positive du gène codant pour CHOP et d'une augmentation consécutive de l'expression de la protéine (Mertani *et al.,* 2001). L'augmentation de la transcription par la protéine CHOP en réponse à la GH est dépendante de la p38 MAPK *via* un mécanisme anti-apoptotique. Il apparaît donc évident que l'activation de p38 MAPK par la GH est un élément important pour la médiation des effets cellulaires pléiotropes de la GH.

III.3.2.2. La voie des Jak/STAT

La voie des Jak/STAT est la voie privilégiée de transduction du signal induite par la liaison de la GH à son récepteur (Figure 12). Les substrats des Jak les plus étudiés sont les protéines STAT, la seule famille connue des facteurs de transcription dont l'activité est régulée par phosphorylation de leurs résidus tyrosine (Shuai, 1999) et sérine (Decker et Kovarik, 2000) (*cf.* §III.4). Jusqu'à présent, 7 protéines STAT ont été identifiées chez les mammifères : STAT-1, -2, -3, -4, -5a et -5b et -6 (pour revue, Kisseleva *et al*., 2002). Elles sont composées de 750 à 850 acides aminés. Elles partagent des domaines conservés dans leur fonction et leur structure. En effet, leurs domaines N-terminal, CDD (« Coiled-Coiled Domain ») se présentant sous forme d'hélices α, de liaison à l'ADN DBD (« DNA Binding Domain »), « linker » leur permettant la liaison du DBD au domaine d'activation tyrosine/SH2 sont équivalents. En revanche, le domaine d'activation de la transcription C-terminal, TAD (« Transcriptional Activation Domain ») diverge selon le type de STAT et contribue à leur spécificité.

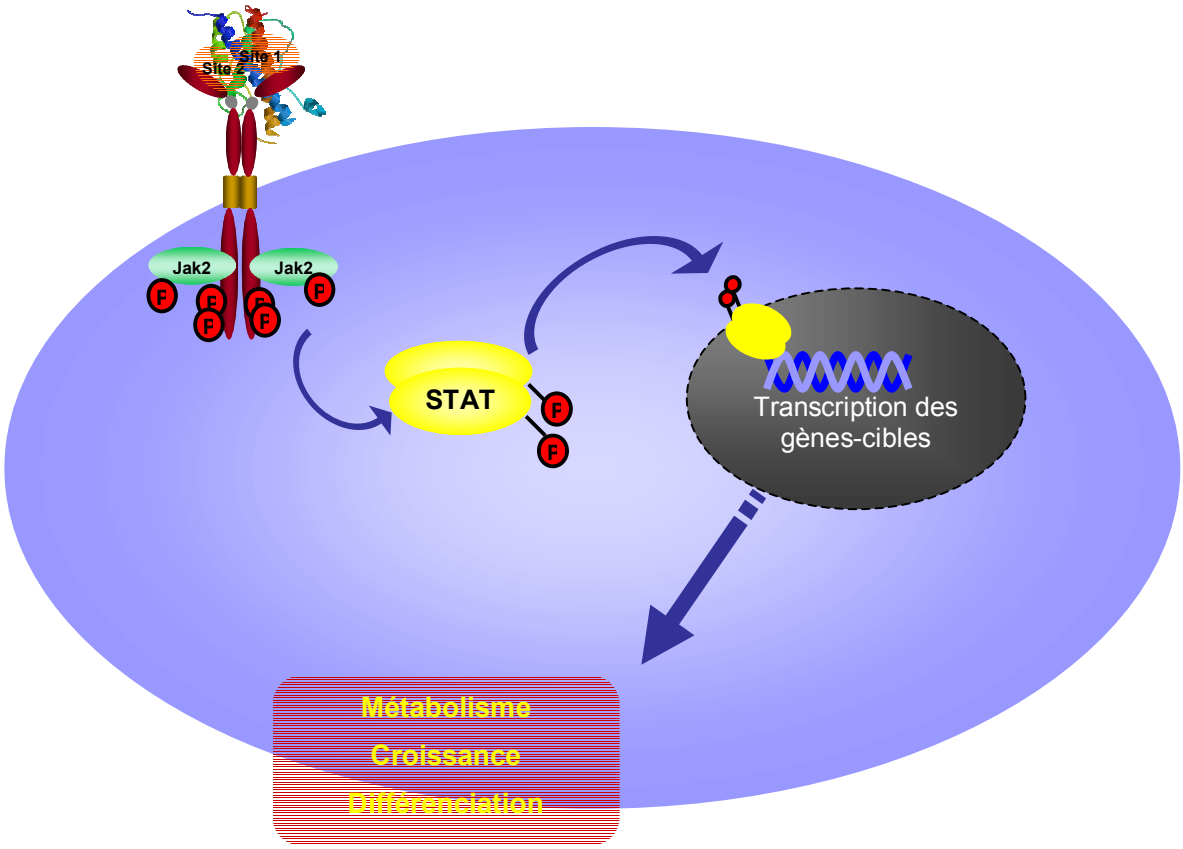


Figure 12 : La voie des Jak/STAT

Jak2 phosphoryle les facteurs de transcription STAT qui régulent la transcription des gènes par liaison directe avec l'ADN. STAT : « Signal Transducers and Activators of Transcription » (d'après Herrington et Carter-Su, 2001).

Les STAT sont recrutées à proximité des Jak et se lient par l'intermédiaire de leurs domaines SH2 qui phosphorylent les résidus tyrosine des domaines cytoplasmiques de chaque GHR. La phosphorylation des résidus tyrosine des STAT par les Jak permet leur activation. Les STAT se dissocient alors du GHR sous forme d'un homo- ou d'un hétéro-dimère formés par l'interaction réciproque des résidus tyrosine phosphorylés de leurs domaines SH2. Elles sont alors transloquées dans le noyau, où elles se lient aux éléments de réponse de l'ADN pour stimuler la transcription (pour revue, Zhu *et al*., 2001). L'activation de STAT-1, -3 et -5 par la GH nécessite la présence et l'activité de Jak2 (Han *et al.,* 1996 ; Goffin et Kelly, 1997 ;Vanderkuur *et al.,* 1997 ; Carter-Su *et al.,* 2000a). STAT-1 et -3 sont activées par Jak2 mais ne nécessitent pas la présence des résidus tyrosine C-terminaux du domaine intracellulaire du GHR, au contraire de STAT-5 (Hansen *et al.,* 1996). Bien que les Jak représentent les kinases prédominantes pour l'activation des STAT, des récepteurs

tyrosine kinases (EGF-R, PDGF-R, par exemple) peuvent également phosphoryler les STAT *in vivo* sans exiger la présence de Jak (Leaman *et al.,* 1996 ; Vignais et Gilman, 1999 ; Paukku *et al.,* 2000 ; Wang *et al.,* 2000). Il reste à déterminer si ce phénomène se produit dans la signalisation de la GH. L'activation complète des STAT nécessite également la phosphorylation par la MAPK (Horvath et Darnell, 1997) ou par la PI-3 kinase (Pfeffer *et al.,* 1997) de ses résidus sérine (Horvath et Darnell, 1997).

Les rôles physiologiques des STAT dans la transduction du signal de la GH ne sont pas encore pleinement élucidés, bien que la voie dépendante des STAT soit généralement admise comme étant impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire, ainsi que dans le processus d'apoptose (Shuai, 1999). Les voies de la MAPK p42/44 et de la p38 MAPK sont en principe responsables de la prolifération cellulaire attribuée à la GH (Zhu et Lobie, 2000). Cependant, la GH stimule la formation d'homodimères de STAT-1, et STAT-3 (Sotiropoulos *et al.,* 1995) et d'hétérodimères STAT-1/STAT-3 se liant tous au SIE (« *Sis*-Inducible Element ») du gène c-fos impliqué dans la prolifération cellulaire (Meyer *et al.,* 1994 ; Campbell *et al.,* 1995). STAT-5, représentant la forme préférentiellement utilisée par la GH (Bergad *et al.,* 1995 ; Waxman *et al.,* 1995 ; Choi et Waxman, 2000 ; Delesque-Touchard *et al.,* 2000 ; Lahuna *et al.,* 2000 ; Waxman, 2000), intervient dans les réponses au dimorphisme sexuel de l'expression des gènes hépatiques du mode de sécrétion de la GH chez le male (pulsatile) et la femelle (continu) (Waxman *et al.,* 1995), et la croissance corporelle. STAT-5 régule également la transcription du gène de l'insuline (Galsgaard *et al.,* 1996) et STAT-5b est nécessaire à la lipolyse du tissu adipeux stimulée par la GH (Fain *et al.,* 1999).

La régulation transcriptionnelle des gènes eucaryotes implique l'interaction spécifique et ordonnée d'un grand nombre de protéines incluant les facteurs de transcription spécifiques de promoteurs et « enhancers », et des composants de la machinerie transcriptionnelle basale (Maniatis *et al.,* 1998 ; Pugh, 2000). De nombreuses études ont décrit de fortes interactions entre les molécules STAT et d'autres régulateurs de transcription. En l'occurrence, STAT-1 avec NFκB , SP1, USF-1, PU.1 et le récepteur des glucocorticoïdes (Look *et al.,* 1995, Ohmori *et al.,* 1997 ; Muhlethaler-Mottet *et al.,* 1998 ; Aittomaki *et al.,* 2000) ; STAT-3 interagit avec SP1, c-jun et le récepteur des glucocorticoïdes (Schaefer *et al.,* 1997 ; Cantwell *et al.,* 1998 ; Zhang *et al.,* 1999b) ; STAT-5 avec YY-1, SP1, C/EBPβ et le récepteurs des glucocorticoïdes (Meier et Groner, 1994 ; Stocklin *et al.,* 1996, Martino *et al.,* 2001 ; Wyszomierski et Rosen, 2001). D'autres études ont démontré l'association entre des STAT et des protéines qui facilitent la transcription par des modifications de la chromatine, comme

par exemple STAT-2 qui interagit avec CBP/p300 (Bhattacharya *et al.,* 1996), ou d'autres STAT avec BRCA1, Mcm5, Nmi et HMG-1(Y) (Zhang *et al.,* 1998 ; Zhu *et al.,* 1999 ; Ouchi *et al.,* 2000 ; Kim *et al.,* 2001). Des protéines non nucléaires pourraient également intervenir, telles que stIP1, WD40 qui facilitent l'interaction entre Jak, STAT, STAM, une famille de protéine se liant à Jak et SH2-B (Takeshita *et al.,* 1997 ; Carter-Su *et al.,* 2000b ; Collum *et al.,* 2000).

L'activation des Jak et STAT par la GH constitue 2 événements indépendants mais apparentés dont la combinaison aboutit à des réponses biologiques complexes et aussi variées que la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires.

III.3.2.3. Les RTK : les récepteurs à activité tyrosine kinase

Des études (Wu *et al.,* 1995 ; Yamauchi *et al.,* 1997) ont suggéré la possibilité d'interactions croisées directe ou indirecte entre les membres des récepteurs des cytokines et les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) ou entre les RTK. Ceci impliquerait en particulier une interaction fonctionnelle entre le GHR et les membres de la sous famille EGFR (Yamauchi *et al.,* 1997). Cette sous famille comprend 4 membres étroitement apparentés : EGFR (ErbB1), ErbB2 (HER/Neu), ErbB3 (HER3) et ErbB4 (HER4). Il a été montré notamment qu'en réponse à la GH, EGFR était phosphorylé par Jak2 mais restait inactif. Cette phosphorylation servirait d'élément intermédiaire utilisant le site majeur de liaison de Grb2 pour obtenir l'activation de la MAPK p42/44 (Yamauchi *et al.,* 1997). La GH stimule également la déphosphorylation des résidus tyrosine et la phosphorylation des résidus sérine et thréonine de ErbB2 (Kim *et al.,* 1999) dans des pré-adipocytes 3T3-F442A conduisant à l'inactivation du GHR et à l'arrêt du cycle cellulaire (Nam et Lobie, 2000). L'inactivation des RTK induite par la GH doit par conséquent être rapportée aux besoins cellulaires pour le processus de la prolifération cellulaire. Il est fort probable que les RTK constitueront des éléments centraux dans la médiation de plusieurs des effets pléïotropes de la GH.

III.3.3. La voie de la PI-3 kinase, « Phosphatidylinositol-3 kinase »

La GH et l'insuline partagent plusieurs effets cellulaires communs incluant la stimulation du transport des acides aminés, de la synthèse protéique, du transport du glucose, de la lipogenèse (Ridderstrale *et al.,* 1994), de l'expression de certains gènes (Davidson,

1987), de la mitogenèse, de la prévention de l'apoptose (Eisenhauer *et al.,* 1995), de la différenciation et la réorganisation de l'architecture du cytosquelette (Goh *et al.,* 1997). Ainsi, la GH et l'insuline sont supposées utiliser des composants communs des voies de transduction du signal. En effet, la GH stimule la phosphorylation de IRS-1, -2 et -3, (« Insulin Receptor Substrate ») (Souza *et al.,* 1994 ; Argetsinger *et al.,* 1995, 1996b ; Ridderstrale *et al.,* 1995 ;; Yamauchi *et al.,* 1998) responsables de l'activation de la PI-3 kinase dans une grande variété de types cellulaires *in vitro* et *in vivo* (Yenush et White, 1997 ; White, 1998) (Figure 13).

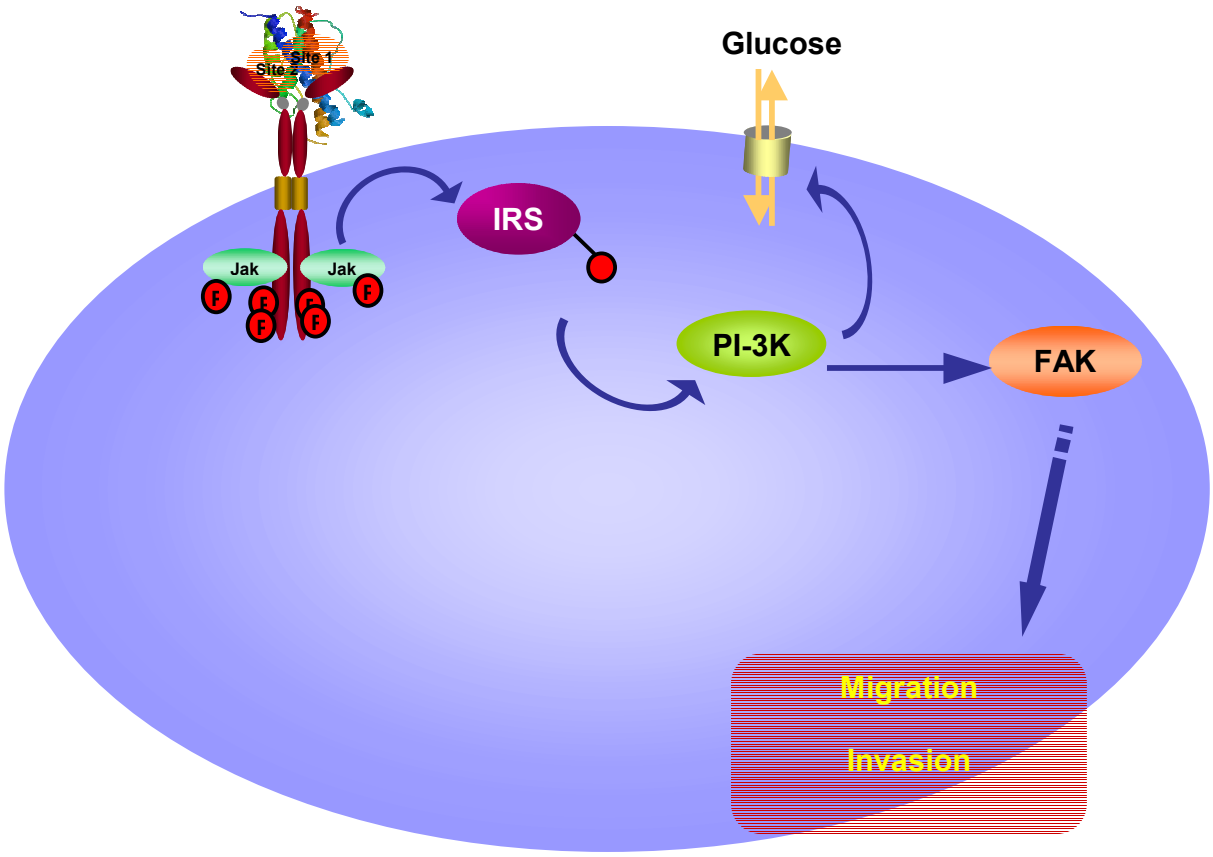


Figure 13 : La voie de la PI-3 kinase

Jak2 phosphoryle les protéines IRS, qui entraîne l'activation de la PI-3 kinase. L'activation de la PI-3 kinase *via* les protéines IRS et FAK pourrait jouer un rôle important dans la stimulation du transport du glucose et dans la migration et l'invasion cellulaires, respectivement. JAK2 : « Janus kinase 2 », IRS : « insulin receptor substrat », PI-3K : « phosphatidylinositol 3-kinase », FAK : « Focal Adhesion Kinase (d'après Herrington et Carter-Su, 2001).

La phosphorylation des résidus tyrosine des protéines IRS par Jak2 fournit un site de liaison pour le domaine SH2 de la sous unité régulatrice de 85 kDa de la PI-3 kinase

(Ridderstrale et Tornqvist, 1994 ; Ridderstrale *et al.,* 1995 ; Yamauchi *et al.,* 1998 ; Smit *et al.,* 1999). IRS-1 représente l'un des composants du complexe de signalisation multiprotéique centré autour de CrkII (Zhu *et al.,* 1998b), qui intervient probablement comme une molécule adaptatrice permettant la liaison de IRS-1 au complexe multiprotéique.

Alors que le transport du glucose stimulé par l'insuline est bien dépendant de la PI-3 kinase, le transport de glucose induit par la GH ne l'est pas (Sakaue *et al.,* 1997). Cependant, l'activation de la PI-3 kinase est indispensable à la synthèse lipidique dépendante de la GH (Ridderstrale et Tornqvist, 1994) et à l'action anti-lipolytique de l'hormone (Yamauchi *et al.,* 1998), montrant l'importance de l'activité de la PI-3 kinase pour l'action insulinomimétique de la GH.

De nombreux événements dépendants de la PI-3 kinase sont induits par d'autres voies de signalisation situées en aval. La GH active notamment la sérine/thréonine kinase Akt/PKB d'une manière dépendante de la PI-3 kinase afin de délivrer un signal anti-apoptotique (Costoya *et al.,* 1999 ; Liang *et al.,* 2000). La PI-3 kinase représente donc une molécule effectrice pivot située en aval des IRS, et serait impliquée dans de nombreux processus cellulaires dont la prolifération, la survie, la réorganisation et le métabolisme cellulaires (Yenush et White, 1997 ; White, 1998).

III.3.4. La voie de la phospholipase C/PKC/Ca^{2+}

Un mécanisme de signalisation utilisé par tous les membres de la superfamille des récepteurs des cytokines est l'utilisation des métabolites IP-3 (1,4,5-triphosphate) et DAG (Diacyl glycérol) issus de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate catalysée par la PLC (phospholipase C) comme second messagers (Figure 14). La GH induit la phosphorylation de la PLC-γ par interaction directe (Moutoussamy *et al*., 1998) avec le complexe GHR-Jak2 conduisant à une augmentation rapide mais transitoire du taux de DAG intracellulaire (Doglio *et al.,* 1989 ; Jonhson *et al.,* 1990 ; Tollet *et al.,* 1991). Le DAG est le principal activateur direct de la PKC (protéine kinase C), bien que le Ca^{2+} puisse aussi induire l'activation des PKC en augmentant leur affinité pour les phospholipides anioniques (Ron et Kazaniets, 1999 ; Musashi *et al.,* 2000). La PKC intervient dans le couplage et la propagation du signal de la GH (Ron et Kazanietz, 1999 ; Musashi *et al.,* 2000) en phosphorylant les résidus sérine et thréonine d'une grande variété de protéines cellulaires (Toker, 2000). La PKC est nécessaire notamment à la lipogenèse (Gurland *et al.,* 1990), l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} (Gaur *et al.,* 1996), l'activation de la MAPK p42/44

(MacKenzie *et al.,* 1997) ou de la p70S6K, ainsi qu'à l'internalisation et la dégradation du GHR ou au clivage du GHR lié à la membrane afin de libérer la GHBP (Rui *et al.,* 2000).

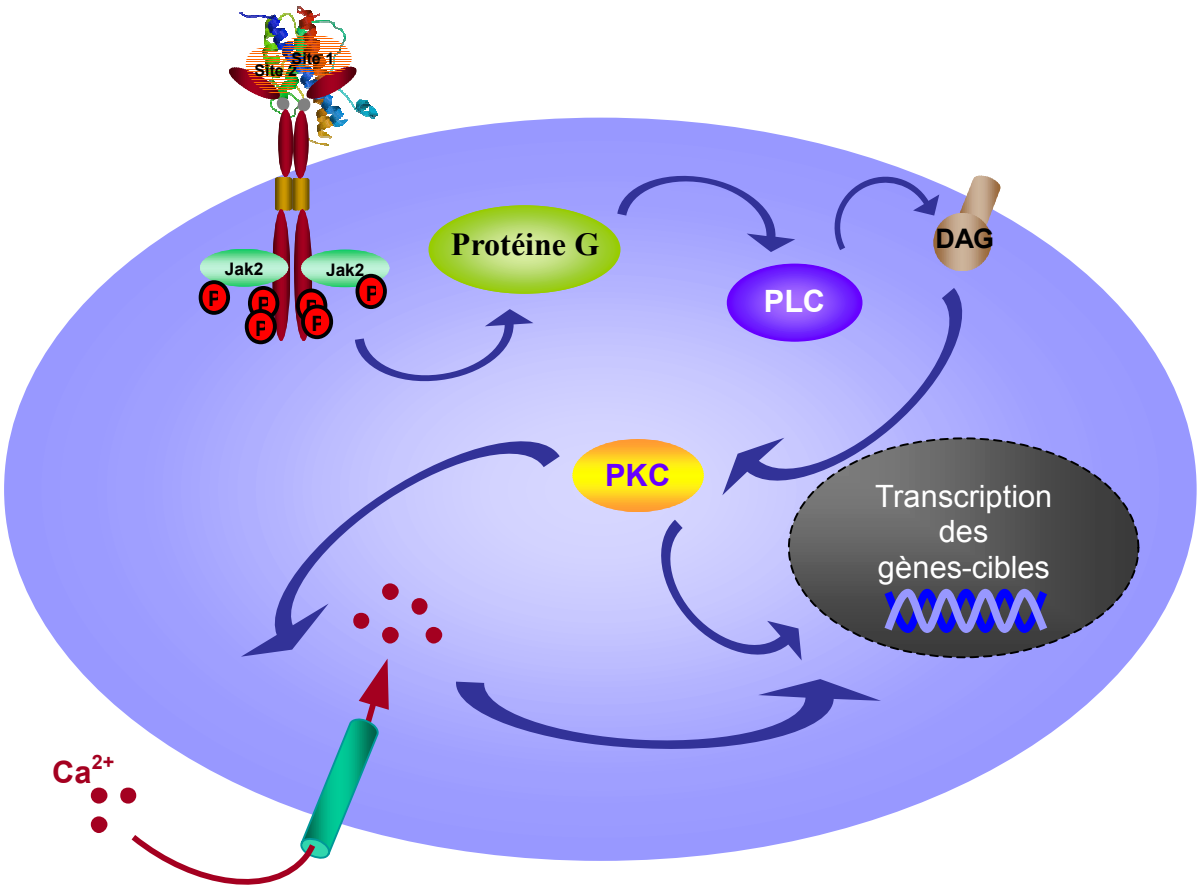


Figure 14 : La voie de la PLC/PKC/Ca^{2+}

La voie de signalisation de la PKC est activée par une augmentation de DAG consécutive à la stimulation par la GH de la PLC. PKC : protéine kinase C, PLC : phospholipase C, DAG : diacylglycérol (d'après Herrington et Carter-Su, 2001).

Les concentrations intracellulaires de calcium libre peuvent être augmentées par 2 mécanismes majeurs : par l'afflux de Ca^{2+} extracellulaire au travers des canaux voltage-dépendants de la membrane plasmique ou par la mobilisation des stocks intracellulaires de Ca^{2+} (Cruzalegui et Bading, 2000). Le métabolite IP-3 quant à lui provoque une augmentation transitoire de Ca^{2+} intracellulaire libre. Cette augmentation intracellulaire de Ca^{2+} activée par la GH est apparemment dépendante de la PKC (Gaur *et al.,* 1996). Elle

nécessite la présence du domaine C-terminal du GHR mais pas de la boîte 1 (Billestrup *et al.,* 1995).

De nombreuses recherches sont encore nécessaires à la compréhension des cibles cellulaires situées en aval de l'élévation intracellulaire de Ca^{2+} stimulée par la GH.

III.4. La régulation de la transduction du signal

Le modèle de sécrétion de la GH dans le flux sanguin représente un facteur important dans la détermination de la régulation des gènes impliqués dans la croissance résultant du dimorphisme sexuel (Davey *et al.,* 1999a). Ainsi, l'intensité et l'enchaînement des signaux émanant des complexes GHR-Jak2 modulent l'action de la GH (Figure 15).

III.4.1.La régulation négative de la signalisation de la GH

L'existence d'une régulation négative de la transduction du signal des récepteurs des cytokines permet de contrôler précisément l'ampleur et la durée du signal induit par la GH. La voie d'internalisation et de dégradation du complexe GHR-Jak2 (Gebert *et al.,* 1999a,b), permettant la disparition du GHR de la surface cellulaire et la désactivation des molécules de la signalisation, est un élément critique de la régulation de la transduction du signal de la GH.

III.4.1.1. Régulation de la disponibilité de GHR à la surface cellulaire.

Les cellules utilisent couramment plusieurs mécanismes pour protéger leurs récepteurs d'une activation prolongée. Ceux-ci incluent la génération de récepteurs solubles, qui entrent en compétition avec les récepteurs membranaires afin de limiter la quantité de ligand disponible. Ces isoformes sont produites soit par protéolyse soit par épissage alternatif afin de générer la GHBP. Un mécanisme plus commun de régulation négative est l'endocytose du récepteur *via* la voie des clathrines (Vleurick *et al.,* 1999) et des cavéoles (Lobie *et al.,* 1999). La conjugaison de l'ubiquitine au GHR est nécessaire à l'internalisation par la voie des clathrines et sa dégradation protéosomale (Strous *et al.,* 1996 ; van Kerkhof *et al.,* 2000), le GHR possédant un motif spécifique pour l'internalisation et « l'ubiquitination » dans sa région cytoplasmique (Govers *et al.,* 1999) (*cf.* §IV.1.2). L'activation de la PKC agirait comme un stimulus pour supprimer le GHR de la membrane cellulaire (King *et al.,* 1996 ; Alele *et al.,* 1998 ; Rui *et al.,* 2000). Il est intéressant de noter que la PKC interagit

avec la cavéoline, composant structurel des cavéoles impliqué dans la transduction du signal de la GH (Oka *et al.,* 1997 ; Lobie *et al.,* 1999). L'interaction du GHR avec la cavéoline permettrait une rapide désensibilisation puis resensibilisation cellulaire à la GH en autorisant une endocytose du GHR de surface rapidement remplacé par de nouveaux récepteurs (Lobie *et al.,* 1999).

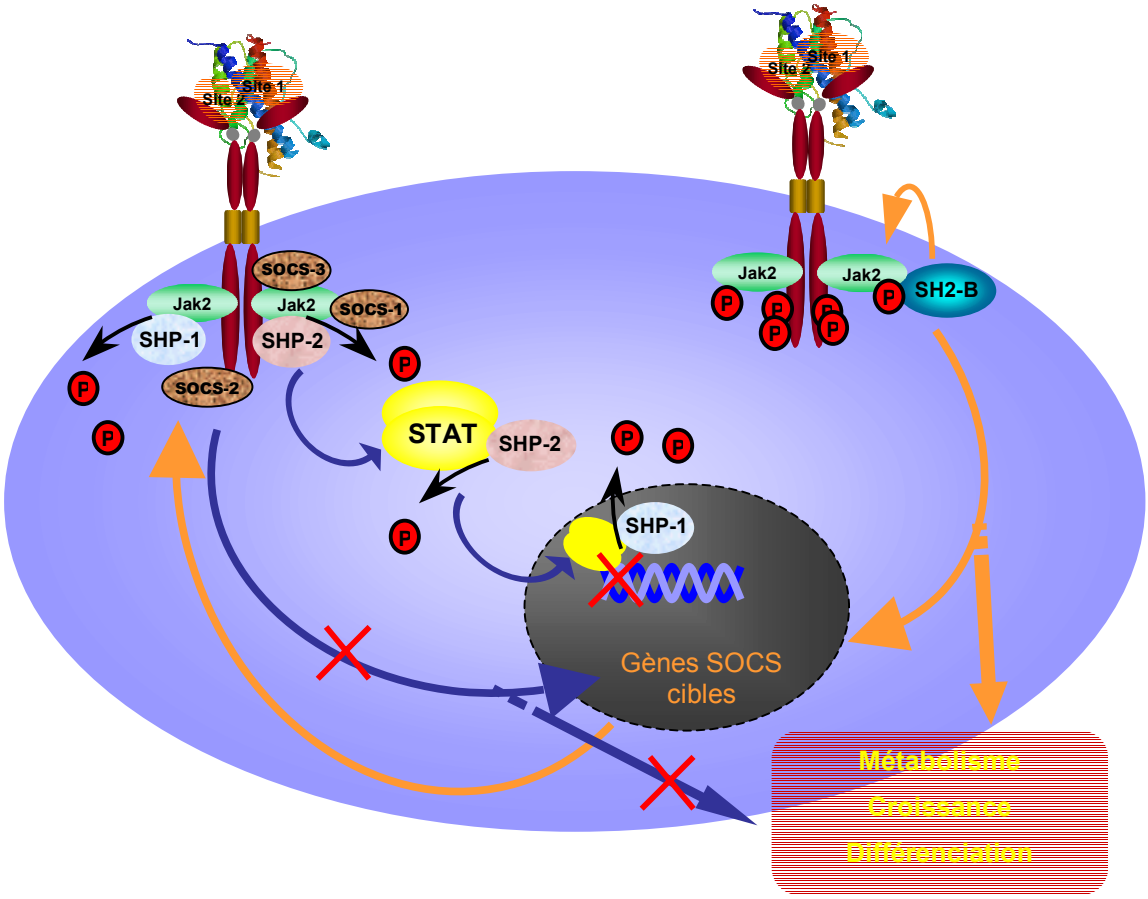


Figure 15 : Régulation de la signalisation cellulaire induite par la GH

SH2-B améliore la signalisation induite par le GHR en augmentant l'activité de Jak2. Les tyrosine phosphatases, telles que SHP-1 et -2, inhibent la signalisation en déphosphorylant les tyrosines du GHR, de Jak2 et des STAT. L'expression des SOCS est activée par SH2-B et subit un contrôle négatif par les SOCS elles-mêmes. SHP-2 : « Src Homology 2 domain-containing protéin tyrosine Phosphatase 2 », SOCS : « Suppressor of Cytokine Signaling », SH2-B : « Src Homology 2 » (d'après Herrington et Carter-Su, 2001).

III.4.1.2. Régulation par les déphosphorylations.

La famille des phosphatases des MAPK (MPK) et les phosphatases sérine/thréonine de type 2 (PP2) sont impliquées plus particulièrement dans la régulation négative des MAPK,

telles que la MAPK p42/44, JNK/SAPK et la p38 MAPK (Ono et Han, 2000) mais le rôle précis dans la signalisation de la GH n'est pas encore caractérisé.

La voie des Jak/STAT intervient dans de nombreuses réponses cellulaires dont la défense immunitaire, la différenciation et la prolifération ainsi que dans l'oncogenèse. Il n'est pas surprenant par conséquent que de nombreux éléments interviennent dans la modulation négative et positive de cette voie. L'effet de ces processus de régulation détermine le niveau auquel les signaux STAT sont stimulés lors de la transduction du signal.

III.4.1.3. La régulation négative de la voie des Jak/STAT

Le signal des cytokines transmis par les STAT est régulé négativement en différents points de la cascade de signalisation incluant les récepteurs, et les Jak et STAT elles-mêmes.

III.4.1.3.1. Au niveau du récepteur

La dégradation des récepteurs dépendante du système ubiquitine/protéasome (*cf.* §IV.2.3) jouerait un rôle dans la régulation négative de la signalisation des cytokines. Les inhibiteurs du protéasome empêchent la dégradation de plusieurs STAT et du récepteur de l'IFN-γ (Kim et Maniatis, 1996 ; Haspel et Darnell, 1999). Ces inhibiteurs stabilisent les isoformes actives STAT-4, -5, -6, mais leur effet direct sur STAT-1, -2 et -3 est moins évident. De plus, ces études ont identifié une région du domaine C-terminal de STAT-5 impliquée dans la dégradation (Wang *et al.,* 2000b). Ces inhibiteurs prolongent également l'activité des Jak (Yu et Burakoff, 1997 ; Callus et Mathey-Prevot, 2000). Le système ubiquitine-protéasome semble donc intervenir dans l'atténuation du signal transmis par la voie Jak/STAT. Cependant, la signification réelle de la dégradation ciblée de la signalisation STAT demeure encore controversée (Lee *et al.,* 1997 ; Melen *et al.,* 2001).

III.4.1.3.2. Au niveau de Jak2

L'activation des Jak étant dépendante de la phosphorylation de leurs résidus tyrosine, il n'est pas surprenant que 2 phosphatases apparentées contenant des domaines SH2, SHP-1 et SHP-2, puissent réguler négativement l'activité des Jak (Figure 15). En activant SHP-1, la GH induit sa liaison à Jak2 (Hackett *et al.,* 1997) conduisant à sa déphosphorylation. SHP-2,

contrairement à SHP-1 (Kim *et al.,* 1998 ; Moutoussamy *et al.,* 1998), se lie au GHR *via* les résidus tyrosine 487 et 595. Le résidu 595 constitue le site majeur d'interaction de la phosphatase au récepteur et demeure responsable de la déphosphorylation du GHR et de Jak2 (Stofega *et al.,* 2000). SHP-2 possède un autre rôle dans la transduction du signal de la GH par son association avec SIRPα (« SIgnal-Regulatory Phosphatase ») qui, lorsqu'elle est activée, augmente la transcription du gène c-fos (Kim *et al.,* 1998).

III.4.1.3.3. Au niveau des STAT

L'activité des STAT peut être régulée négativement, notamment par des déphosphorylations induites par les phosphatases (Figure 15). La phospatase SHP-2 est responsable de la déphosphorylation de STAT-5b cytosolique (Stofega *et al.,* 2000). La phosphatase SHP-1 quant à elle, se lie à STAT-5b à l'intérieur du noyau (Ram et Waxman, 1997) et la déphosphoryle, conduisant à son inactivation. Il existe en plus une autre modification bien caractérisée, la production d'isoformes tronquées ou mutées dans le domaine C-terminal. Elles sont souvent générées au niveau de la transcription pour STAT-3 (Sasse *et al.,* 1997) ou par protéolyse pour STAT-5a et b (Meyer *et al.,* 1998 ; Lee *et al.,* 1999). Ces STAT tronquées fonctionnent comme isoformes interférentes non fonctionnelles (Caldenhoven *et al.,* 1996 ; Kieslinger *et al.,* 2000 ; Piazza *et al.,* 2000). Récemment, la méthylation des STAT a été rapportée, mais la signification physiologique de cette modification n'a pas encore été pleinement élucidée (Mowen *et al.,* 2001 ; Nagaïh *et al.,* 2003).

Parmi les protéines interagissant avec les STAT, une famille constituée par les PIAS (« Protein Inhibitor of Activated STAT ») a été identifiée (Shuai, 1999, 2000 ; Hilton, 1999). Proches des phosphatases, les PIAS sont exprimées de manière constitutive et servent à la titration des STAT actives disponibles dans un environnement cellulaire particulier. Dans la régulation de la signalisation de l'IFN-γ, PIAS-1 se lie aux dimères de STAT-1 activés et bloque ainsi leur capacité à interagir avec l'ADN (Liao *et al.,* 2000). Bien que PIAS-3 soit également impliquée dans la régulation négative de la transduction du signal de la PRL (Liu *et al.,* 1998a ; Hilton, 1999), il reste encore à déterminer si la GH utilise les PIAS pour réguler négativement la transcription induite par les STAT.

III.4.1.3.4. La régulation négative par les CIS/SOCS

Les SOCS « Suppressors Of Cytokine Signaling » ou CIS « Cytokine Inhibitor Signaling » contiennent un domaine central SH2 et un domaine d'homologie hautement conservé dans le domaine C-terminal appelé boîte SOCS ou domaine CH. Ces domaines leur permettent d'interagir avec plusieurs protéines impliquées dans la signalisation cellulaire de la GH. Les SOCS serviraient de molécules adaptatrices pour les diriger vers la voie de la dégradation protéique (Zhang *et al.,* 1999c).

En dépit des rapides progrès réalisés dans la description du fonctionnement des SOCS, le mécanisme par lequel elles antagonisent la signalisation Jak/STAT demeure controversé. L'expression des SOCS est induite par l'activation des cytokines de la voie Jak-STAT. La GH induit notamment l'expression de SOCS-1, -2, -3 et CIS dans le foie de rat à des degrés variés et avec des cinétiques différentes (Adams *et al.,* 1998 ; Ram et Waxman, 1999 ; Tollet-Egnell, 1999). Le mécanisme d'induction des gènes codant pour les SOCS fait probablement intervenir les protéines STAT (Naka *et al.,* 1997 ; Davey *et al.,* 1999b). Elles assureraient dans ce cas le rétrocontrôle négatif de la voie des Jak-STAT en interagissant directement avec les Jak activées ou avec le récepteurs de la GH *via* leur domaine SH2 et la boîte SOCS (Shuai, 1999 ; Chen *et al.,* 2000 ; Krebs et Hilton, 2000). SOCS-1 en particulier est connue pour inhiber directement l'activité kinase de Jak2 (Naka *et al.,* 1997 ; Yasukawa *et al.,* 1999) en présence ou non du GHR (Hansen *et al.,* 1999 ; Ram et Waxman, 1999). En revanche, l'inhibition de Jak2 par CIS et SOCS-3 (Adams *et al.,* 1998 ; Ram et Waxman, 1999 ; Tollet-Egnell, 1999) semble nécessiter la présence du GHR (Hansen *et al.,* 1999 ; Ram et Waxman, 1999). Ainsi, SOCS-3 et CIS accèderaient à Jak2 en se liant en premier lieu au GHR. Des souris transgéniques exprimant CIS de façon constitutive ont une masse corporelle réduite, probablement à cause d'une diminution de l'activité de Jak2 dépendante de la GH (Matsumoto *et al.,* 1999) (Figure 15).

L'inhibition de l'activité de Jak2 par les SOCS peut être réalisée selon trois mécanismes, soit par une interaction directe avec la Janus kinase (pour SOCS-1), soit par l'intermédiaire du GHR au niveau des résidus tyrosine situés près de la membrane (pour SOCS-3) ou plus distaux (pour CIS et SOCS-2). Cette inactivation de Jak2 est alors à l'origine de l'inhibition de la transduction du signal de la GH faisant intervenir STAT-5b (Ram et Waxman, 1999).

III.4.2. La régulation positive de la voie Jak/STAT

III.4.2.1. Au niveau de Jak2

Les protéines Jak2 une fois activées recrutent la protéine SH2-B contenant des domaines SH2 pour former un complexe (Rui *et al.,* 1997) (Figure 15). SH2-B augmente l'activité kinase de Jak2, conduisant à l'activation de protéines de signalisation en aval telles que STAT-5b (Rui et Carter-Su, 1999). L'augmentation de l'activité de Jak2 par SH2-B serait un mécanisme important pour stimuler la signalisation dépendante du complexe GHR-Jak2 (pour revue, Kisseleva *et al*., 2002).

III.4.2.2. Au niveau des STAT

Bien que les études initiales se focalisaient sur le rôle joué par les tyrosines kinases dans l'activation des STAT, des études plus récentes ont identifié d'autres régulateurs positifs incluant les sérine kinases (par exemple MAPK) et des protéines interactives (pour revue, Kisseleva *et al*., 2002).

La modification possible des STAT par la phosphorylation des résidus sérine suggère la possibilité d'interactions entre les cascades de signalisation (Decker et Kovarik, 2000). Les premières études ont mis en évidence l'existence d'un motif dans plusieurs molécules STAT (STAT-1, -3, -4 et -5) de séquence PMSP dans laquelle la sérine localisée en position 727 était phosphorylée (Wen *et al.,* 1995 ; Zhang *et al.,* 1995). La présence de ce motif très conservé révèle la possibilité que les sérine kinases (ou MAPK) phosphorylent le résidu sérine 727 après avoir été adressées aux prolines situées de part et d'autre du motif (Gonzalez *et al.,* 1991). Cependant, cette théorie n'est pas totalement admise en partie à cause de l'existence de différentes sérine kinases susceptibles de phosphoryler STAT-1 et -3 en fonction de la nature du stimulus ou des co-stimuli (Decker et Kovarik, 2000). Quelque soit le mécanisme sous-jacent, il semblerait que la phosphorylation des résidus sérine des STAT-1 et -3 (Wen *et al.,* 1995 ; Decker et Kovarik, 2000) ou de STAT-4 (Visconti *et al.,* 2000) stimule leur activité transcriptionnelle. En revanche, l'amélioration de la transcription par les STAT-5 et -6 phosphorylées sur leurs résidus sérine n'a pas pu être démontrée de façon convaincante (Yamashita *et al.,* 1998). Pour STAT-5, ce type de phosphorylation interviendrait plutôt dans le sens d'une stabilisation protéique (Beuvink *et al.,* 2000).

Ces études fournissent un aperçu de la capacité des modifications de STAT, comme la phosphorylation des résidus sérine, à réguler différemment l'expression de quelques gènes.

De rapides progrès ont récemment été effectués dans la définition des voies de transduction du signal du GHR. Il apparaît clairement que plusieurs cytokines, dont la GH, partagent des composants similaires ou identiques afin d'exercer leurs effets. Bien qu'un certain nombre de ces effets cellulaires soient pléïotropes et/ou universels à la super famille des récepteurs des cytokines, suggérant un caractère de redondance mais qui montre une spécificité fonctionnelle.

Nous avons vu que le processus d'internalisation constitue un mécanisme de régulation négative de la présence de GHR à la surface cellulaire. Nous allons maintenant étudier plus en détail deux voies connues pour internaliser le complexe GH-GHR_2, la voie des vésicules à clathrine, dépendante du système ubiquitine-protéasome (Strous *et al*., 1996 ; Govers *et al*., 1997) et la voie des cavéoles (Lobie *et al*., 1999).

IV. L'INTERNALISATION DU COMPLEXE HORMONE-RECEPTEUR

A la surface cellulaire, la disponibilité des protéines et lipides membranaires aux ligands extracellulaires et molécules solubles est soumise à une régulation caractéristique dans toutes les cellules eucaryotes au niveau des différents compartiments cellulaires. Premièrement, la quantité de protéine synthétisée dans le réticulum endoplasmique est largement contrôlée par la transcription génique. De plus, le système de tri au niveau du réticulum endoplasmique régule la sortie des protéines convenablement repliées. Ensuite, au niveau du réseau transgolgien, les protéines peuvent soit être déviées directement vers les lysosomes, soit être transportées à la surface cellulaire ou vers des compartiments cellulaires tels que la mitochondrie. A la membrane plasmique, les récepteurs membranaires peuvent subir la protéolyse, conduisant à la libération de leur domaine extracellulaire, ou être sélectionnées par la machinerie d'endocytose pour être internalisées *via* un ensemble de processus cellulaires. Afin de déterminer les besoins de tels processus, les voies d'endocytose doivent posséder une diversité considérable en termes de régulation, spécificité pour différents transporteurs, et destination fondamentale dans les cellules. La voie d'endocytose la plus étudiée implique la voie des vésicules à clathrine qui recouvre des invaginations de la

membrane plasmique où ont été recrutés les récepteurs de surface. Ensuite, à travers une série d'étapes hautement régulées, ces invaginations sont étranglées et excisées pour former des vésicules recouvertes de clathrine (Mukherjee *et al.,* 1997 ; Kirchhausen, 2000b). Par cette voie, les protéines internalisées se retrouvant dans les endosomes sont soit recyclées vers la membrane plasmique, soit adressées au lysosome pour y être dégradées. A chacune de ces localisations cellulaires, le système ubiquitine-protéasome peut spécifiquement réguler la disponibilité protéique par l'intermédiaire de différents mécanismes : il peut intervenir au niveau du tri effectué par le réticulum endoplasmique ou au niveau de la membrane plasmique (Strous et van Kerkhof, 2002). De surcroît, la liaison de la GH stimule la conjugaison de l'ubiquitine au récepteur, son internalisation et sa dégradation. De plus le système de conjugaison à l'ubiquitine, conduisant à la dégradation protéosomale, est impliqué dans l'internalisation du GHR (Strous *et al.,* 1996 ; Govers *et al.,* 1997), alors qu'une dégradation partielle de la molécule du GHR a lieu dans le lysosome (Murphy et Lazarus, 1984 ; Yamada *et al.,* 1987).

D'autres voies alternatives indépendantes des vésicules à clathrine peuvent également intervenir dans le processus d'endocytose (pour revue, Johannes et Lamaze, 2002) comme par exemple la voie des cavéoles (Sandvig et van Deurs, 2002). En revanche, ces dernières ne conduiraient pas les produits internalisés vers une voie de dégradation mais interviendraient plutôt dans leur trafic intracellulaire et dans les processus de signalisation cellulaire.

IV.1. L'internalisation dépendante de la voie des vésicules à clathrine

IV.1.1 Le système ubiquitine-protéasome

La voie de dégradation par le système ubiquitine-proteasome est la principale dans le cadre d'une dégradation non lysosomale (Hershko et Ciechanover, 1998). Ce système, impliqué dans la dégradation des protéines cytoplasmiques et des protéines qui n'ont pas subi de tri au niveau du réticulum endoplasmique, joue également un rôle dans la régulation de fonctions cellulaires (Plemper et Wolf, 1999). Parmi celles-ci, il est possible de citer le cycle et la division, la différenciation et le développement cellulaires, la modulation des récepteurs de surface cellulaire, l'implication dans la réponse intracellulaire au stress et aux effecteurs extracellulaires, l'apoptose, la voie de sécrétion (transport protéique), et la réparation de l'ADN (Bonifacino et Weissman, 1998 ; Schwartz et Ciechanover, 1999 ; Hershko *et al.,* 2000). La conjugaison de l'ubiquitine à un nombre restreint de protéines de la membrane

plasmique déclencherait plutôt l'internalisation que la dégradation par le protéasome (Strous et Govers, 1999).

La conjugaison à l'ubiquitine, protéine globulaire de 76 acides aminés hautement conservée chez les eucaryotes, implique un mécanisme en cascade de 3 étapes (Figure 16). Premièrement, une enzyme E1, « ubiquitin-activating enzyme », active l'ubiquitine en formant une liaison de type thiol-ester hautement énergétique avec la glycine de l'ubiquitine située dans le domaine C-terminal selon un processus dépendant de l'ATP. Puis une des enzymes E2, « ubiquitin-conjugating enzyme » (enzymes de conjugaison à l'ubiquitine, UBCs), accepte l'ubiquitine de l'élément E1-S~ubiquitine par une réaction de trans-thiolation impliquant le domaine C-terminal de l'ubiquitine. Enfin, une enzyme E3, « ubiquitin protein ligase », catalyse le transfert de l'ubiquitine depuis l'intermédiaire E2-S~ubiquitine vers un résidu lysine situé sur le substrat. Comme l'enzyme E3 se lie spécifiquement à ses substrats, elle joue un rôle important dans la sélection des protéines destinées à la dégradation. Dans quelques cas, E2 transfère l'ubiquitine activée directement au substrat protéique. Ainsi, les enzymes E2 jouent également un rôle important dans la reconnaissance du substrat (Strous et van Kerkhof, 2002). Au cours des réactions successives, la chaîne de poly-ubiquitine est synthétisée par un transfert construit d'unités d'ubiquitine vers le résidu Lys48 déjà conjuguée à l'ubiquitine de la molécule qui la précède (Chau *et al.,* 1989). Les protéines poly-ubiquitinylées sont ensuite reconnues et dégradées par le complexe du protéasome 26S situé en aval. Puis l'ubiquitine libre est réutilisable pour de nouvelles réactions de conjugaison (Varshavsky, 1997 ; Hershko *et al.,* 2000 ; Jentsch et Pyrowolakis, 2000 ; Hoppe *et al.,* 2001). Des enzymes de « désubiquitilation » analogues des phosphatases jouent un rôle important dans le contrôle du rythme et de l'intensité du processus de conjugaison (Wilkinson, 1997 ; Dupre et Haguenauer-Tsapis, 2001 ; Chen *et al.,* 2002) et sont indispensables à son homéostasie. Le protéasome 26S est une protéase cytosolique composée de plusieurs sous unités (environ 2500 kDa) comprenant une particule centrale catalytique 20S coiffée de part et d'autre par un complexe multiprotéique régulateur 19S (Voges *et al.,* 1999 ; Kloetzel, 2001). En règle générale, les substrats sont dégradés par le protéasome en peptides de 8 à 11 acides aminés (Hoppe *et al.,* 2001).

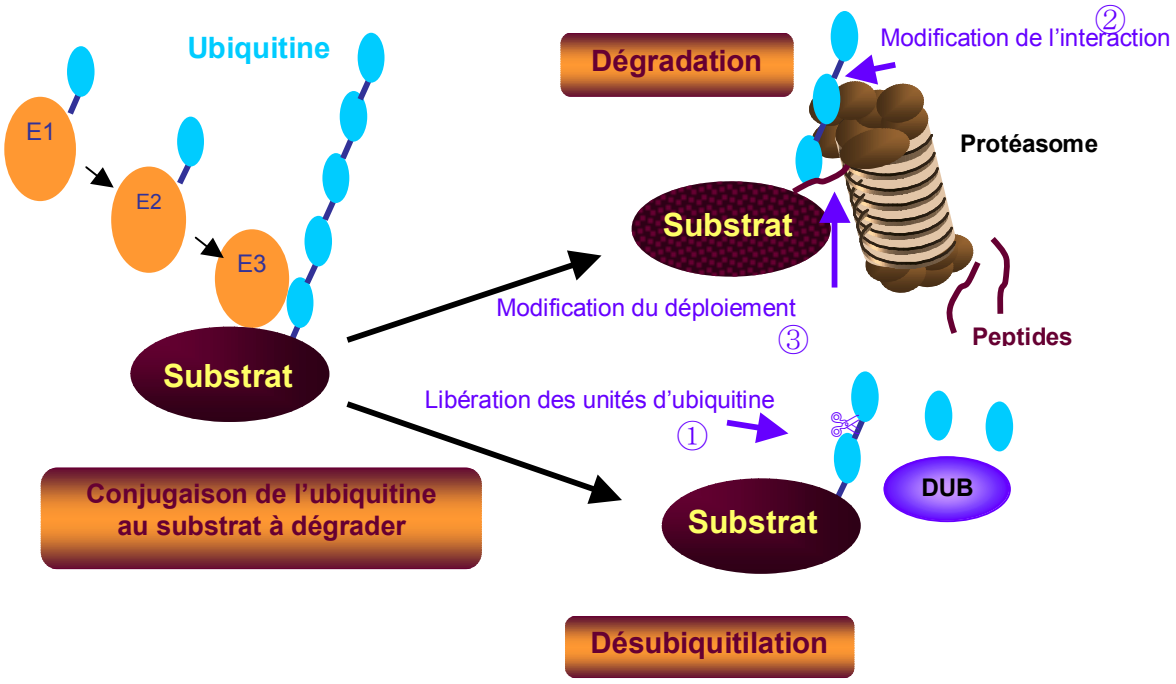


Figure 16 : Régulation de la dégradation des protéines par le système ubiquitine/protéasome

Les protéines substrats sont destinées à une dégradation par le protéasome suite à leur conjugaison à un motif de polyubiquitine. La conjugaison du substrat à l'ubiquitine fait intervenir une ubiquitine activase (E1), des ubiquitine conjugases (E2) et des ubiquitine ligases (E3). Le substrat polyubiquitilé interagit avec le protéasome puis subit une dégradation progressive en petits peptides. Les événements de régulation de ce processus incluent : 1) une accélération de la désubiquitilation, 2) une modification de l'interaction substrat protéasome, 3) le blocage du déploiement du substrat. DUB : enzyme de désubiquitilation (d'après Dantuma et Masucci, 2002).

Ce système ubiquitine-protéasome est reconnu comme étant un système régulateur clé dans les processus biologiques basiques tels que la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et la croissance cellulaire, la dégradation rapide de facteurs de transcription impliqués dans les processus de transduction du signal. Ce système est également impliqué dans le processus de translocation depuis la membrane plasmique vers les compartiments intracellulaires par la voie des vésicules à clathrine.

IV.1.2 La conjugaison de l'ubiquitine au GHR

Dans les cellules de mammifères, la protéine la mieux étudiée subissant l'endocytose induite par l'ubiquitine est le GHR (Murphy et Lazarus, 1984). La conjugaison de

l'ubiquitine au GHR et l'internalisation du complexe hormone-récepteur qui en découle sont des phénomènes qui agissent de concert afin d'aboutir à la dégradation complète du GHR.

La conjugaison de l'ubiquitine au GHR dépend de l'intégrité du domaine ^{322}DSWVEFIELD^{331}, chez le lapin, localisée dans son domaine cytosolique, appelé motif UbE (Govers *et al.,* 1999). Dans ce motif, les résidus F327 (F346 chez le rat) et D331 (D350 chez le rat) sont essentiels puisque la mutation ponctuelle de l'un de ces résidus affecte la conjugaison à l'ubiquitine et l'internalisation du récepteur *via* les vésicules à clathrine. Le motif UbE servirait directement ou par l'intermédiaire de protéines adaptatrices de site d'ancrage pour les enzymes du système ubiquitine, conduisant à la localisation du GHR au niveau des puits membranaires recouverts de clathrine et à son internalisation (Strous et Govers, 1999). Cependant, la liaison de l'ubiquitine au GHR n'est pas nécessaire au processus d'endocytose lui-même (Govers *et al.,* 1999 ; van Kerkhof *et al.,* 2000). Van Kerkhof *et al*. (2001a) ont montré que la conjugaison intervenait à la surface cellulaire avant que l'étranglement des puits recouverts de clathrine n'ait lieu. Ce résultat suppose l'antériorité de l'ubiquitination par rapport à l'endocytose, montrant sa mise en place seulement au niveau des invaginations membranaires recouvertes du manteau de clathrine. Ainsi, l'internalisation du complexe GH-GHR_2 par la voie des vésicules à clathrine nécessiterait le recrutement du système intact de conjugaison à l'ubiquitine (Govers *et al.,* 1999). Par ailleurs, la conjugaison de l'ubiquitine au GHR, son endocytose et sa dégradation ont lieu indépendamment de la transduction du signal *via* Jak2 puisqu'une mutation dans la boîte 1 empêchant la liaison de Jak2, par conséquent la phosphorylation du GHR n'altère, en rien l'internalisation du complexe, l'état d'ubiquitination du GHR, son turnover ou son transport vers la membrane plasmique (Alves dos Santos *et al.,* 2001a).

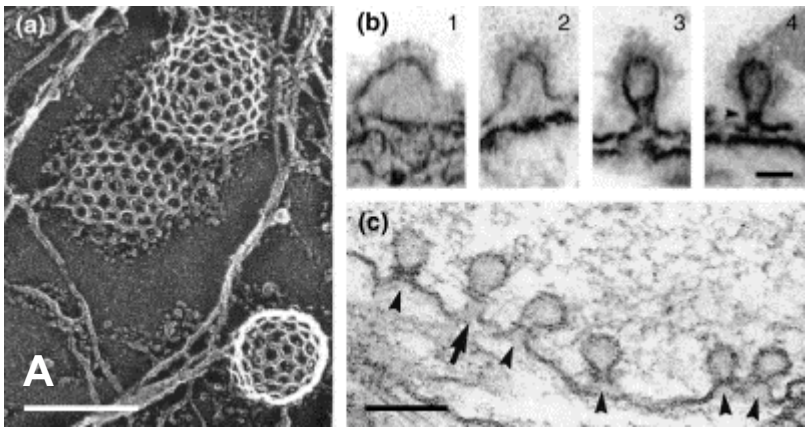
La machinerie de conjugaison de l'ubiquitine au GHR est rendue active *via* le motif UbE ou les protéines auxiliaires et par la présence des puits recouverts de clathrine (van Kerkhof *et al*., 2001a). Cette organisation complexe interviendrait dans le processus de conjugaison de l'ubiquitine et de la dégradation de facteurs afin d'assurer la liaison du GHR protéines impliquées dans d'endocytose (Strous et van Kerkhof, 2002).

IV.2. L'endocytose du complexe hormone-récepteur par la voie des vésicules à clathrine

IV.2.1 Mécanisme général

IV.2.1.1. Description des vésicules à clathrine

Les vésicules recouvertes de clathrine constituent les premières vésicules de transport identifiées et demeurent les plus caractérisées. En effet, la clathrine, molécule de 180-190 kDa, a été caractérisée dans les années 70 (Pearse, 1975, 1976), suite à la découverte faite par Roth et Porter dans les années 60 de vésicules recouvertes dans les oocytes d'insectes (Roth et Porter, 1964). Le manteau de clathrine a été identifié initialement par son apparence moléculaire distinctive en microscopie électronique constituée d'un treillage de clathrine polygonal qui forme la carapace et le principal échafaudage du manteau. Isolée du manteau vésiculaire, la clathrine se présente sous forme d'une « araignée », avec un trimère de chaînes lourdes de 190 kDa (475 Å de long) radiant à partir d'un pivot central, chacune étant associée ($K_D=10^{-9}$) (Winkler et Stanley, 1983) à une chaîne légère de 25 kDa environ (Kirchhausen et Harrison, 1981 ; Ungewickell et Branton, 1981). Cette structure a été dénommée triskèle ou « triskelion » (Ungewickell et Branton, 1981) (Figure 17).



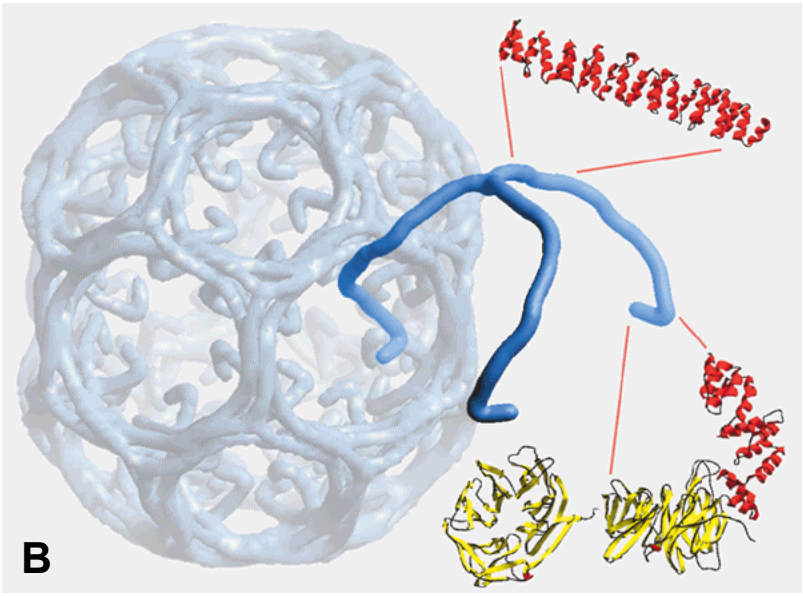


Figure 17 : Formation des vésicules recouvertes de clathrine

Structure des vésicules recouvertes de clathrine obtenue après ombrage au carbone du répliquât de la surface interne de fibroblastes de poulet observés en microscopie électronique à balayage (Aa). La microscopie électronique à transmission permet d'observer les différents stades de formation de ces vésicules (Ab,c) (Higgins et Mc Mahon, 2002). Le modèle d'une cage à clathrine est représenté en B avec une résolution de 21Å obtenue par microscopie électronique (Kirchhausen, 2000).

Elles interviennent dans l'endocytose de nombreux récepteurs transmembranaires et dans le transport d'hydrolases lysosomales nouvellement synthétisées depuis le réseau transgolgien vers le lysosome.

IV.2.1.2. Constitution des vésicules d'internalisation recouvertes de clathrine

L'endocytose est effectuée par l'assemblage séquentiel et progressif de molécules de clathrine recouvrant les invaginations de la membrane plasmique, permettant la concentration de transporteurs et de lipides dans les bourgeons émergeants conduisant à une déformation de la membrane en bourgeon vésiculaire (Marsh et McMahon, 1999 ; Kirchhausen, 2000a ; De Camilli *et al.,* 2001). Ces bourgeons mûrissent puis se détachent de la membrane donnant naissance à des vésicules de clathrine libres dans le cytosol (Figure 18).

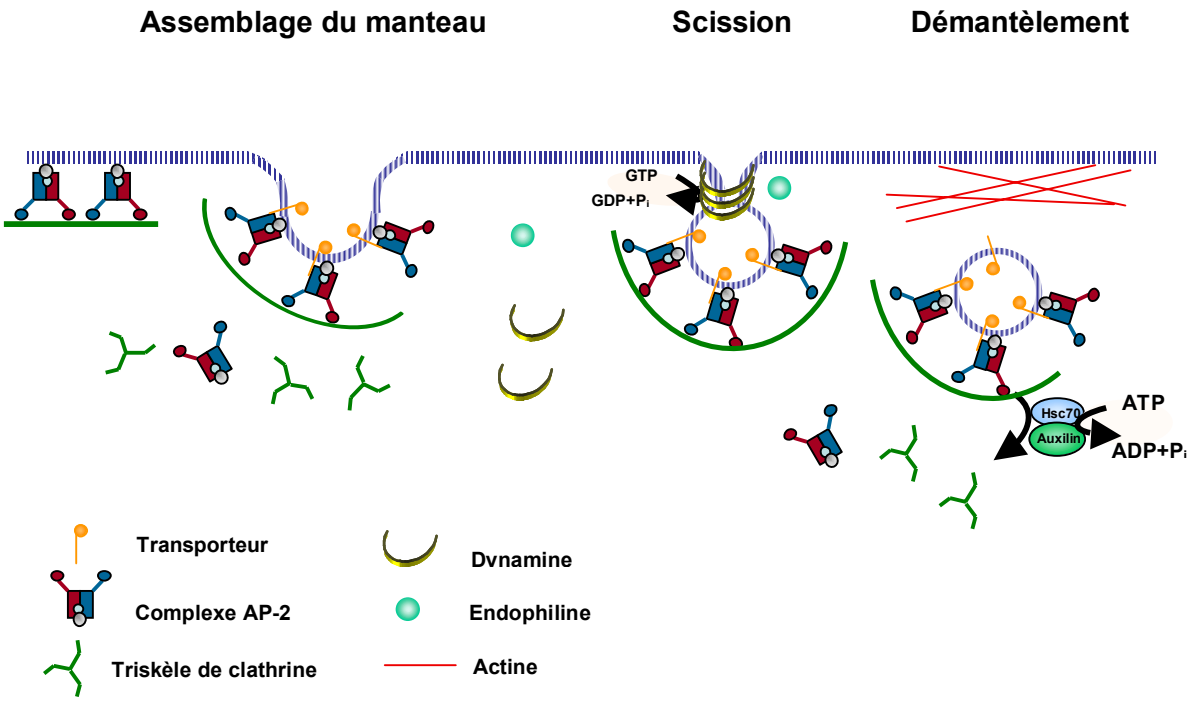


Figure 18 : Les étapes clés de la formation des vésicules recouvertes de clathrine

Les protéines adaptatrices (AP-2) se lient au transporteur spécifique mais également à la clathrine. Les triskèles de clathrine se polymérisent en hexagones et pentagones de façon à former une cage conduisant à la déformation membranaire. Lorsque le manteau est pratiquement terminé, la dynamine (assistée de protéines accessoires telles que l'endophiline) étrangle la vésicule. Puis, le démantèlement nécessite l'hydrolyse de l'ATP par Hsc70 et l'auxiline (d'après Kirchhausen, 2000). AP-2 : « Adaptator-Protein », Hsc : protéine de choc thermique.

L'assemblage des bourgeons recouverts de clathrine est assisté d'une collection de protéines, pour la plupart cytosoliques, souvent appelées protéines accessoires, constituant un réseau dynamique d'interactions protéiques durant les différentes étapes de l'endocytose (Brodin *et al.,* 2000 ; Slepnev et De Camilli, 2000 ; De Camilli *et al.,* 2001). Le manteau de clathrine est assemblé sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique et débute par le recrutement d'un complexe adaptateur AP-2, hétérotétramère comprenant 2 grandes sous unités chacune de 100 kDa (α et β2), et deux chaînes plus petites de 50 et 20 kDa (μ2 et σ2, respectivement). AP-2 interagirait, *via* sa sous unité nommée α-adaptine, avec le GHR de rat lorsque son domaine cytoplasmique adopte une conformation de type « β-turn » (Vleurick *et al.,* 1999). Les molécules adaptatrices servent de lien entre la clathrine et la membrane plasmique de façon à coordonner l'assemblage structurel du manteau en sélectionnant les transporteurs et les lipides (Hirst et Robinson, 1998 ; Marsh et McMahon, 1999 ;

Kirchhausen, 2000a,b). Dans de nombreux cas, le manteau contient une protéine monomérique supplémentaire appelée AP180 dans les neurones et CALM dans les autres tissus, qui définit la taille de la vésicule recouverte (Zhang *et al.,* 1998 ; Nonet *et al.,* 1999). Ces protéines modulaires pourraient aider à l'assemblage du manteau, à la fission membranaire et à la coordination de ces événements avec les changements dans le cytosquelette d'actine (Qualmann *et al.,* 2000) et le métabolisme lipidique (Huttner et Schmidt, 2000). La sous unité µ2, en plus de son rôle joué dans le complexe adaptateur AP-2, serait impliquée dans la régulation de la formation du manteau de clathrine (Figure 19).

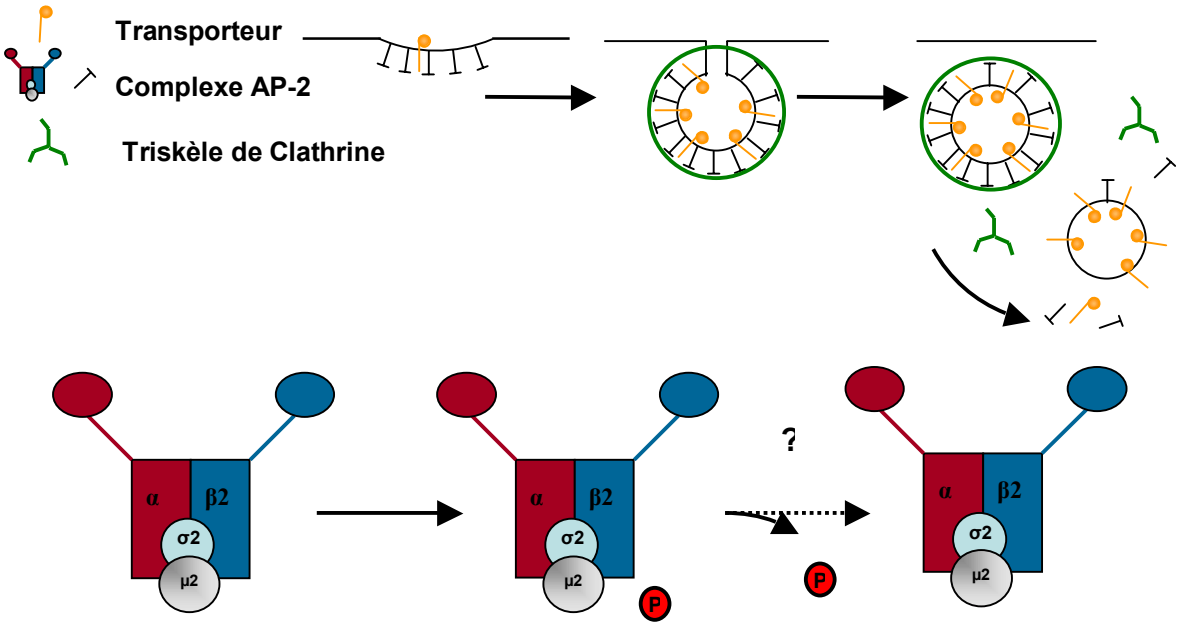


Figure 19 : Rôle de la phosphorylation de la sous unité µ2 du complexe AP-2 dans la formation des vésicules recouvertes de clathrine

La phosphorylation de µ2 est nécessaire entre l'assemblage d'un nouveau puits recouvert et la formation d'un puits plus profondément invaginé. Elle aiderait au recrutement de la molécule à internaliser. En revanche, aucune indication n'a encore été observée quant au moment de la déphosphorylation (d'après Smythe, 2003). AP : « Adaptator-Protein ».

Sa phosphorylation serait nécessaire au moment de l'assemblage des puits nouvellement recouverts formant des puits profondément invaginés. Ensuite, sa déphosphorylation intervient au moment de la scission vésiculaire, stade auquel la vésicule se libère de son encombrant manteau, pour faciliter la fusion consécutive de la vésicule avec l'endosome précoce. De plus, ce démantèlement serait bénéfique à la diminution des

interactions entre les composants cytosoliques (Smythe, 2003). Désormais, le complexe AP-2 n'est plus considéré comme essentiel à la formation du manteau de clathrine, mais interviendrait plutôt dans le processus de recrutement des transporteurs membranaires spécifiques de l'élément à internaliser (Conner et Schmid, 2003a ; Motley *et al*., 2003). Lors de l'assemblage progressif des bourgeons recouverts de clathrine et de leur maturation, la membrane s'incurve progressivement jusqu'à ce qu'un profond puits recouvert de clathrine se forme. La fission du puits recouvert nécessite l'action d'une enzyme particulière, la dynamine GTPase, protéine accessoire participant à l'endocytose qui intervient aussi dans le processus d'invagination par interaction avec l'endophiline (Farsad *et al.,* 2001 ; Guichet *et al.,* 2002). Alors que le mécanisme de fission n'est pas pleinement connu, il apparaît clairement que l'hydrolyse du GTP par la dynamine organisée en anneaux oligomériques autour du col des structures vésiculaires est nécessaire à leur scission (Hinshaw *et al.,* 1995 ; Takei *et al.,* 1995 ; Schmid *et al.,* 1998 ; Hinshaw, 2000 ; McNiven *et al.,* 2000). Ce processus pourrait avoir lieu par constriction directe (Sweitzer et Hinshaw, 1998), par expansion hélicoïdale des spirales de dynamine au niveau du col (Stowell *et al.,* 1999) ou avec l'aide d'effecteurs situés en aval (Sever *et al.,* 1999) tels que l'endophiline transferase (Ringstad *et al.,* 1999 ; Schmidt *et al.,* 1999). Enfin, les vésicules libres recouvertes de clathrine subissent un rapide démantèlement (Brodin *et al.,* 2000 ; De Camilli *et al.,* 2001). La réaction de démantèlement elle-même implique le désassemblage du treillage polygonal de clathrine par la protéine chaperonne hsc70 (« ATPase de démantèlement »), membre de la famille DnaK des protéines de choc thermique de 70 kDa. A elle seule, cette protéine affiche une activité ATPase relativement basse mais pouvant être substantiellement stimulée par l'auxiline, une protéine accessoire comprenant un domaine DnaJ (Ungewickell *et al.,* 1995). L'auxiline aide également au ciblage de hsc70 vers les manteaux de clathrine en s'associant à AP-2 et à la clathrine (Slepnev et De Camilli, 2000). Bien que hsc70 et l'auxiline participent ensuite à la libération de AP-2 de la membrane, des études biochimiques ont identifié une protéine de 100 kDa encore non caractérisée, susceptible d'intervenir lors de la libération (Hannan *et al.,* 1998). Etant donné l'association étroite entre AP-2, les phosphoinositides et la protéine membranaire synaptotagmine, il n'est pas étonnant que des facteurs spécialisés soient nécessaires au déclenchement de la libération de AP-2.

A la suite de ce démantèlement, la clathrine est recyclée et les vésicules « déshabillées » de clathrine peuvent fusionner avec un compartiment particulier, l'endosome précoce ou EE pour « Early Endosome » accueillant les protéines membranaires assignées au tri et à la dégradation. Les protéines destinées à la dégradation lysosomale sont incorporées

dans des vésicules bourgeonnantes internes qui, dans les étapes tardives donnent naissance aux MVB « Multi-Vesicular Body » ou endosome tardif (« late endosome »), alors que les autres sont recyclées à la membrane plasmique *via* les endosomes de recyclage (Sachse *et al.,* 2002).

IV.2.2. L'internalisation du complexe GH-GHR_2 par les vésicules à clathrine et sa régulation

L'endocytose du GHR est dramatiquement diminuée lorsque l'assemblage des clathrines à la membrane plasmique est perturbé (Strous *et al.,* 1996 ; Govers *et al.,* 1997). Si cet assemblage est bloqué par une diminution de la concentration en ions potassium au niveau de la membrane plasmique, aucune conjugaison de l'ubiquitine au GHR n'a lieu (van Kerkhof *et al.,* 2001). Cependant, lorsque l'invagination des vésicules est bloquée par élimination du cholestérol ou par utilisation d'un mutant de la dynamine, la conjugaison à l'ubiquitine du GHR a lieu. Ceci indique que l'ubiquitination du GHR intervient au niveau de la membrane plasmique (van Kerkhof *et al.,* 2001), et suggère l'existence d'un lien entre le processus de conjugaison de l'ubiquitine et le recrutement du récepteur au niveau des membranes recouvertes de clathrine. Afin de mieux comprendre la régulation des premières étapes de l'endocytose du GHR, la technique d'immunomarquage en microscopie électronique a été utilisée sur des cellules exprimant le GHR sauvage ou des mutants (Sachse *et al*., 2001). Cette approche a permis d'étudier la présence du GHR à différentes étapes de la formation de la vésicule recouverte de clathrine : treillage, puits ou vésicule. Les résultats montrent qu'un motif UbE intact, au contraire de l'ubiquitination elle-même, est nécessaire à l'incorporation des complexes GH-GHR_2 dans les puits et vésicules recouvertes de clathrine.

Si le GHR est tronqué en position 349, un motif caché d'endocytose di-leucine (^{343}DTDRLL^{348}) devient actif et le motif UbE n'est plus nécessaire pour l'internalisation dépendante du ligand (Govers *et al.,* 1998). La présence de ce signal d'internalisation suggère qu'une partie du domaine cytosolique du GHR (résidus 349-638) peut être absente sans empêcher l'internalisation puisque sa suppression dévoile un motif actif d'endocytose.

IV.2.3. Le tri protéique endosomal suivi de la dégradation lysosomale du complexe GH-GHR_2

IV.2.3.1. L'étape de tri protéique et de recyclage endosomal

Suite à leur capture par les vésicules recouvertes de clathrine, les complexes GH-GHR_2 sont délivrés aux endosomes précoces normalement dépourvus de protéines de revêtement. La membrane endosomale a une apparence lipidique caractéristique et se trouve de façon prédominante au niveau des endosomes précoces. Cependant, il est possible de rencontrer certains de ces endosomes recouverts de clathrine dans plusieurs types cellulaires (Stoorvogel *et al*., 1996 ; de Wit *et al*., 1999). L'observation la plus étonnante est la présence de GHR destinés à la dégradation lysosomale au niveau des membranes endosomales recouvertes de clathrine (Sachse *et al.,* 2002) (Figure 20).

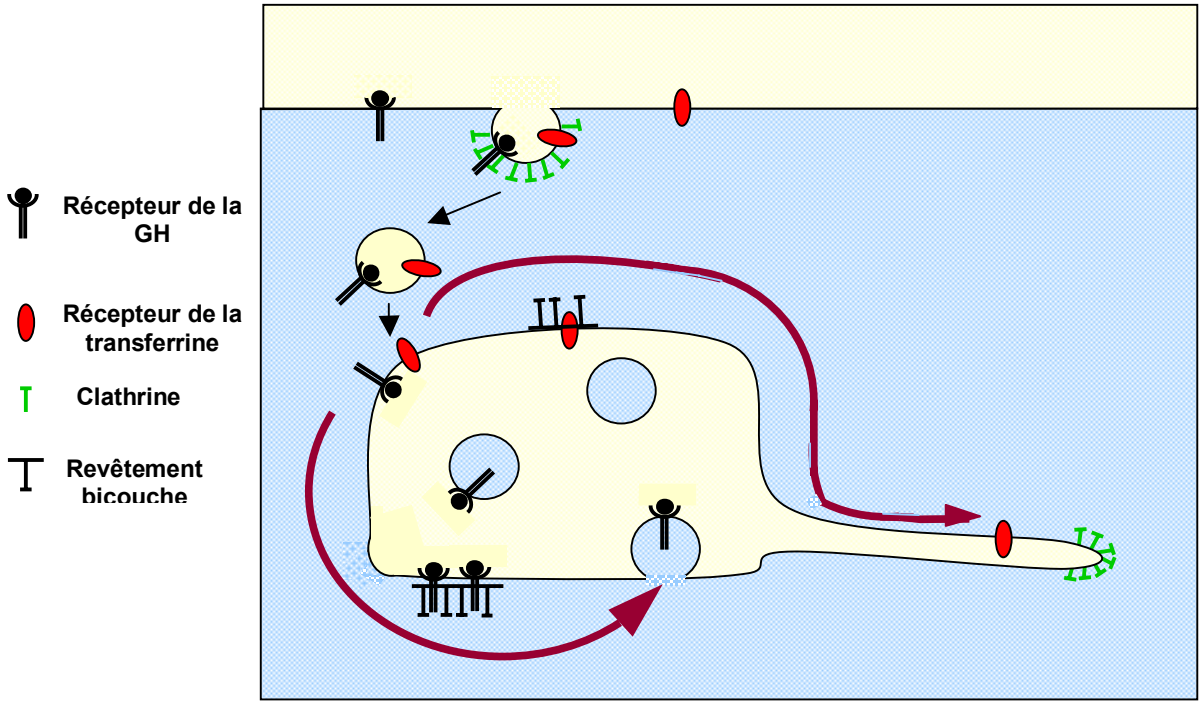


Figure 20 : Modèle de la rétention des récepteurs destinés à la dégradation au niveau des aires membranaires de l'endosome recouvertes de clathrine

Rétention dans le revêtement bicouche des récepteurs destinés à être dégradés par le lysosome. Les protéines destinées au recyclage ne sont pas retenues au niveau de la bicouche de clathrine et s'accumulent dans les endosomes de recyclage (d'après Sachse *et al*., 2002).

Ceci suggère un rôle pour le manteau de clathrine dans le tri endosomal. Avant l'incorporation dans les MVB, les complexes hormone-récepteur seraient concentrés dans la zone recouverte de l'endosome précoce (Sachse *et al.,* 2002). L'absence des complexes GH-GHR_2 au niveau des endosomes de recyclage riches en transferrine et leur présence dans les vésicules intra-endosomales, notamment les vésicules internes des MVB, supposent un tri et un ciblage efficaces des complexes vers le lysosome (Futter *et al.,* 1996), ce qui est en accord avec une dégradation rapide de la GH internalisée décrite par Govers *et al.* en 1998. Le motif UbE est nécessaire au recrutement du GHR dans les MVB pour la dégradation lysosomale (van Kerkhof *et al.,* 2001b ; Sachse *et al.,* 2002).

Les protéines peuvent également être recyclées vers des endosomes de recyclage qui retournent directement à la membrane ou sont transférées transitoirement à la région périnucléaire, où l'appareil de Golgi contient en plus du pool de GHR recyclés, de grandes quantités de GHR nouvellement synthétisés (Vleurick, 1999).

Le système ubiquitine-protéasome intervient de diverses manières dans la régulation du tri protéique siégeant dans l'endosome (Lemmon et Traub, 2000 ; Sachse *et al.,* 2002). Bien que ceci n'ait pas été caractérisé pour le GHR, il existe une protéine adaptatrice tyrosine kinase conjuguée à l'ubiquitine, c-Cbl (Miyake *et al.,* 1998), impliquée dans la médiation de la conjugaison de l'ubiquitine à l'EGF-R (Levkowitz *et al.,* 1998), au PDGF-R (Miyake *et al.,* 1998), et à ErbB2 (Levkowitz *et al.,* 2000). Agissant comme une ligase d'ubiquitine, c-Cbl reconnaît les substrats tyrosine phosphorylés *via* son domaine SH2 puis recrute et active une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine E2 *via* son domaine RING (Joazeiro *et al.,* 1999). Au niveau de l'endosome, c-Cbl agirait pour faciliter le tri de EGF-R dans les endosomes, atténuant de cette façon la signalisation des kinases (Levkowitz *et al.,* 1998 ; Longva *et al.,* 2002). La conjugaison à l'ubiquitine de l'EGF-R peut avoir lieu à la surface cellulaire, mais le rôle de ce phénomène dans l'endocytose demande à être confirmé (Stang *et al.,* 2000).

De plus, les inhibiteurs du protéasome (MG132, lactacystine) empêchent l'internalisation et le transport du GHR de l'endosome vers le lysosome (van Kerkhof *et al.,* 2000, 2001b). Le protéasome n'est plus inhibé lorsque le récepteur est tronqué à partir du résidu 369, suggérant que le GHR ou les protéines associées doivent être dégradés par le protéasome avant que l'internalisation n'ait lieu (van Kerkhof *et al.,* 2000 ; Sachse *et al.,* 2002). Ces résultats indiquent une régulation du turnover du GHR par le système ubiquitine-protéasome au moment de l'internalisation depuis la membrane plasmique mais également

durant le transport des endosomes vers le lysosome. Il existe une différence remarquable dans l'implication du système ubiquitine-protéasome entre le trafic du GHR et celui d'autres protéines membranaires. En effet, dans la plupart des cas, le système ubiquitine-protéasome intervient après la phosphorylation du substrat (Hicke *et al.,* 1998 ; De Craene *et al.,* 2001), mais la voie de transduction du signal *via* Jak2 n'étant pas impliquée dans l'endocytose dépendante du système ubiquitine-protéasome (Alves dos Santos *et al.,* 2001a), et qu'aucun autre type de phosphorylation n'a encore été observé, il semblerait que dans ce cas, le système ubiquitine agisse directement sur le GHR comme régulateur primaire dans le trafic du GHR (Strous et Gent, 2002). Cependant, la technique de co-immunoprécipitation des complexes GH-GHR_2 (avec le GHR entier ou tronqué : GHR_{1-369}) avant et suite à l'endocytose a montré que Jak2, aussi bien que d'autres protéines activées, sont liées au GHR à la surface cellulaire mais également dans les endosomes. Ces résultats suggèrent la poursuite de la transduction du signal après l'endocytose et la présence du GHR, entier ou tronqué au niveau de l'endosome (Alves dos Santos *et al.,* 2001b).

IV.2.3.2. La dégradation lysosomale du complexe GH-GHR_2

Dans les vésicules d'endocytose, le pH légèrement acide est suffisant pour dissocier le complexe hormone récepteur, permettant un traitement et un devenir différent pour la GH et son récepteur. Cependant, l'existence d'une colocalisation de la GH et de son récepteur suggère que l'hormone et le GHR sont traités dans les mêmes compartiments. La GHBP serait générée dans le lysosome par protéolyse du GHR entier. Van Kerkhof et Strous (2001) proposent un modèle de dégradation séquentielle du complexe GHR (Figure 21). La dégradation de la région cytosolique du GHR serait effectuée par le protéasome et celle de la partie luminale par le lysosome. Ce modèle expliquerait la présence du motif d'endocytose latent en position 347 qui peut être dévoilé lors de la dégradation protéosomale au niveau de la membrane plasmique (Govers *et al*., 1998).

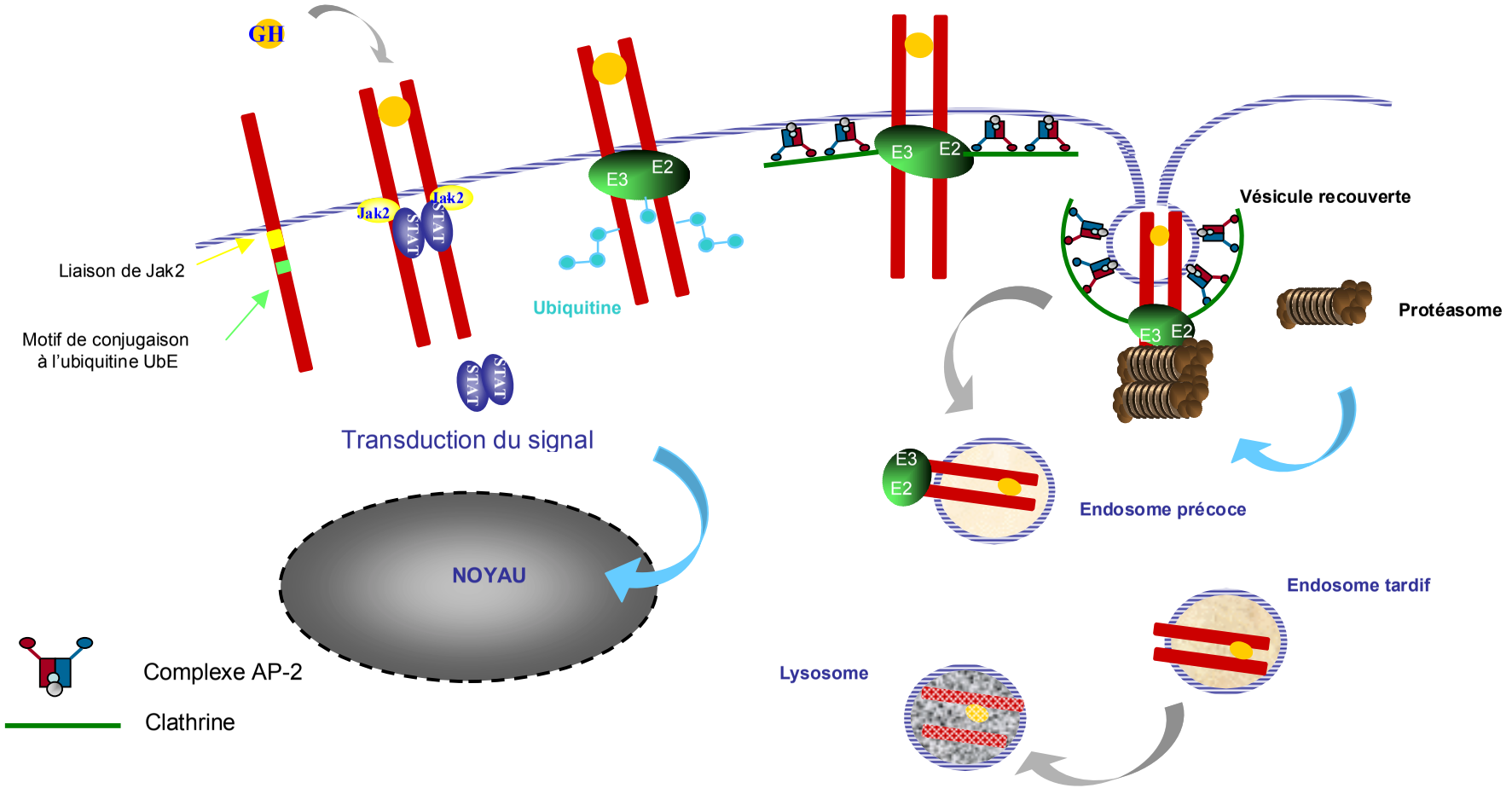


Figure 21 : Conjugaison de l'ubiquitine au GHR et dégradation séquentielle

La GH se lie au dimère de GHR induisant l'activation de Jak2 et de la voie des STAT afin de stimuler la transcription génique. Les enzymes spécifiques de conjugaison (E2) et de liaison de l'ubiquitine (E3) s'associent au motif UbE afin de lier l'ubiquitine au GHR et aux éventuelles protéines associées. Le système E2/E3 stimule la mise en œuvre des éléments d'endocytose dépendante des vésicules à clathrine, servant de molécules adaptatrices pour la clathrine ou de connecteurs au complexe AP-2. Ensuite, le protéasome dégrade la partie cytosolique du GHR au niveau de la membrane plasmique. L'internalisation du complexe GH-GHR_2 est réalisée dans le but de poursuivre la dégradation au niveau du lysosome en passant par les endosomes précoce et tardif (d'après Strous et Govers, 1999 ; van Kerkhof et Strous, 2001)

IV.2.4. La régulation de la disponibilité en GHR

Pendant l'exposition à la GH, les quantités de récepteurs associés à la membrane plasmique et stockés dans les compartiments intracellulaires diminuent nettement. L'utilisation d'inhibiteurs du protéasome ou de Jak2 montre que ces 2 éléments contrôlent essentiellement la dégradation des récepteurs (Moulin *et al.,* 2003) (Figure 22). Jak2 et le protéasome coopèreraient pour limiter la quantité de récepteurs nouvellement synthétisés disponibles à la surface cellulaire lors d'une stimulation prolongée par la GH. Moulin *et al*. (2003) ont proposé un modèle de régulation négative du trafic du GHR dans les cellules CHO. En effet, une partie du pool de GHR est à la surface, mais la plupart est stockée dans les compartiments intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique et le réseau transgolgien. Suite à la liaison de la GH, les GHR de surface sont internalisés puis dirigés vers l'endosome précoce, envoyés au lysosome pour la dégradation et ne sont pas recyclés. Une grande partie des GHR stockés dans la cellule ne sont pas ciblés efficacement à la surface cellulaire à la suite d'une stimulation par la GH, suggérant l'envoi de ces récepteurs directement vers les compartiments de dégradation. Cette voie est inhibée par l'utilisation de l'antagoniste B2036, des inhibiteurs de Jak2 (AG490, LLnL) et du protéasome (MG132, lactacystine), suggérant également un rôle pour Jak2 dans cette nouvelle voie de régulation.

Ce processus de régulation du trafic des GHR aurait pour but de contrôler la quantité de GHR disponibles par l'activation de Jak2 et du protéasome afin de participer à la disponibilité des GHR à la surface suite à un pulse hormonal (Moulin *et al.,* 2003).

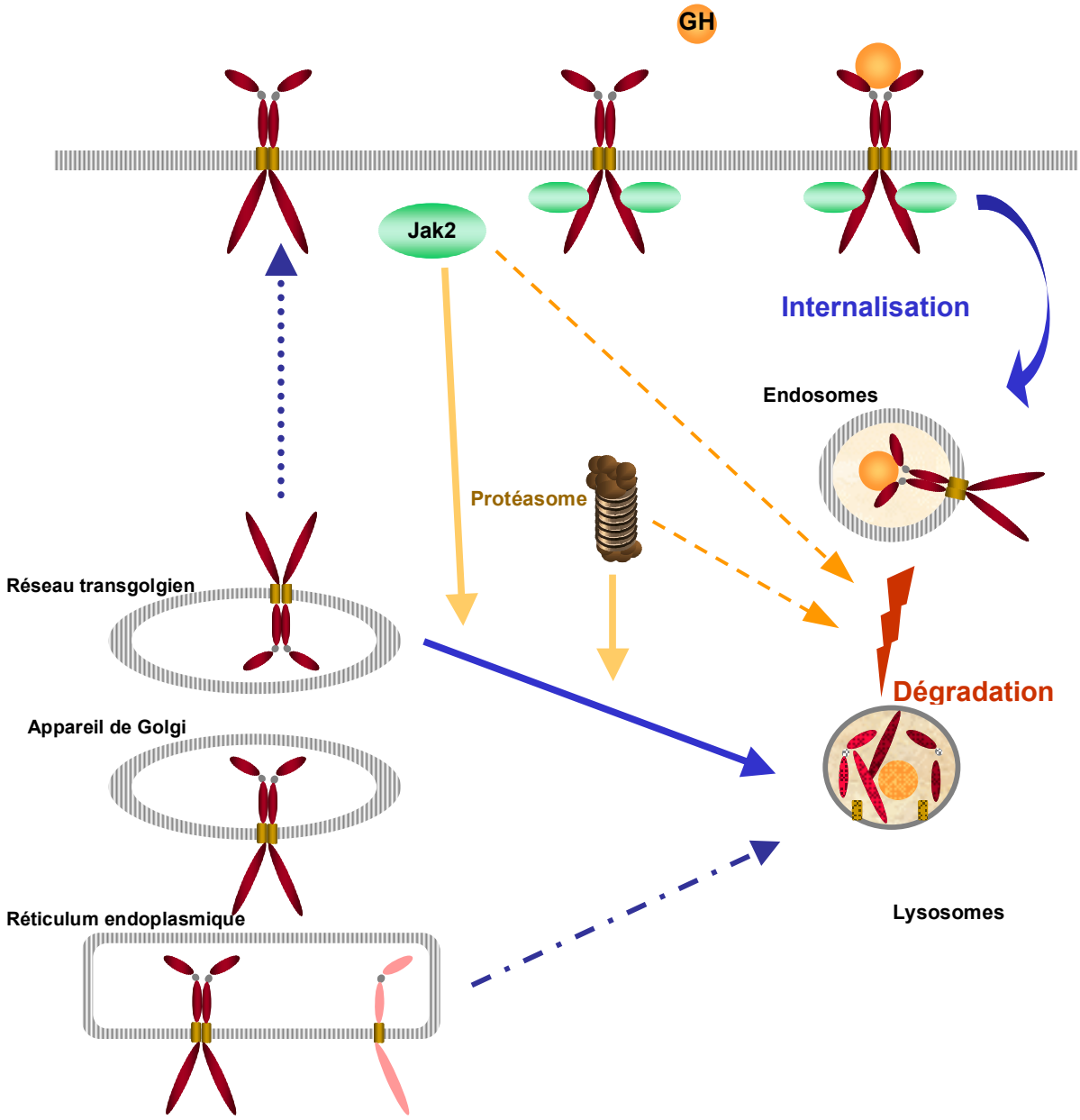


Figure 22 : Modèle proposé pour la régulation du trafic intracellulaire du GHR dans des cellules CHO

La majeure partie des GHR est stockée dans les compartiments intracellulaires. Suite à la stimulation par la GH, les complexes GH-GHR_2 sont internalisés vers la voie de dégradation. Jak2 et le protéasome semblent être partiellement impliqués dans la voie de dégradation des récepteurs internalisés. Une grande partie des GHR stockés n'est pas ciblée efficacement à la surface cellulaire : ces récepteurs seraient directement envoyés vers les compartiments de dégradation. Cette voie serait régulée par Jak2 et le protéasome (d'après Moulin *et al.*, 2003).

IV.3. L'internalisation indépendante des vésicules à clathrine

D'autres voies qui n'utilisent pas celle des puits recouverts de clathrine ont également été observées. C'est en étudiant l'implication de molécules accessoires (*e.g.*, l'epsine qui s'associe au complexe AP-2) permettant la mise en œuvre de l'internalisation des vésicules à clathrines, que l'importance physiologique de l'endocytose indépendante de la clathrine a été établie (Chen *et al.,* 1998 ; Benmerah *et al.,* 2000 ; pour revue, Johannes et Lamaze, 2002). Ces voies n'utilisent pas de systèmes connus pour le recrutement de transporteurs et le bourgeonnement d'intermédiaires de transport. A la place, elles exploitent l'hétérogénéité latérale de la composition lipido-protéique de la membrane plasmique pour sélectionner les transporteurs aussi bien que les composants structuraux des microdomaines de la membrane plasmique.

L'imagerie de protéines couplées à la GFP et d'analogues lipidiques conjugués à un fluorochrome dans des cellules vivantes a permis de visualiser des mouvements de molécules par des voies dépourvues de clathrine et, de cette façon, leur étude (Nichols *et al.,* 2001 ; Pelkmans *et al.,* 2001 ; Puri *et al.,* 2001). La possibilité que quelques unes de ces voies dépendent de domaines lipidiques spécialisés ou « lipid-rafts » a accentué l'intérêt porté par les « rafts » dans ces voies de capture, supposées constituer des plates-formes pour la classification de la membrane et les événements de signalisation (Simons et Ikonen, 1997). Désormais, l'existence de ces voies alternatives n'est plus matière à controverse et les efforts actuels ont pour but d'élucider la machinerie moléculaire de ces processus d'internalisation pauvrement caractérisés et de comprendre leurs rôles physiologiques dans la cellule.

IV.3.1. Les différentes voies indépendantes du manteau de clathrine

Les voies d'endocytose qui ne dépendent pas de la formation du manteau de clathrine incluent les voies les plus précocement identifiées, notamment la phagocytose, la pinocytose processus regroupant la macropinocytose, la voie des cavéoles et d'autres voies indépendantes des cavéoles ou des vésicules recouvertes de clathrine (pour revue, Conner et Schmid, 2003b). La phagocytose est la capture de grandes particules par les cellules selon un processus basé sur les réarrangements locaux du cytosquelette d'actine. Chez les eucaryotes, les cellules phagocytaires sont essentielles à la défense de l'hôte contre l'invasion de pathogènes, et la phagocytose contribue à l'inflammation et à la réponse immunitaire. De plus, l'engloutissement, définie comme « clairance phagocytaire » des corps cellulaires

générés par l'apoptose, joue un rôle clé dans l'homéostasie tissulaire. La macropinocytose est une réponse transitoire aux facteurs de croissance et agents mitogéniques qui contribue à la capture de phase fluide par l'intermédiaire de grandes vésicules de tailles hétérogènes. Des invaginations non recouvertes qui se détachent pour former des vésicules lisses sont communément observées par microscopie conventionnelle dans différents types cellulaires et participent à la capture de la phase fluide. Puis d'autres microdomaines spécialisés, tels que les radeaux lipidiques, « lipid-rafts », ou les cavéoles, enrichis en cholestérol et glycosphingolipides interviennent dans l'internalisation et dans d'autres processus biologiques.

IV.3.2. La voie des cavéoles

Les cavéoles caractérisées par leur forme typique en oméga inversé sont particulièrement abondantes dans les cellules endothéliales, ce qui a facilité l'observation de ces petites invaginations de la membrane plasmique (Palade, 1953 ; Yamada *et al.,* 1955). Bien que la description des cavéoles ait précédé de 10 années celle des vésicules à clathrine, leur rôle a été plus difficile à caractériser. L'identification d'une protéine particulière, la cavéoline-1 (*cf.* §IV.3.2.2.1), par l'équipe d'Anderson en 1992 (Rothberg *et al.,* 1992), en tant que protéine intégrale de cavéoles liant le cholestérol, a accéléré la caractérisation moléculaire de ces organites (Kurzchalia et Parton, 1999). Biochimiquement, les cavéoles peuvent être isolées comme les membranes résistantes au détergent (DRMs pour « Detergent-resistant membranes ») enrichies en cholestérol libre et glycosphingolipides. De nombreuses fonctions on été assignées aux cavéoles, incluant l'endocytose et la transcytose, le transport et l'homéostasie du cholestérol et, les régulations positives et négatives des signalisations induites par les facteurs de croissance et récepteurs couplés aux protéine G, NO, Ras (pour revue, van Deurs *et al.,* 2003). Ces structures fonctionneraient ainsi comme des plates-formes de signalisation au niveau de la membrane plasmique (pour revue, Johannes et Lamaze, 2002).

IV.3.2.1. Description structurale des cavéoles

Les cavéoles apparaissent typiquement comme des invaginations de membranes arrondies de 50 à 80 nm de diamètre (Figure 23). Leurs composition, apparence et fonction sont dépendantes du type cellulaire. Dans les cellules endothéliales, les cavéoles peuvent être

plus étranglées au niveau du col, ou bien elles peuvent contenir un diaphragme limitant la diffusion (Stan *et al.,* 1997, 1999). Dans les cellules musculaires, elles sont souvent organisées en groupes ou en rangs linéaires de plusieurs unités ayant la forme de fiole et sont impliquées dans la formation des tubules T (Parton *et al.,* 1997 ; Carozzi *et al.,* 2000). Au niveau des cellules épithéliales en culture, les cavéoles sont ouvertes vers le milieu extracellulaire, ne comprennent pas de diaphragme et apparaissant sous la forme d'indentations individuelles ou de grappes (Montesano *et al.,* 1982 ; Rothberg *et al.,* 1992).

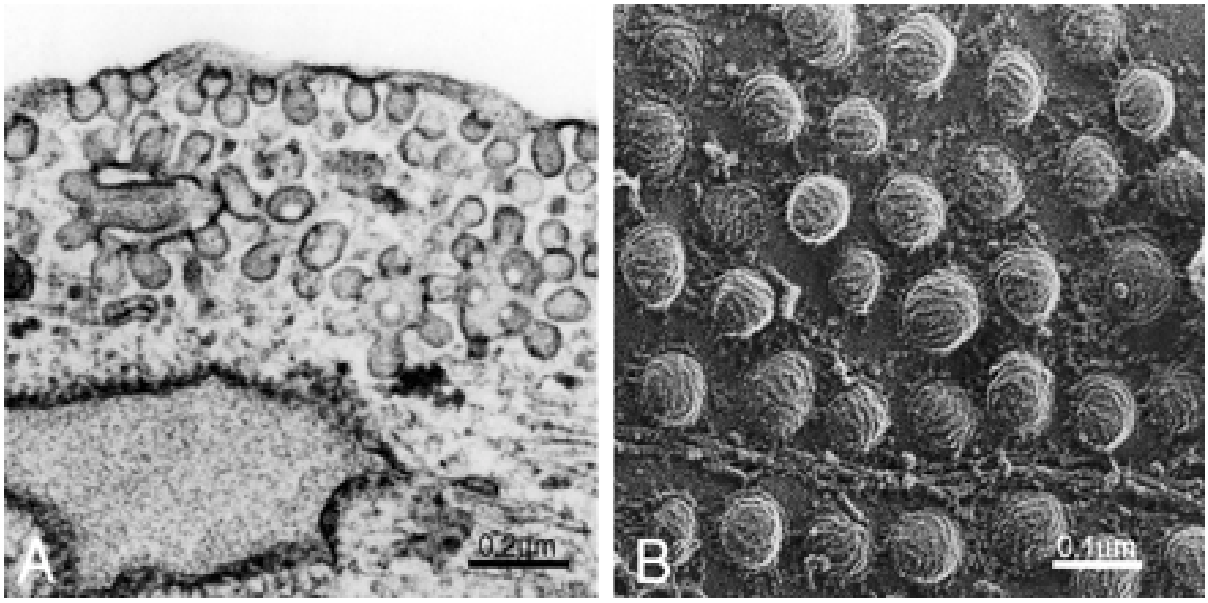


Figure 23 : Cavéoles sur la membrane plasmique de fibroblastes

Photographie obtenue par microscopie électronique à transmission (A) d'une coupe de fibroblaste montrant les cavéoles sous forme d'invaginations de la membrane plasmique et par cryodécapage en microscopie électronique à balayage (B). De nombreuses cavéoles décorent sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique (Shaul et Anderson, 1998).

Les techniques de microscopie électronique à balayage haute résolution (Peters *et al.,* 1985) et de congélation rapide (Rothberg *et al.,* 1992) appliquées à des cellules endothéliales et à des fibroblastes ont révélé, sur la face cytoplasmique des cavéoles, la présence de crêtes caractéristiques disposées comme des méridiens (Peters *et al.,* 1985) ou des spirales (Rothberg *et al.,* 1992). Ces crêtes forment un « manteau », très différent de l'aspect du revêtement de clathrine, présent sur la face cytoplasmique des puits et vésicules recouvertes. Le manteau cavéolaire a été étudié biochimiquement : il se trouve résistant à l'extraction par

les sels (Rothberg *et al.,* 1992), aux pH élevés (Rothberg *et al.,* 1992 ; Kurzchalia *et al.,* 1994), et aux détergents non ioniques (Kurzchalia *et al.,* 1992). Des modèles similaires de crêtes décorent les cavéoles invaginées aussi bien que des portions de la membrane plasmique avec différents degrés de courbure, indiquant le dynamisme de ces structures (Rothberg *et al.,* 1992). Une protéine membranaire intégrale, nommée VIP-21 puis cavéoline (Parton, 1996 ; Anderson, 1998 ; Kurzchalia et Parton, 1999 ; Smart *et al.,* 1999), entre dans la composition structurale des cavéoles (*cf.* §IV.3.2.2.1).

IV.3.2.2. Composition des cavéoles

IV.3.2.2.1. La famille des cavéolines

Un événement considérable dans les recherches sur les cavéoles a été accompli par la démonstration immunocytologique de la présence de la cavéoline en tant que composant des crêtes formant le manteau cavéolaire (Rothberg *et al.,* 1992). De plus, l'expression induite de cavéoline est suffisante pour conduire à la formation *de novo* de cavéoles dans les lymphocytes où les cavéolines ne sont normalement pas exprimées et les cavéoles absentes (Fra *et al.,* 1994). Les cavéolines sont également présentes au niveau du réseau transgolgien (Kurzchalia *et al.,* 1992 ; Dupree *et al.,* 1993) et dans un nouvel organite récemment identifié, le cavéosome (*cf.* §IV.3.2.3.1.2) (Pelkmans *et al.,* 2001).

La cavéoline-1 fait partie d'une famille de gènes comprenant également ceux codant pour la cavéoline-2 (Scherer *et al.,* 1996) et la cavéoline-3 (Way et Parton, 1996). Les cavéolines-1 et -2 ont des distributions tissulaires similaires, s'exprimant dans la plupart des types cellulaires chez les mammifères (Kurzchalia *et al.,* 1994 ; Parton, 1994 ; Scherer *et al.,* 1997 ; Scheiffele *et al.,* 1998), dont les cellules endothéliales (Garcia-Cardena *et al.,* 1997) et possèdent toutes deux des isoformes (α et β pour la cavéoline-1 et α, β et γ pour la cavéoline-2), alors que la cavéoline-3 n'est produite que par les cellules musculaires (Way et Parton, 1996 ; Tang *et al.,* 1996).

La cavéoline-1, longue de 178 acides aminés, est une phosphoprotéine de 22 kDa qui a été à l'origine identifiée comme substrat de phosphorylation de v-src dans les fibroblastes transformés par le Virus de Sarcome de Rous (Glenney, 1992 ; Glenney et Soppet, 1992). Elle a été clonée indépendamment sous le nom de VIP-21, composant des vésicules du réseau transgolgien (Kurzchalia *et al.,* 1992, 1994). Deux isoformes de la cavéoline-1 ont été découvertes : la cavéoline-1α contenant la séquence aminée 1-178 et la cavéoline-1β

comprenant les résidus aminés 32 à 178. La cavéoline-1β était supposée résulter de l'épissage alternatif du même ARNm codant pour la cavéoline-1α, mais récemment, Kogo et Fujimoto (2000) ont démontré leur traduction à partir de messagers différents eux-mêmes issus de l'initiation alternative de la transcription. La cavéoline-1 est phosphorylée soit sur les sites sérine/thréonine par la PKCα (Smart *et al.,* 1995 ; Mineo *et al.,* 1998 ; Isshiki et Anderson, 1999) soit sur les résidus tyrosine (Tyr14 étant le plus important) par c-src et probablement par d'autres récepteurs de types non RTK (Glenney et Soppet, 1992 ; Li *et al.,* 1996a ; Tiruppathi *et al.,* 1997 ; Aoki *et al.,* 1999 ; Nomura et Fujimoto, 1999). La phopshorylation sur les résidus tyrosine semble se produire principalement sur la cavéoline-1α. Cette caractéristique ainsi que la distribution apparemment différentes des isoformes entre les cavéoles profondément invaginées (contenant les 2 isoformes) et les cavéoles moins invaginées (contenant seulement cavéoline-1β) semble être la différence fondamentale détectée jusqu'à présent entre les deux isoformes de cavéoline-1 (Fujimoto *et al.,* 2000).

Les cavéolines comprennent toutes un domaine central hydrophobe long de 33 acides aminés (résidus 102-134 pour la cavéoline-1) adoptant une conformation en épingle à cheveux dans la membrane plasmique (Figure 24), permettant aux domaines C- et N-terminaux de faire face au cytoplasme (Dupree *et al.,* 1993 ; Dietzen *et al.,* 1995 ; Monier *et al.,* 1995), configuration acquise dès la traduction au niveau du réticulum endoplasmique.

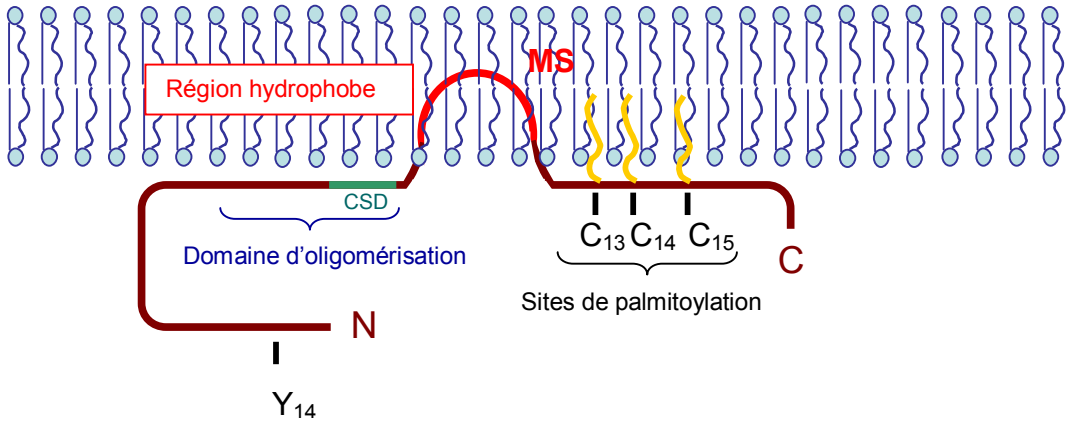


Figure 24 : Structure de la cavéoline-1α et son insertion membranaire caractéristique

La région N-terminale contient le CSD (« Caveolin Scaffolding Domain ») essentiel à la formation des oligomères de cavéolines et à l'interaction avec d'autres protéines. Le résidu tyrosine 14 (Y_{14}) constitue un substrat pour la kinase Src. Les résidus cystéine133, 143 et 156 ($C_{133,143,156}$) sont des sites de palmitoylation permettant d'améliorer l'ancrage membranaire. Les domaines C- et N-terminaux font tous deux face au cytoplasme grâce au domaine transmembranaire présentant une forme en épingle à cheveux (d'après van Deurs *et al.*, 2003). MS : « Membrane-Spanning domain ».

Les cavéolines-1 et -3 sont capables de former des homo-oligomères (Lisanti *et al.,* 1994 ; Monier *et al.,* 1995 ; Sargiacomo *et al.,* 1995) ou hétéro-oligomères avec la cavéoline-2 (Scherer *et al.,* 1997 ; Scheiffele *et al.,* 1998) (*cf.* §IV.3.2.2.1) par l'intermédiaire d'une région d'oligomérisation comprenant les acides aminés 61 à 101 (pour la cavéoline-1), proche de l'extrémité N-terminale du domaine d'insertion membranaire (Sargiacomo *et al.,* 1995). Cette étape a lieu dans l'appareil de Golgi (Figure 25).

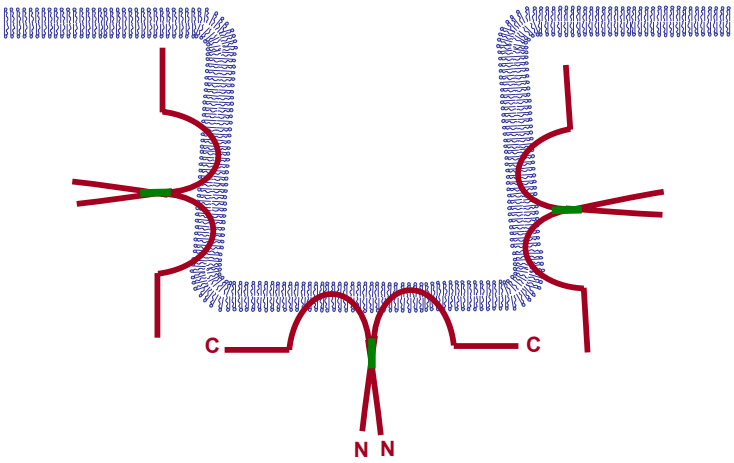


Figure 25 : Formation des oligomères de cavéoline

La cavéoline, *via* son domaine CSD, interagit avec une autre molécule de cavéoline afin de former un oligomère (d'après van Deurs *et al*., 2003). CSD : « Caveolin Scaffolding Domain ».

Une caractéristique très importante pour les cavéolines est leur capacité d'interagir avec d'autres protéines (Parton, 1996 ; Okamoto *et al.,* 1998) grâce à un domaine particulier, le « Caveolin Scaffolding Domain » ou CSD (Li *et al.,* 1996a), situé dans la région d'oligomérisation de la protéine (résidus 81-101 pour la cavéoline-1). Ce domaine est également indispensable à l'ancrage de la protéine dans la membrane cellulaire (Schlegel *et al.,* 1999) grâce à 7 résidus hydrophobes qui s'associeraient à la bicouche lipidique (Wimley et White, 1996). La région C-terminale (résidus 135-178) permet quant à elle l'interaction entre les oligomères de cavéolines (Song *et al.,* 1997) de façon à former un filament. Les cavéolines -1 et -3, au contraire de la cavéoline-2, sont palmitoylées sur 3 résidus cystéine (Cys133, Cys143 et Cys156) (Monier *et al.,* 1996) de la région C-terminale mais ne sont pas indispensables à l'adressage de la protéine aux cavéoles (Dietzen *et al.,* 1995). Dans les cellules endothéliales, la palmitoylation semble être un événement post-traductionnel irréversible, différence non négligeable par rapport aux autres protéines acylées où la palmitoylation réversible peut subir une régulation (Dunphy et Linder, 1998 ; Parat et Fox,

2001). La palmitoylation stabiliserait les oligomères de cavéolines (Monier *et al.,* 1996) en améliorant l'association de la protéine aux membranes (Parat et Fox, 2001). Le transport vésiculaire de la protéine depuis l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique nécessite en plus de son oligomérisation, la présence de la séquence aminée 71-80 de la cavéoline-1 (Liu *et al*., 2002).

IV.3.2.2.2. Formation du manteau des cavéoles

Les caractéristiques structurelles des cavéolines leurs confèrent la capacité de s'oligomériser, notamment grâce à leur domaine d'oligomérisation (Sargiacomo *et al.,* 1995). Cependant, il a été démontré que la formation du manteau cavéolaire exigeait la présence des isoformes 1 et 3 : la présence de la cavéoline-2 seule ne suffit pas à induire son trafic jusqu'à la membrane plasmique, qui s'arrête au niveau de l'appareil de Golgi (Scheiffele *et al.,* 1998 ; Mora *et al.,* 1999 ; Parolini *et al.,* 1999). La cavéoline-2 jouerait ainsi un rôle de protéine accessoire qui n'agit qu'en combinaison avec la cavéoline-1 ou -3.

Récemment l'équipe d'Anderson a proposé un modèle de mécanisme d'assemblage du filament de cavéoline (Fernandez *et al.,* 2002), base de la formation du manteau des cavéoles. Des techniques biophysiques ont permis d'obtenir des informations sur les structures secondaires et tertiaires des fragments N-terminaux de cavéoline-1 en solution. Ils ont déterminé une organisation en hélice α pour environ 20% de la protéine : la séquence 79-96 présente dans le domaine d'oligomérisation semble être la région concernée et constitue la seule structure secondaire du domaine N-terminal (Figure 26). Par coloration négative en microscopie électronique, les oligomères de cavéoline apparaissent s'organiser en filaments composés d'approximativement 5 sous unités de 10 nm de diamètre, sur une longueur de 50 nm. Chaque sous unité est composée de 7 copies du domaine monomérique N-terminal de la construction de cavéoline utilisée pour réaliser l'étude. La région en hélice α du domaine cytoplasmique induirait effectivement l'assemblage des sous unités. Les résultats obtenus par centrifugation analytique et sédimentation ont permis de corroborer les résultats obtenus en microscopie électronique, à savoir que la particule formant le maillon de base de construction du filament est constituée de 7 monomères de cavéoline assemblées latéralement les unes aux autres par l'intermédiaire de leurs régions 79-96 organisées en hélice α. La partie acide des résidus aminés située dans la région 67-70 se lierait aux résidus basiques permettant de constituer la structure d'hélice en vrille, causant l'enroulement de la région N-terminale autour de l'hélice.

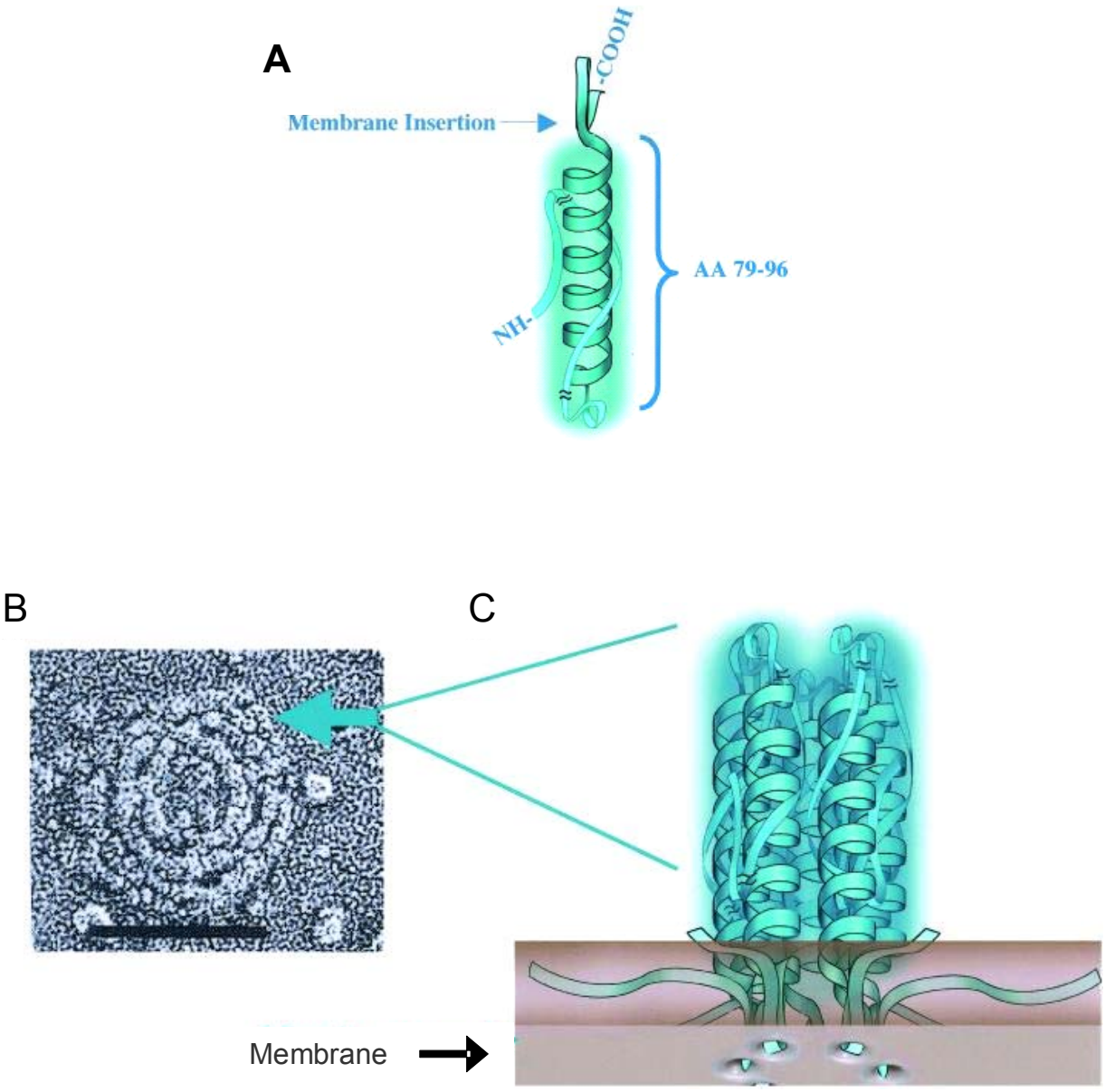


Figure 26 : Structure tridimensionnelle de la cavéoline-1

Un modèle de l'hélice α de la cavéoline-1 est présenté en A. Les extrémités de la protéine sont tronquées car leur localisation est encore mal définie. Cette partie de la molécule contribuerait à la taille de l'unité fonctionnelle, comme cela est schématisé par le nuage entourant l'hélice. Une image obtenue par cryodécapage montre le manteau filamentaire de cavéoline (B). En C est représenté la structure heptamérique de cavéoline-1. Chaque monomère de cavéoline-1 est lié l'un à l'autre par des interactions latérales entre les hélices α et les parties associées de la molécule (d'après Fernandez *et al*., 2002). Barre d'échelle : 0,1 µm.

Le segment d'insertion membranaire et la région C-terminale semblent être peu impliqués dans l'assemblage de l'heptamère de cavéoline, mais influencerait profondément la formation du filament. L'hélice α de la cavéoline-1 est juxtaposée à la boucle hydrophobe

insérant la molécule dans la membrane. Par conséquent, chaque hélice dans l'heptamère possède une boucle hydrophobe s'intégrant dans la membrane. De plus, 2 des 3 résidus de palmitate liés de façon covalente à l'extrémité C-terminale de la région d'insertion membranaire font partie de l'ancre membranaire. Ces résidus palmitate seraient critiques pour les interactions de la cavéoline avec le cholestérol (Uittenbogaard et Smart, 2000). D'après ce modèle, il est facile d'apprécier le contrôle de l'assemblage du filament par les lipides tels que le cholestérol qui augmente la stabilité des interactions latérales entre les sous unités circulaires (*cf.* §IV.3.2.2.4).

IV.3.2.2.3. Implication d'autres protéines dans la structure des cavéoles

La dynamine entre également dans la composition des cavéoles (Henley *et al.,* 1998 ; Oh *et al.,* 1998). Il s'agit de la même GTPase impliquée dans la formation des vésicules recouvertes de clathrine (Hinshaw, 2000). Cette protéine est localisée au niveau du col des indentations cavéolaires (Henley *et al.,* 1998 ; Oh *et al.,* 1998), indiquant son implication dans l'étranglement des cavéoles de la même façon que lors de la fission des vésicules à clathrine (De Camilli *et al.,* 1995 ; Sever *et al.,* 2000). Dans le cas de l'internalisation du virus SV40 par les cavéoles, la dynamine 2 présente une localisation membranaire réduite à 8 secondes (Pelkmans *et al.,* 2002), suggérant le caractère passager de cette protéine dans la composition des cavéoles. Elle appartiendrait à un groupe de facteurs recrutés en réponse à des signaux spécifiques. Les cavéoles contiennent également toute la machinerie moléculaire nécessaire à l'accostage et à la fusion vésiculaire : VAMP, NSF, SNAP, l'annexine et d'autres GTPases (Schnitzer *et al.,* 1995).

De plus, les cavéoles sont enrichies en protéines associées au GPI (Glycosyl-PhosphatidylInositol) et plusieurs récepteurs de types RTK et non RTK (Lisanti *et al.,* 1993 ; Sargiacomo *et al.,* 1993). Puisque ces kinases sont impliquées dans les événements de la transduction du signal, les cavéoles sont supposées constituer des sites spécifiques pour la transmission du signal (Anderson, 1998 ; Simons et Toomre, 2000) (*cf.* §IV.3.2.3.2).

IV.3.2.2.4. Composition lipidique

Des études effectuées en microscopie électronique ont permis de fournir des indications sur la composition lipidique spécifique des membranes cavéolaires dans différents types cellulaires. L'utilisation de sondes liant le cholestérol a montré

l'enrichissement des cavéoles en cholestérol (Simionescu *et al.,* 1983 ; Fujimoto *et al.,* 1997). Les études qui en découlèrent ont démontré que la cavéoline-1 est très étroitement liée au cholestérol libre et qu'elle s'associe également aux liposomes artificiels uniquement à la suite d'une incorporation de cholestérol (Murata *et al.,* 1995 ; Li *et al.,* 1996b ; Thiele *et al.,* 2000). De plus, le cholestérol est nécessaire à la stabilisation des oligomères de cavéoline (Monier *et al.,* 1996). Ces résultats se superposant à la sensibilité de l'architecture des cavéoles à une réduction de la concentration et de l'oxydation du cholestérol (Rothberg *et al.,* 1992 ; Smart *et al.,* 1994) ont établi les cavéoles comme des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol. D'autres études ont montré la présence d'une concentration en sphingolipides (sphingomyéline, céramide, gangliosides) du côté exocytoplasmique de la bicouche membranaire (Parton, 1994 ; Liu et Anderson, 1995 ; Schnitzer *et al.,* 1995d ; Fujimoto, 1996, Fujimoto *et al.,* 1997). La liaison de la cavéoline-1 à des glycophospholipides (tels que le ganglioside GM1) (Fra *et al.,* 1995) et à des acides gras (Trigatti *et al.,* 1999) ont également été indiqués. Cette composition lipidique - cholestérol, sphingomyéline, glycosphingolipides et acides gras saturés - est similaire à celle des radeaux lipidiques, microdomaines membranaires se formant dans tous types cellulaires (Ahmed *et al.,* 1997 ; London et Brown, 2000 ; Simons et Toomre, 2000).

IV.3.2.3. Rôle des cavéoles et de la cavéoline dans les fonctions cellulaires

IV.3.2.3.1. Rôle dans le processus d'endocytose

IV.3.2.3.1.1. La dynamique des cavéoles

Lorsque les cavéoles ont été découvertes (Palade, 1953 ; Yamada, 1955), leur premier rôle attribué a été le transport transcellulaire de protéines sériques depuis le flux sanguin vers les tissus à travers la couche de cellules endothéliales. Depuis, leur rôle s'est étendu au processus d'endocytose constitutif opérant en parallèle à celui des vésicules à clathrine. Ceci est dû à la présence du manteau de cavéoline décorant leur surface (Sandvig et van Deurs, 2002).

Cependant, une étude récente sur les propriétés dynamiques des cavéoles infirme cette hypothèse. Des protéines de fusion cavéoline-1-GFP ont été exprimées dans différentes lignées cellulaires et étudiées par des techniques variées d'extinction de fluorescence (FRAP) et d'imagerie sur cellules vivantes (Thomsen *et al.,* 2002). En accord avec la distribution de

cavéoline-1 endogène, la cavéoline-1-GFP apparaît aussi bien associée à la membrane plasmique qu'au réseau transgolgien, aux endosomes et également avec un nouvel organite identifié, le cavéosome (*cf.* §IV.3.2.3.1.2) (Pelkmans et Helenius, 2002). Cette approche a révélé une mobilité du pool intracellulaire de cavéoline, supportant l'idée que les vésicules associées à la cavéoline sont impliquées dans le trafic entre différents compartiments (Liu *et al.,* 2002 ; Nichols, 2002 ; Thomsen *et al.,* 2002). En revanche, la cavéoline-1-GFP associée aux cavéoles de la membrane plasmique restait hautement immobile. La fraction mobile des cavéoles n'excède pas 20%, indiquant la séquestration de la protéine au niveau des cavéoles dès son insertion dans la membrane plasmique *via* les vésicules mobiles du réseau transgolgien (Liu *et al.,* 2002). Ce comportement mime celui de la molécule d'adhésion cellulaire E-cadhérine, qui a initialement une fraction mobile élevée, mais qui, lorsqu'elle est stabilisée par le cytosquelette d'actine dans les plaques de jonction, voit cette mobilité chuter à moins de 10% (Thomsen *et al.,* 2002). Ainsi, la stabilité observée des cavéoles de la membrane plasmique est incompatible avec le rôle qui leur est prêté dans l'endocytose constitutive.

Des études biochimiques et ultrastructurales ont indiqué une association des cavéoles au cytosquelette d'actine (Stahlhut et van Deurs, 2000 ; Kanzaki et Pessin, 2002 ; Mundy *et al.,* 2002 ; Sun *et al.,* 2003), par l'intermédiaire de la filamine identifiée comme ligand de la cavéoline-1. De plus, le traitement de cellules exprimant la cavéoline-1-GFP avec de la cytochalasine D qui dépolymérise le cytosquelette d'actine, conduit à l'augmentation de la mobilité de la cavéoline et au regroupement des cavéoles au niveau de la membrane (Thomsen *et al.,* 2002). Les cavéoles sont donc stabilisées dans la membrane par le cytosquelette d'actine afin d'assurer un grand nombre de processus cellulaires.

IV. 3.2.3.1.2. Le mécanisme d'internalisation par les cavéoles

L'endocytose dépendante des cavéoles serait alors un processus dépendant d'un stimulus, tel que l'arrivée de l'élément à internaliser qui induit la perturbation du cytosquelette. Le virus SV40 constitue un modèle exceptionnel pour l'étude de ce processus (Pelkmans *et al.,* 2001 ; Pelkamns et Helenius, 2002). Ce virus utilise les antigènes du CMH-II pour se lier à la membrane puis se retrouve capté au niveau des invaginations cavéolaires, qui, grâce à une dépolymérisation des filaments d'actine et à l'intervention de la dynamine, se détachent de la membrane et se déplacent dans le cytosol. Ce déplacement est dépendant quant à lui du cytosquelette des microtubules. Les vésicules nouvellement internalisées ne

progresseraient pas vers l'intérieur de la cellule, mais des navettes cavéolaires nommées « cavicles » (Mundy *et al.,* 2002) prendraient le relais (Figure 27).

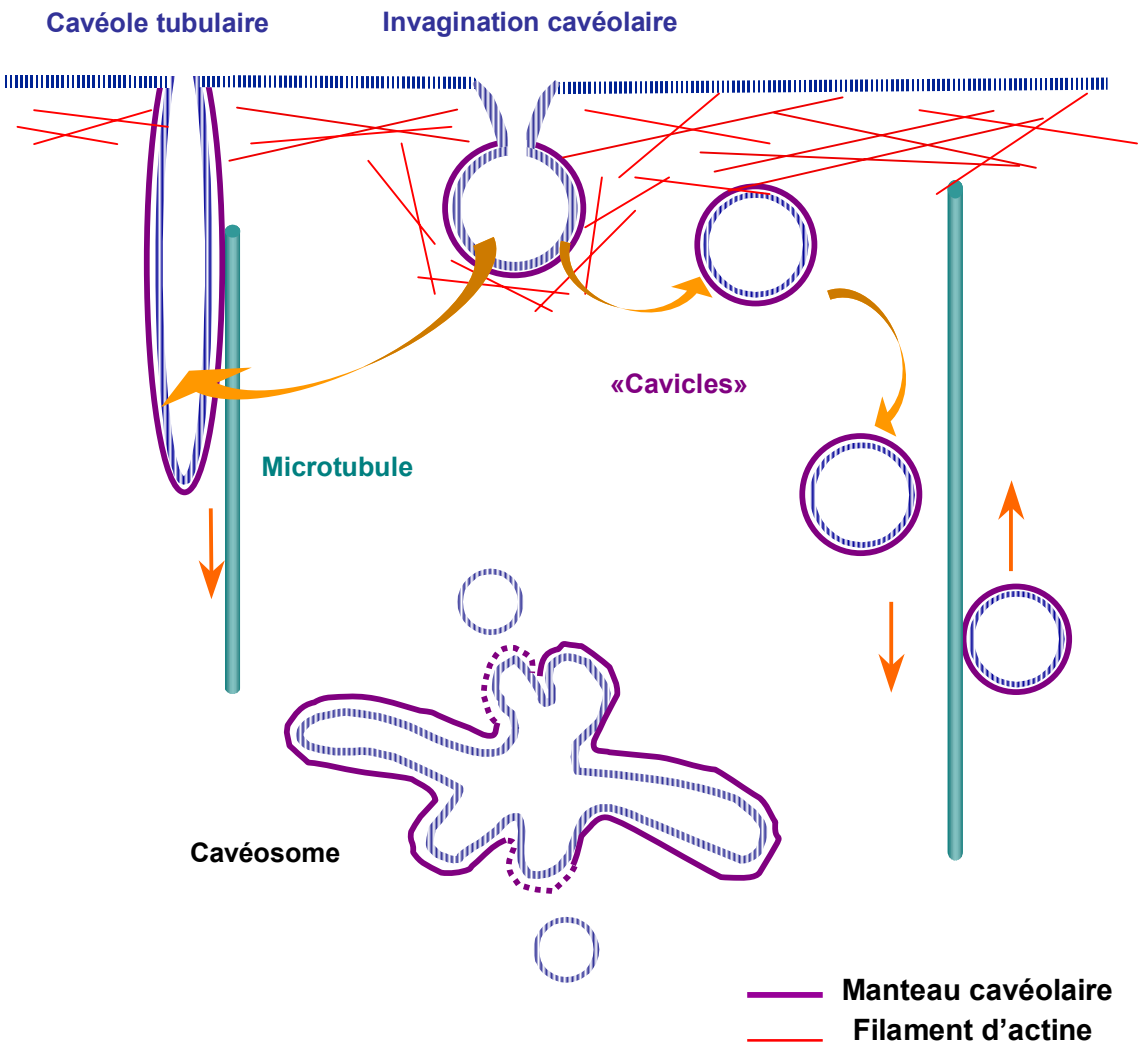


Figure 27 : Modèle proposé pour le trafic du système membranaire cavéolaire dans des cellules CHO

Ce système semble être composé d'une population d'invaginations cavéolaires assez immobile et stable au niveau de la membrane plasmique, de cavéosomes péricentrosomaux et d'une population d'intermédiaires de transport entre les cavéoles et cavéosomes incluant les « cavicles » et tubules. Ces « cavicles » bougent le long des microtubules mais les filaments d'actine corticale limitent leur mobilité vers l'intérieur (d'après Mundy *et al.*, 2002).

Ces « cavicles » effectueraient un va-et-vient le long des microtubules entre les vésicules primaires et un compartiment nouvellement découvert, le cavéosome (Pelkmans *et al.,* 2001). Il s'agit d'un organite membranaire distribué dans tout le cytoplasme, riche en

cholestérol, sphingolipides et cavéoline-1. Ce cavéosome pré-existant dans la cellule bénéficie d'un pH neutre afin que les « stations de dégradation » ne soient pas mises en jeu pour les molécules internalisées. Puis, un tri protéique s'instaure à l'intérieur du cavéosome qui, au fur et à mesure de l'accumulation des particules internalisées, subit un étirement de ses extensions qui sont alors remplies de particules mais dépourvues de cavéoline-1. Ces vésicules sont alors transportées vers d'autres organites intracellulaires le long des microtubules.

Le rôle de cette voie serait donc de fournir une route depuis la membrane plasmique vers les compartiments intracellulaires non hydrolysants tels que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, le noyau ou la mitochondrie.

Cependant, l'implication directe de la cavéoline dans l'endocytose n'est pas claire. D'une part, si le domaine N-terminal de la cavéoline est tronqué, la protéine agit comme un inhibiteurs dominant négatif de l'endocytose cavéolaire du virus SV40 (Roy *et al.,* 1999 ; Pelkmans *et al.,* 2001). D'autre part, de récents résultats indiquent que la présence de cavéoline peut réellement ralentir le phénomène d'endocytose par les cavéoles (Minshall *et al.,* 2000 ; Le *et al.,* 2002).

IV.3.2.3.1.3. Internalisation du complexe GH-GHR_2 par les cavéoles

La voie des cavéoles intervient dans l'internalisation de quelques cytokines, notamment du TGF-β (Razani *et al.,* 2001a ; Di Guglielmo *et al.,* 2003 ; Felberbaum-Corti *et al.,* 2003) et de l'IFN-γ (Sadir *et al.,* 2001 ; Subramaniam *et al.,* 2002). L'étude entreprise par Lobie *et al.* (1999) a indiqué pour la première fois l'internalisation efficace d'une cytokine, la GH, dans des cellules CHO transfectées avec l'ADNc codant pour le GHR de façon stable. Ils ont observé par immunocytologie en microscopie électronique qu'une partie des GHR de surface était localisée au niveau de microdomaines membranaires enrichis en cavéoline-1, ainsi que leur regroupement dans les cavéoles suite à une stimulation par la GH. Les agents liant les stérols tels que la filipine ou la nystatine ont été capable de perturber l'internalisation de GH marquée à l'iode 125. De plus, la transfection transitoire de ces mêmes cellules avec l'ADNc codant pour la cavéoline-1 a non seulement augmenté l'internalisation de la GH mais aussi la transcription induite par les protéines STAT-1, -3 et -5.

La voie des cavéoles serait ainsi, en plus de la voie des clathrines, impliquée dans le processus d'internalisation du complexe GH-GHR_2 mais l'adresserait plutôt vers les

compartiments intracellulaires non endosomaux comme l'appareil de Golgi, le noyau et la mitochondrie où la GH est accumulée (Lobie *et al.,* 1994).

IV.3.2.3.2. Rôle dans la transduction du signal et l'homéostasie du cholestérol

Dès que la cavéoline-1 a été identifiée comme marqueur protéique des cavéoles, des méthodes d'isolement de ces structures ont été développées (Anderson, 1998). Elles ont permis de montrer la richesse des cavéoles en molécules impliquées dans la transduction du signal (Anderson, 1998). Ces molécules de signalisation sont associées de façon dynamique aux cavéoles par l'intermédiaire de la cavéoline, notamment c-Src, c-Fyn, c-Cbl, Ras et plusieurs isoformes de la PKC (Okamoto *et al.,* 1998). A la lumière de ces résultats, il est naturel de penser que la cavéoline-1 module la transduction du signal en attirant les molécules de signalisation vers les cavéoles et en régulant leur activité.

Les cavéoles semblent être impliquées dans la signalisation de nombreux récepteurs membranaires (Figure 28). Plusieurs d'entre eux et des molécules de signalisation ont été localisés associés aux cavéoles, incluant le récepteur du NGF, de EGF, du PDGF, de l'insuline, certaines molécules de signalisation des MAPK et les sous unités α des protéines G (Li *et al.,* 1995 ; Song *et al.,* 1996 ; Furuchi et Anderson, 1998 ; Gustavsson *et al.,* 1999 ; Huang *et al.,* 1999 ; Mineo *et al.,* 1999 ; Parpal *et al.,* 2001).

La signalisation cellulaire induite par l'EGF paraît en effet être régulée négativement par les cavéoles puisque des colocalisations de molécules de signalisation avec la cavéoline ont été observées. De plus, la signalisation associée à l'EGF-R est activée par une réduction de la concentration en cholestérol cellulaire qui induit le démantèlement des cavéoles et microdomaines lipidiques non cavéolaires (Furuchi et Anderson, 1998 ; Ringerike *et al.,* 2002). Cependant, il a été récemment démontré par immunomarquage en microscopie à fluorescence et électronique que, dans les cellules non stimulées, l'EGF-R est plus concentré dans les domaines non cavéolaires distribués au hasard au niveau de la membrane plasmique (Ringerike *et al.,* 2002, Roepstorff *et al.,* 2002). Cette localisation montre le déplacement de ce récepteur, auparavant supposé être localisé dans les cavéoles, vers les microdomaines lipidiques non cavéolaires. Pourtant, il existe des cas où l'analyse morphologique a confirmé la localisation d'un récepteur au niveau des cavéoles, tels que le récepteur de l'insuline, le récepteur β_2-adrénergique et le récepteur TrkA (Gustavsson *et al.*, 1999 ; Huang *et al.*, 1999 ; Parpal *et al.*, 2001 ; Xiang *et al.*, 2002).

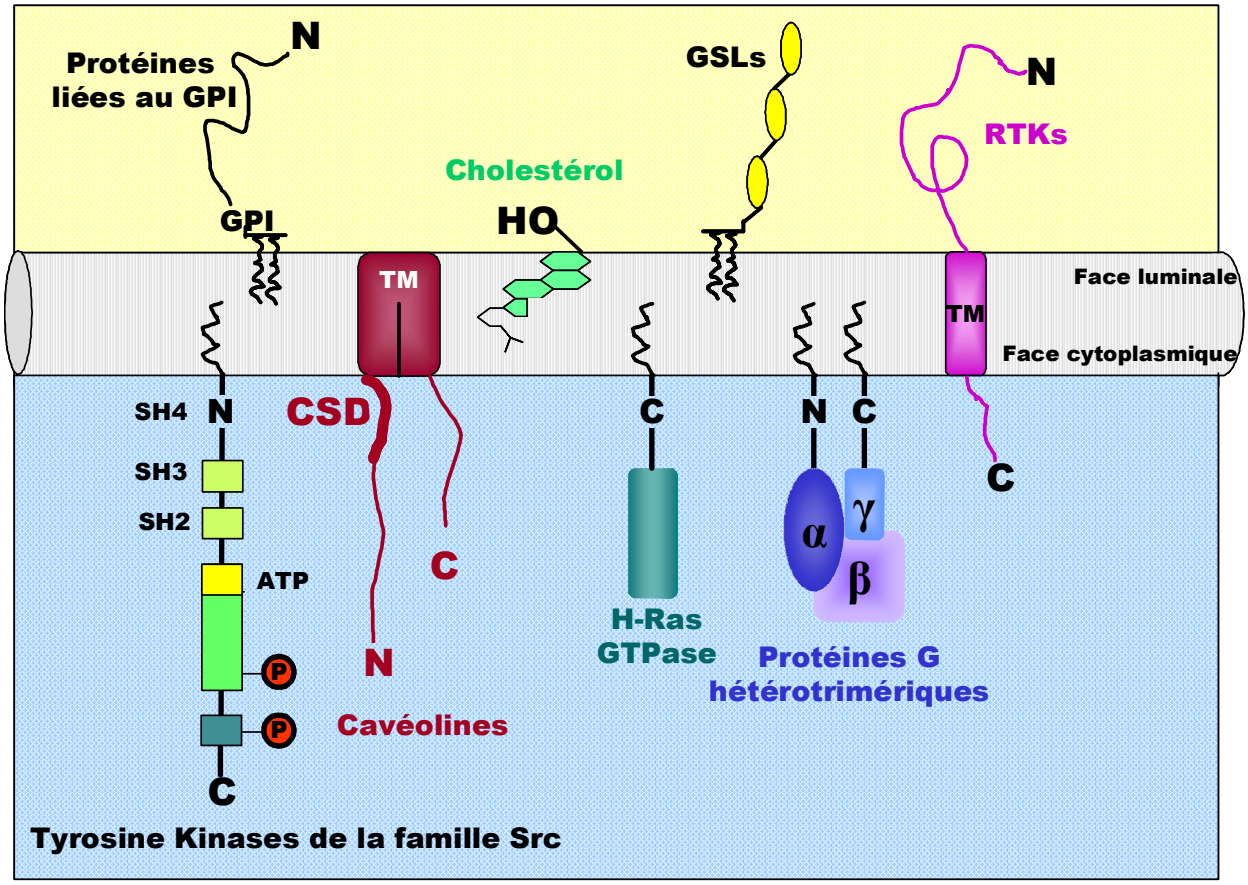


Figure 28 : Mécanisme de signalisation des cavéoles

De nombreuses molécules de signalisation comportant des modifications lipidiques (« Src-family kinase », « Ras GTPase », protéines G, protéines liées au glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)) et d'autres protéines de transduction du signal (« Receptor Tyrosine Kinases » (RTK)) sont localisées dans les cavéoles, structures enrichies en cholestérol, glycosphingolipides (GSL) et cavéolines. La cavéoline-1 interagit de manière fonctionnelle avec plusieurs de ces protéines *via* son « Caveolin Scaffolding Domain » (CSD). TM : domaineTransMembranaire (d'après Razani et Lisanti, 2001).

Un élément capital du rôle tenu par les cavéoles dans la transduction du signal est la fonction d'inactivation des molécules de signalisation mise en évidence pour la cavéoline-1 (Okamoto *et al.*, 1998). Plusieurs études ont montré l'interaction entre son domaine CSD (« Caveolin Scaffolding Domain ») et différentes molécules de signalisation. Li *et al.* (1996c) ont été les premiers à caractériser l'inhibition de l'activité kinase de c-Src par un peptide synthétique composé d'une séquence équivalente à celle du CSD. L'utilisation d'un peptide synthétique nommé « Scaffolding » a permis d'isoler 3 motifs, ϕXϕXXXϕ, ϕXXXXϕXϕ et ϕXϕXXXXϕXXϕ, où ϕ représente un résidu aminé aromatique (Couet *et al.*, 1997). Plusieurs protéines interagissant avec la cavéoline-1 contiennent l'une de ces séquences

(Smart *et al.*, 1999). Ce peptide a montré un effet inhibiteur de l'activité eNOS (« endothelial Nitric Oxide Synthase ») suite à son introduction dans des cellules vivantes (Bucci *et al.,* 2000). La synthéthase NO contrôle plusieurs processus importants, tels que l'angiogenèse, la vasorelaxation et la perméabilité membranaire (Goligorsky *et al.*, 2002). Par interaction avec le CSD de la cavéoline-1, cette enzyme régule négativement la production de NO (Bucci *et al.*, 2000). Dans les cellules dépourvues de cavéole, eNOS est localisée au niveau des microdomaines non cavéolaires. L'expression de la cavéoline-1 et la formation de cavéoles dans de telles cellules conduit à l'interaction de la cavéoline-1 avec eNOS, et de ce fait, à une trop forte inhibition de la libération de NO par rapport aux cellules sans cavéole (Sowa *et al.*, 2001). L'absence de cavéole chez des souris déficientes en cavéoline cause l'activation constitutive de eNOS, confirmant l'importance physiologique de ces organites dans la régulation de eNOS (Drab *et al.*, 2001 ; Razani *et al.*, 2001b).

Bien que les interactions entre la cavéoline-1 et le molécules de signalisation suppriment souvent leur activité (Smart *et al.*, 1999), l'interaction par le CSD peut parfois stimuler l'activité ou n'exercer aucun effet (Liou *et al.*, 2001). Les cavéoles apparaissent être importantes pour la signalisation du calcium (Isshiki et Anderson, 1999), notamment en tant que plate-forme d'initiation de la vague calcique des cellules musculaires, endothéliales et des fibroblastes. De la même manière, l'activité kinase du récepteur de l'insuline est stimulée par la cavéoline et le récepteur β_2-adrénergique nécessite une localisation cavéolaire pour permettre sa transduction du signal (Yamamoto *et al.*, 1998 ; Xiang *et al.*, 2002). L'expression d'un mutant dominant négatif de la cavéoline (Cav^{DVG}) qui réduit le nombre de cavéoles à la membrane plasmique bloque l'activation de Raf induite par H-Ras (Roy *et al.*, 1999). Cependant, cette inhibition semble avoir lieu par l'intermédiaire d'une action indirecte de la cavéoline sur H-Ras (Roy *et al.*, 1999). Le réapprovisionnement de la membrane en cholestérol renverse totalement l'effet inhibiteur de Cav^{DVG} sur l'activation de Raf. Parce que la cavéoline est une protéine de liaison du cholestérol qui affecte l'homéostasie du cholestérol l'effet de la cavéoline sur la signalisation de H-Ras pourrait être induite indirectement par l'effet de la cavéoline sur le taux de cholestérol membranaire (Pol *et al.*, 2001).

La cavéoline-1 modulerait la transduction du signal par une interaction avec les lipides plutôt qu'avec les protéines. Il existe de vraies preuves génétiques et expérimentales de l'implication de la cavéoline-1 dans le maintien des taux de cholestérol des cavéoles. Le cholestérol cavéolaire, en retour, est nécessaire pour l'association de certaines molécules de

signalisation au domaine CSD de la cavéoline-1, ainsi que pour la modulation de leur interaction (Liu *et al.,* 2002).

Le cholestérol constitue, comme nous l'avons vu, un élément clé pour l'intégrité structurale et la fonction des cavéoles (Ikonen et Parton, 2000). De plus, plusieurs observations confirment le rôle des cavéoles dans le maintien de l'homéostasie cellulaire du cholestérol (Fielding et Fielding, 2001). Elles semblent représenter des sites importants pour son transport depuis les organites intracellulaires vers les accepteurs extracellulaires tels que HDL (« High Density Lipoprotein »). De la même façon, la régulation négative de l'expression de la cavéoline et des cavéoles dans les fibroblastes conduit à une augmentation de l'efflux de cholestérol ainsi que de la quantité de cholestérol cavéolaire (Fielding et Fielding, 2001). Une fonction de la cavéoline-1 serait donc de maintenir l'architecture lipidique cavéolaire en remplaçant le cholestérol oxydé par du cholestérol nouvellement synthétisé (Liu *et al.,* 2002). En conséquence, cette protéine serait impliquée dans la formation des microdomaines lipidiques (Ikonen et Parton, 2000) en transportant le cholestérol nouvellement synthétisé vers la membrane plasmique (Smart *et al.,* 1996).

La transduction des signaux de surface cellulaire et la régulation de l'homéostasie du cholestérol apparaissent constituer des activités étroitement liées (Smart *et al.,* 1999 ; Fielding et Fielding, 2000 ; pour revue, Fielding et Fielding, 2003). L'efficacité de la transduction du signal provenant des cavéoles est sensible à leur contenu en cholestérol libre (Fielding et Fielding, 2000). Le taux de transfert de cholestérol à l'intérieur et hors de la cavéole répond à la phosphorylation des protéines de signalisation durant la transduction du signal (Fielding *et al.,* 2002). Aussi, une réduction de cholestérol libre induite par la présence de cyclodextrine, conduit à la dissociation des protéines de signalisation des cavéoles (Furuchi et Anderson, 1998).

IV.3.2.3.3. Rôle dans le transport lipidique : hypothèse de la structure lipidique

Le cholestérol de la membrane plasmique peut être adressé directement vers le réticulum endoplasmique (Lange, 1994). Le cholestérol libre, les esters et éthers de cholestérol des HDL liés à SRB1 (« Scavenger Receptor B1 ») peuvent également progresser vers des sites intracellulaires *via* les cavéoles (Graf *et al.*, 1999). L'expression de cavéoline a été liée à l'import de cholestérol (Fielding et Fielding, 2001), mais la migration rapide de

cavéoline vers le réticulum endoplasmique après l'oxydation du cholestérol cavéolaire (Smart *et al.*, 1994) suggère que la cavéoline joue un rôle direct dans l'import du cholestérol. Toute l'énigme de ce rôle réside dans la compréhension et la caractérisation d'un mode de transport cytosolique accompli par une protéine membranaire intégrale.

Une solution à ce puzzle serait l'existence de la cavéoline-1 sous une forme soluble. Plusieurs laboratoires ont confirmé la découverte initiale fait par Uittenbogaard *et al.*, (1998) montrant la présence d'un pool de cavéoline-1 soluble. Cette dernière est associée au cholestérol et se comporte comme une protéine enrobée dans une particule ayant la taille (Ito *et al.*, 2002) et la faible densité (Li *et al.*, 2001) caractéristiques des HDL. Les esters de cholestérol qui entrent dans les cellules par les cavéoles semblent être associés à la cavéoline-1 cytosolique. Ce serait cette même particule qui transporterait le nouveau cholestérol depuis le réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique (Graf *et al.*, 1999). La liaison de ApoA-1 à SRB1 stimule la formation de particules lipidiques cytosoliques contenant la cavéoline-1, le cholestérol et des phospholipides (Ito *et al.,* 2002). Les cellules sécrétoires exocrines sécrètent la cavéoline-1 dans des particules HDL contenant ApoA-1, suggérant l'implication des particules enrichies en cavéoline dans l'assemblage de lipoprotéines en vue d'être libérées au niveau du cytoplasme. Les particules de cavéoline cytoplasmiques solubles seraient également importantes pour la biogenèse de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques (Pol *et al.*, 2001).

La biogenèse des gouttelettes lipidiques n'est pas entièrement comprise (Londos *et al.,* 1999 ; Murphy et Vance, 1999). Elles dérivent du réticulum endoplasmique, où les triglycérides et les esters de cholestérol sont synthétisés, et sont supposés être entourées d'une monocouche phospholipidique (Londos *et al.,* 1999 ; Murphy et Vance, 1999). Ces observations suggèrent une accumulation de lipides neutres au niveau du cœur hydrophobe de la bicouche lipidique induisant la séparation des feuillets lipidiques pour former un gonflement qui bourgeonne depuis la membrane du réticulum endoplasmique afin de libérer une gouttelette lipidique. Une telle structure serait incapable d'incorporer des protéines transmembranaires possédant des domaines hydrophiles de part et d'autre de cette membrane. Les cavéolines, en revanche, ne présentent pas de domaine luminal hydrophile, et pourraient ainsi diffuser librement entre la membrane du réticulum endoplasmique et la monocouche entourant la gouttelette naissante. Les cavéolines n'auraient pas besoin de se dissocier de la membrane du réticulum endoplasmique et d'exposer leur domaine hydrophile au cytosol pour entrer dans les gouttelettes (Figure 29).

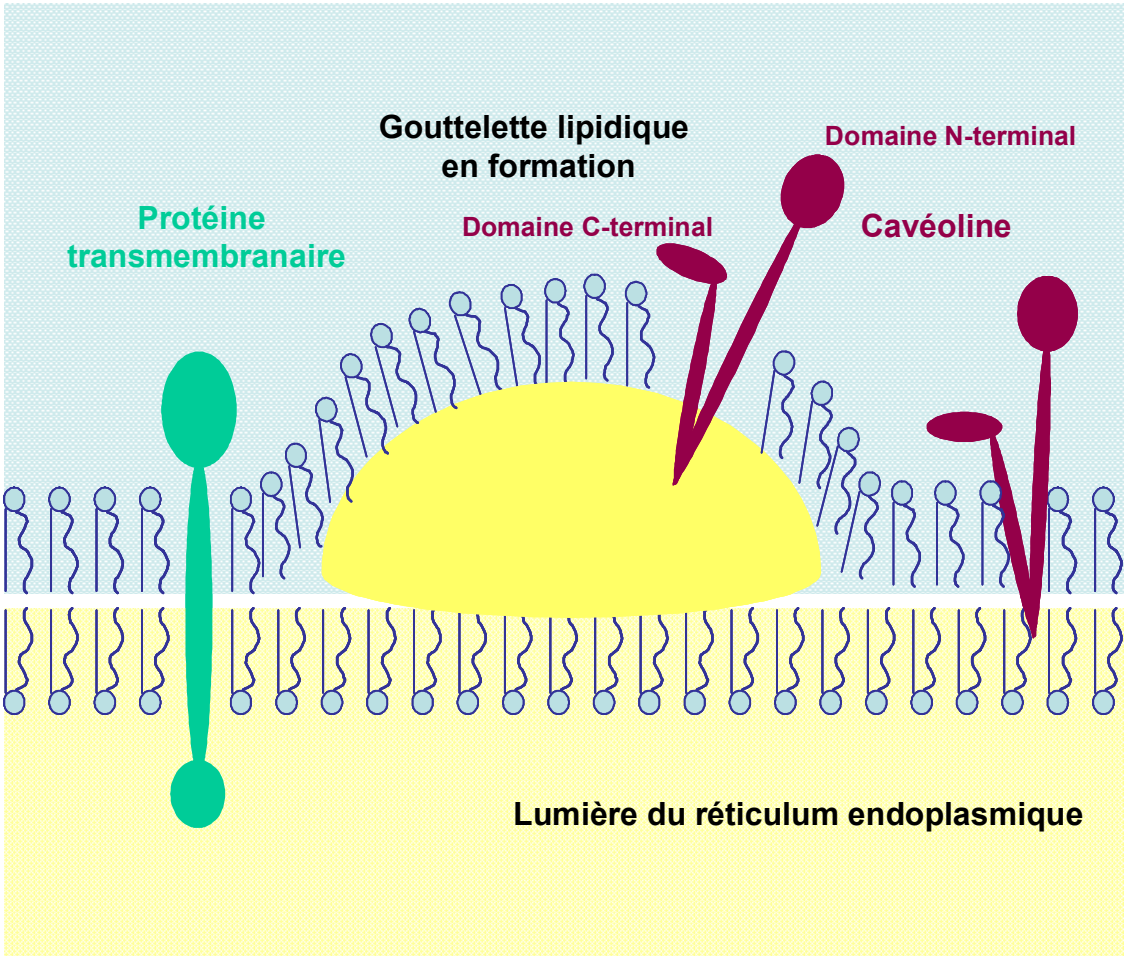


Figure 29 : Modèle d'insertion de la cavéoline-1 au sein d'une particule lipidique

La synthèse des lipides neutres dans la membrane du réticulum endoplasmique induit un gonflement par accumulation au centre de la membrane provoquant la séparation des feuillets lipidiques. La gouttelette peut éventuellement être libérée dans le cytosol, entourée d'une monocouche phospholipidique dérivée du réticulum endoplasmique. Les protéines transmembranaires sont exclues des gouttelettes en formation. En revanche, la cavéoline-1 peuvent diffuser librement entre la gouttelettes en formation et la membrane du réticulum endoplasmique puisqu'elle ne contient pas de domaine hydrophile (d'après Brown, 2001).

Cette hypothèse suggère l'entrée des cavéolines dans les gouttelettes lipidiques au moment de leur formation, lorsqu'elles sont encore en contact avec le réticulum endoplasmique. Cette affinité des cavéolines pour les gouttelettes lipidiques, serait la conséquence soit d'une liaison à une protéine ou à un lipide composant la gouttelette, soit à une préférence structurale pour l'état physique de la monocouche phospholipidique de la gouttelette ou du cœur lipidique neutre. L'accumulation des lipides neutres dans le réticulum endoplasmique entraînerait une saturation de quelques composants de la machinerie du

transport, probablement un transporteur spécifique, afin de permettre à la cavéoline-1 d'accéder aux gouttelettes lipidiques. L'accumulation des cavéolines dans le réticulum endoplasmique provoquerait un changement de ses propriétés membranaires et stimulerait l'affinité des cavéolines pour les gouttelettes lipidiques, soit en changeant les propriétés physiques de la membrane, soit en induisant un changement conformationnel des cavéolines (Ostermeyer *et al.,* 2001).

La cavéoline-1 exerce alors une fonction dans le transport lipidique extra- et intracellulaire (Liu *et al*., 1999). Elle ne se comporte pas comme un simple transporteur lipidique mais semble plutôt faire partie d'une nouvelle structure lipidique intracellulaire qui transporte les lipides entre des organites comme le font les lipoprotéines plasmatiques entre les tissus.

La cavéoline-1 apparaît exercer ses fonctions principales dans le transport lipidique, le trafic membranaire et la signalisation cellulaire. Le mécanisme de ces fonctions nécessite encore de nombreuses études et montre la complexité du trafic intracellulaire de cette protéine (Figure 30). Un modèle du trafic de la protéine depuis son site de synthèse vers les divers compartiments cellulaires serait le suivant (Liu *et al*., 2002) : elle apparaît insérée cotraductionnellement dans la membrane du réticulum endoplasmique par ses extrémités cytosoliques C- et N-terminales. Elle est ensuite incorporée dans des vésicules de sécrétion se dirigeant vers l'appareil de Golgi (Machleidt *et al.*, 2000) où elle s'oligomérise et devient insoluble aux détergents (Lisanti *et al*., 1993). Le transport vésiculaire vers la surface cellulaire dépend de l'aptitude de la molécule à s'oligomériser. Une fois la surface cellulaire atteinte, la cavéoline-1 s'incorpore dans une cavéole fonctionnelle susceptible de s'internaliser et de se recycler. Selon le stade du cycle d'internalisation, la cavéoline-1 pourrait retourner dans le cytosol sous la forme d'une protéine soluble enrobée dans une particule lipidique. La séquence protéique contrôlant cette étape n'est pas connue mais demeure sous la dépendance de la palmitoylation des cystéines 133, 143, et 156 (Uittenbogaard *et al*., 2000). Plusieurs cibles sont proposées pour la cavéoline 1 soluble : 1) elle se dirigerait vers le réticulum endoplasmique pour capturer le cholestérol nouvellement synthétisé et le transporter vers les cavéoles ou pour s'incorporer dans la lumière du réticulum endoplasmique. Dans ce cas, la cavéoline-1 soluble est introduite dans des particules apparentées aux HDL sécrétées par la cellule (Liu *et al.*, 1999) ; 2) une autre possibilité serait la rétention de la cavéoline-1 dans le cytosol où une partie de ce pool soluble serait adressé aux gouttelettes lipidiques (Pol *et al*., 2001) ; 3) ou la destination de la

cavéoline-1 soluble est la mitochondrie où elle a été mise en évidence très récemment (Li *et al.*, 2001). Rien n'est encore connu sur la régulation de ces distributions ou sur le mécanisme responsable de sa conversion depuis la membrane plasmique vers sa forme soluble.

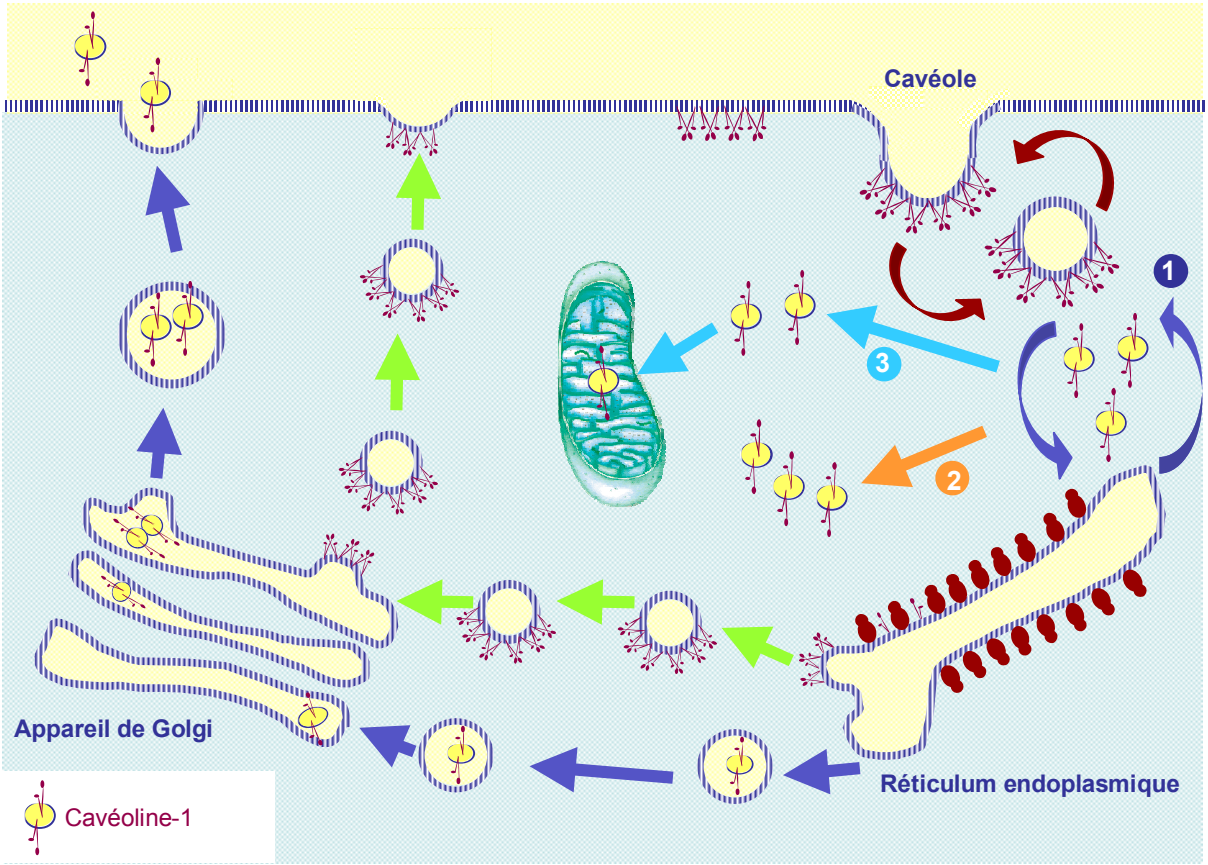


Figure 30 : Modèle du trafic de la cavéoline-1 dans la cellule

La cavéoline-1 apparaît insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique cotraductionnellement. Elle est ensuite dirigée vers l'appareil de Golgi afin d'être acheminée vers la membrane plasmique (circuit vert). Les cibles de la protéine soluble sont : 1) le réticulum endoplasmique, 2) le cytosol ou 3) la mitochondrie (d'après Liu *et al.*, 2002).

Les cavéoles représentent probablement un compartiment cellulaire à part entière avec une structure bien établie mais sans aucune fonction actuellement définie à cause de l'impossibilité d'assigner un ensemble de propriétés spécifiques au cavéoles. Elles semblent plutôt représenter des domaines stables de la membrane plasmique avec une composition lipidique et protéique favorisant plusieurs fonctions différentes (*e.g.*, l'internalisation, le trafic intracellulaire, la transduction du signal, l'homéostasie du cholestérol et des lipides, la

progression tumorale) dictées par les besoins de la cellule en fonction de l'état de la croissance, de la différentiation ou de la transformation.

Alors que la voie des vésicules à clathrine demeure la principale utilisée pour l'endocytose du complexe GH-GHR_2 dans le but de subir une dégradation et ainsi, de participer à la régulation négative de sa signalisation, la voie des cavéoles serait préférablement proposée pour l'internalisation de complexe devant être distribué dans les différents compartiments intracellulaires. L'enrichissement des cavéoles en molécules impliquées dans la transduction du signal (PKC, c-Cbl, Ras) *via* leur interaction avec le domaine CSD de la cavéoline-1 suggère un rôle de ces structures plus important dans la signalisation de la GH plutôt que dans son internalisation. Cette hypothèse peut être confortée par l'étude menée par Lobie *et al*. (1999) où la transfection de cellules CHO avec l'ADNc codant pour la cavéoline-1 a montré, suite à une stimulation par la GH, une augmentation de la transcription des facteurs STAT-1, -3 et -5. Ces facteurs vont se fixer et activer la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme, la différenciation et la croissance cellulaire.

V. LES EFFETS PHYSIOLOGIQUES ET METABOLIQUES DE L'HORMONE DE CROISSANCE

La GH exerce des effets pléïotropes sur la différenciation et la prolifération cellulaires, le métabolisme et la morphologie (Isaksson *et al*., 1985). Quelques uns des ces effets sont obtenus en réponse à une action directe de la GH par l'intermédiaire de son récepteur spécifique localisé sur ses cellules-cibles, et d'autres effets sont induits par d'autres facteurs eux-mêmes stimulés par la GH, plus particulièrement l'IGF-1 dont l'expression au niveau du foie et d'autres tissus est fortement stimulée par la GH. La spécificité des effets physiologiques est obtenue par l'action directe, indirecte de l'hormone ou par la combinaison des deux au niveau de ses tissus-cibles.

La distribution des résidus aminés amphiphiles de la troisième hélice α de la GH a été reconnue comme très importante pour permettre à la molécule d'exercer ses fonctions biologiques (Hara *et al*., 1978 ; Chen *et al*., 1990), notamment le résidu Gly120 chez l'homme semble être crucial pour l'action de la GH (Chen *et al.*, 1991).

V.1. Effets sur la multiplication cellulaire et la croissance

Durant le cycle de vie des vertébrés, différents mécanismes endocrines contrôlent la croissance. Pendant la croissance embryonnaire et fœtale, la masse corporelle s'accroît par multiplication et croissance cellulaire. A ce stade, la GH ne semble pas être impliquée, au contraire de l'insuline et probablement des IGF aidés par certaines hormones thyroïdiennes qui joueraient un rôle dominant. Cependant, des enfants souffrant de mutations du gène codant pour la GH ou le GHR présentent une taille normale (Laron, 1993 ; Takahashi *et al*., 1996). De plus, l'interaction du GHR avec la signalisation induite par la liaison de Jak2 et des molécules STAT-1 et -5 au niveau du foie fœtal de rat (Phornphutkul *et al.,* 2000 ; pour revue, Kuhn *et al*., 2002), suggérant une activité autre pour la GH durant cette période. Chez les espèces naines aviaires, la croissance embryonnaire et fœtale est normale, soulignant la non fonctionnalité d'un GHR fonctionnel dans le cadre d'une croissance prénatale normale (Kuhn *et al.,* 2002). C'est seulement après la naissance ou l'éclosion que la croissance devient dépendante de la sécrétion pulsatile de GH par les cellules somatotropes en stimulant la production d'IGF et en interagissant avec les hormones thyroïdiennes. Toutes les hormones sont alors impliquées dans le maintien de la taille lors de la post-puberté et dans la préparation de la phase reproductive.

L'effet phénotypique prédominant de la GH est de stimuler la croissance osseuse longitudinale durant les périodes post-natale et pubertaire. Cette action est obtenue par la stimulation coordonnée de la prolifération des chondrocytes et ostéoblastes et des effets sur la fonction de différenciation cellulaire. La déficience en GH est une condition bien caractérisée qui conduit à un retard de croissance, et peut être causée par plusieurs états génétiques et physiopathologiques (Gluckman *et al*., 1981). Les effets de la GH sur la croissance peuvent être induits par la régulation de facteurs intermédiaires tels que l'IGF-1 (Daughaday et Rotwein, 1989). Dans la plupart des conditions où la GH circulante est peu abondante, les taux d'IGF-1 sont également réduits. De la même manière, lorsque les taux de GH sont augmentés (*e.g*. lors de gigantisme ou d'acromégalie), les taux d'IGF-1 circulant sont élevés (Sonksen *et al*., 1991). L'administration de GH recombinante à des individus souffrant de nanisme accélère la croissance et augmente les taux d'IGF-1 circulants. La GH induit l'expression de l'IGF-1 dans de nombreux tissus suggérant une synthèse locale tissulaire d'IGF-1 en réponse à la GH (Roberts *et al*., 1987). Cependant, il apparaît que

l'IGF-1 peut exercer des fonctions indépendamment de la GH. Des preuves génétiques avancent que bien que la GH n'affecte apparemment pas la croissance prénatale, l'IGF-1 y joue un rôle majeur. Des souris portant des mutations « null » du gène de l'IGF-1 naissent avec une petite taille et, si elles survivent, grandissent peu lors des stades de développement postnatals (Liu *et al*., 1993, 1998b ; Powell-Braxton *et al*., 1993). Un certain nombre de tissus non hépatiques produisent l'IGF-1, tels que le muscle lisse, la peau, le poumon, l'os et le cartilage. Des études récentes de transgenèse ciblée du gène de l'IGF-1 spécifique du foie ont montré que la croissance de la souris était normale malgré la manque d'IGf-1 hépatique (Sjogren *et al*., 1999 ; Yakar *et al*., 1999). Ces données indiquent que la GH peut alors agir directement sur ses tissus-cibles en induisant les changements métaboliques et peut également stimuler IGF-1 d'une façon autocrine ou paracrine. La GH et l'IGF-1 agissent alors de concert afin de stimuler la croissance (Green *et al*., 1985). Par exemple, la GH agit directement sur l'os en stimulant la différenciation de précurseurs cellulaires spécifiques. La GH stimule également la production d'IGF-1 qui stimule l'expansion clonale des cellules osseuses différenciées (Isaksson *et al*., 1982). La GH est donc unique dans le sens où c'est la seule hormone à induire la croissance osseuse en fonction de sa concentration (Cheek et Hill, 1974).

En revanche, la GH semble exercer de nombreux effets indépendamment de l'IGF-1, directement en interagissant avec son récepteur spécifique. Des mutations de la région codante pour le GHR peuvent induire un syndrome de résistance à la GH conduisant à un retard de croissance (Laron, 1993). L'expansion de la zone germinale de la plaque de croissance paraît également sous le contrôle d'un effet direct de la GH puisque ce phénomène est observé chez des souris IGF-$1^{-/-}$ (Wang *et al*., 1999a). STAT-5b, molécule de la voie de transduction du signal préférentiellement utilisée par la GH, semble être impliquée dans l'effet de croissance générée *via* la liaison de l'hormone au GHR. Récemment, une mutation dans le gène de STAT-5b a été étudiée chez l'homme (Kofoed *et al*., 2003). Elle induit un ralentissement de la croissance. Parallèlement, une autre équipe a généré deux lignées de souris souffrant de nanisme : une exprimant un antagoniste de la GH (GHA) et une dont le gène codant pour le GHR est délété ($GHR^{-/-}$) (Coschigano *et al*., 2003). Dans la lignée exprimant le GHR délété, une sévère diminution de sa masse corporelle, des taux d'insuline et d'IGF-1 et une augmentation de l'espérance de vie ont été observés.

La GH régule également l'expression d'autres facteurs mitogéniques, certains étant essentiels pour une croissance normale. Des individus présentant des mutations des

récepteurs du facteur de croissance du fibroblaste (FGF) conduisant à la forme la plus commune de nanisme (achondroplasie) présentent une croissance retardée malgré des taux normaux de GH. L'activité des axes somatotrope et thyréotrope est étroitement liée chez les mammifères. La GH ne contrôle pas toujours le taux de croissance et ne stimule pas toujours la production d'IGF, notamment lors d'une restriction alimentaire, durant la vie fœtale ou dans le cas d'hypothyroïdisme. Dans toutes ces situations, ce phénomène est associé à des taux réduits de l'hormone thyroïdienne T3 (tri-iodothyronine) suggérant une influence significative de la fonction thyroïdienne sur l'action de la GH lors de l'étape de croissance corporelle. Les hormones thyroïdiennes stimulent également la production d'IGF et, par conséquent, la croissance fœtale. Le taux de croissance chez les animaux nains est stimulé par la T3 (Cabello et Wrutniak, 1989). Ainsi, quelques uns des effets de la GH seraient indépendants de l'IGF-1 et impliqueraient également d'autres facteurs. Cependant, malgré l'augmentation sensible des taux de GH circulante lors d'une absence de rétrocontrôle négatif, les souris IGF-$1^{-/-}$ sont de petite taille, suggérant la dépendance des effets majeurs de la GH vis-à-vis de l'expression de l'IGF-1 (Le Roith *et al.,* 2001).

Des composants de l'axe GH-IGF-1 joueraient un rôle majeur dans le processus de multiplication cellulaire pathologique conduisant au développement tumoral. Des taux élevés d'IGF-1 circulant représentent un facteur de risque pour le cancer du sein chez les femmes pré-ménopausées (Bohlke *et al*., 1998). D'autres types de cancers impliquent également l'IGF-1 circulant, tels que le cancer de la prostate (Chan *et al*., 1998 ; Shaneyfelt, 2000). Des antagonistes de la GH pourraient être utilisés pour réduire le risque des cancers dépendants de la GH ou de l'IGF-1 (Okada et Kopchick, 2001).

V.2. Effets sur la vieillesse et la longévité

La GH fonctionne par liaison à son récepteur en stimulant sa dimérisation. Afin de comprendre cette interaction, un modèle pour le syndrome de Laron a été développé chez la souris. Ce syndrome se caractérise chez l'homme par un désordre et des mutations dans le gène codant pour la GHR (Zhou *et al*., 1997). La cause de ce nanisme est la résistance à l'action de la GH. En perturbant le gène du GHR chez la souris, il a été montré qu'elles présentaient une taille normale à la naissance mais présentaient un taux de croissance retardé après quelques jours (Zhou *et al*., 1997). En 3 mois, ces souris avaient atteint approximativement la moitié de la taille de leurs semblables. Ces souris naines ont une durée

de vie significativement plus longue que les souris contrôles (Coschigano *et al*., 2000), ce qui corrobore les résultats d'une étude montrant que de faibles taux de GH sont à l'origine de la longévité (Bartke, 2000).

V.3. Effets métaboliques

La plupart du potentiel de la GH permettant la croissance apparaît comme un effet consécutif de l'impact métabolique de l'hormone (pour revue, Moller *et al*., 2003). L'exposition à la GH conduit à une augmentation des taux circulants d'acides gras libres, de corps cétoniques, d'IGF-1, d'insuline et de glucose (Davidson, 1987 ; Press, 1988 ; Moller, 1993). Chacun de ces composants exerce des effets indépendants sur la rétention d'azote et serait considéré comme un acteur de la fonction anabolique de la GH. Le jeûne et le stress amplifient la sécrétion de GH, alors que les repas ont tendance à inhiber la libération de l'hormone (Johnston *et al*., 1985 ; Ho *et al*., 1988). Dans ces conditions, les taux d'insuline et d'IGF-1 sont bas et déclinent, alors que ceux des acides gras libres sont élevés. Ceci indiquerait la dépendance de la croissance à la rétention d'azote qui sont liées à la mobilisation des corps lipidiques par la GH. Pour les organismes homéothermes, ayant des stocks limités de carbohydrates et sans accès immédiat à la nourriture, l'oxydation lipidique constitue une véritable source énergétique pour l'anabolisme protéique.

V.3.1. Effets sur le métabolisme lipidique

Les effets de la GH sur la fonction pré-adipocytaire ou adipocytaire est induite par sa liaison au GHR. L'expression du GHR dans le tissu adipeux identifie ce tissu comme une des cibles de l'hormone (Fagin *et al*., 1980 ; Gavin *et al*., 1982 ; Gritching *et al*., 1983 ; Carter-Su *et al*., 1984 ; Frick *et al.,* 1990 ; Vikman *et al*., 1991 ; Mertani et Morel, 1995). Green *et al*. (1985) ont émis l'hypothèse selon laquelle la GH est nécessaire aux cellules mésenchymateuses de telle sorte que l'IGF-1 permette sélectivement la multiplication cellulaire débouchant sur l'expansion clonale et la néo-différenciation de cellules vers des adipocytes matures.

L'hypophysectomie diminue l'expression du gène codant pour le GHR chez le rat et l'hormonothérapie de substitution par la GH restaure cette expression (Frick *et al*., 1990 ; Vikman *et al*., 1991). L'administration de GH à des rats hypophysectomisés augmente également le nombre de GHR dans les adipocytes (Gritching *et al*., 1983). Chez des patients

atteints du syndrome de Prader-Willi (ou déficients en GH), un traitement par la GH régule positivement l'expression du gène du GHR dans le tissu adipeux (Kamel *et al*., 1995). Cependant, un traitement par la GH chez le cochon mâle intact n'induit pas une régulation positive du gène du GHR dans le tissu adipeux, même si cette même régulation est observée dans les tissus hépatique et squelettique des mêmes animaux (Brameld *et al*., 1996). Cette régulation différentielle observée dans différentes espèces doit correspondre à une régulation spécifique au niveau des espèces pour l'expression du gène du GHR.

La GH exerce des effets complexes sur la formation et le métabolisme des adipocytes (Casanueva, 1992 ; Scacchi *et al.*, 1999 ; Nam et Marcus, 2000). Dans les adipocytes matures, son effet physiologique est lipolytique : elle induit la diminution de masse graisseuse par l'hydrolyse des triglycérides en activant une lipoprotéine lipase, libérant les acides gras et le glycérol pendant la diminution de la ré-estérification des acides gras libres. La signification de ces effets est donnée par l'augmentation de l'adiposité dans le cas d'une déficience en GH chez l'homme et par la diminution de la masse graisseuse chez les sujets atteints d'acromégalie, maladie se traduisant par une sécrétion exagérée de GH à l'âge adulte. Inversement, la masse maigre est diminuée lors d'une déficience en GH chez l'homme. Elle peut être restaurée par une hormonothérapie de substitution par la GH (pour revue, Moller *et al*., 2003).

La sensibilité lipolytique à une stimulation par la GH augmente durant le jeûne (Moller *et al*., 1993). Un pic nocturne de GH précède de deux heures celui d'acides gras libres (Rosenthal et Woodside, 1988), suggérant un rôle de régulateur central des oscillations circadiennes dans la libération et l'oxydation des lipides pour la GH. Cette hypothèse a été corroborée par des études montrant que le manque de libération nocturne de GH compromet la mise en place de la libération physiologique des corps lipidiques (Boyle *et al*., 1992).

La cascade entière des interactions responsables de la signalisation intracellulaire apparaît inclure l'activation de l'adénylyl cyclase et la stimulation de la production d'AMPc déclenchant l'activation de la lipase hormonosensible responsable de la lipolyse (Yip et Goodman, 1999).

V.3.2. Effets sur le métabolisme glucidique

Une administration de GH conduit à une hyperinsulinémie, favorise l'effet inhibiteur de l'insuline vis-à-vis de la synthèse de glycogène hépatique en réprimant la stimulation de

sa capture, principalement par inhibition du transporteur membranaire GLUT4, et l'oxydation du glucose. Les effets de la GH sur la sensibilité à l'insuline montrent qu'une administration continue de grandes quantités de GH (1,5 mg au lieu des 0,5 mg sécrétés normalement par jour) conduit à un ralentissement substantiel de la sensibilité à l'insuline périphérique et hépatique après 12 heures (Bratusch-Marrain *et al*., 1982 ; Rizza *et al*., 1982). Suite à une administration plus modérée de GH et d'insuline, un ralentissement de la sensibilité à l'insuline périphérique et hépatique a été observé après environ 2 heures, alors qu'elle est maintenue au niveau musculaire. La GH était également capable de compenser les actions antilipolytiques dues à l'hyperinsulinémie (Moller *et al*., 1989). La GH freine l'augmentation de l'instabilité du glucose observée durant l'hyperglycémie causée par « l'action de masse » du glucose (Orskov *et al*., 1989). L'exposition à la GH amoindrit court terme l'activité de la glycogène synthétase dans le muscle squelettique, mais cet effet pourrait être une conséquence de l'augmentation de circulation des lipides (Bak *et al*., 1991). Les résultats précités pourraient être causés par l'augmentation de la disponibilité en lipides et la compétition des substrats qui s'ensuit (Randle *et al*., 1963). La co-infusion de GH et d'acide nicotinique (agent lipolytique) abolit les effets de la GH sur la tolérance au glucose (Davidson et Bernstein, 1973). Dans une étude plus récente, l'administration d'un dérivé de cet agent antilipolytique réduisait la capacité de la GH à diminuer la sensibilité à l'insuline (Nielsen *et al*., 2001).

V.3.3. Implication de la signalisation de la GH sur les métabolismes lipidique et glucidique

Chez des rats hypophysectomisés, la GH stimule de façon aigue la lipogenèse et inhibe la lipolyse dans le tissu adipeux, les adipocytes de rat isolés et dans les adipocytes différenciés 3T3-F442A (Birnbaum et Goodman, 1979 ; Goodman et Frick, 1981 ; Smal *et al*., 1987 ; Schwartz et Carter-Su, 1988). Stimulées par la GH, des cellules CHO transfectées avec l'ADNc codant pour le GHR augmentent leur capture de glucose et leur lipogenèse (Moller *et al*., 1994). L'effet aigu de le GH sur la lipogenèse nécessite les résidus Tyr333 et 338 du domaine intracellulaire du GHR (Lobie *et al*., 1995) (*cf.* §II.2.2). Ces deux résidus ne sont pas nécessaires à la phosphorylation de l'IRS-1 ou IRS-2 dépendante de la GH (Vanderkuur *et al*., 1995). Ainsi, l'effet aigu lipogénique de la GH est induit par un mécanisme distinct de celui de la phosphorylation simple de l'IRS-1 ou -2. Les effets aigus de GH sur les adipocytes ne sont donc pas induits comme une conséquence de l'activation

commune de molécules impliquées dans la transduction du signal de l'insuline comme cela avait été postulé (Richelsen, 1997). L'inhibition de la PKC empêche non seulement la stimulation par la GH de la capture du glucose, mais aussi de la lipogenèse dans les adipocytes isolés de rats (Ridderstrale et Tornqvist, 1994). La GH doit utiliser des molécules autres que IRS-1 ou -2 pour la stimulation de la PI-3 kinase dépendante de la lipogenèse. Cette activation est lourdement dépendante de la protéine adaptatrice CrkII (Goh *et al*., 2000) (*cf.* §III.3.1), et la GH doit utiliser d'autres voies son activation telle que le complexe FAK-tensine (Zhu *et al*., 1998a) ou c-Cbl (Zhu *et al*., 1998b). IRS-1 n'est apparemment pas indispensable à la stimulation par la GH de l'activité PI-3 kinase (Lobie *et al*., 2000). L'effet antilipolytique de la GH a été démontré comme étant induit par le GMPc inhibé par l'AMPc phosphodiestérase (Eriksson et Tornqvist, 1997) de la même façon que pour l'insuline. L'activation de la dégradation de l'AMPc qui en résulte et la diminution de l'activité de la PKA (protéine kinase dépendante de l'AMPc) conduisent à une diminution de la phosphorylation de la lipase hormonosensible (Bjorgell *et al*., 1984). Comme les effets antilipolytiques de la GH sont également dépendants de la PI-3 kinase, le GMPc inhibé par l'AMPc phosphodiestérase doit agir en aval de l'activation par la GH de la PI-3 kinase comme cela a été observé pour l'insuline (Tanner *et al*., 1992). L'insuline nécessite l'activité PI-3 kinase pour stimuler la translocation du transporteur de glucose à la membrane plasmique et de la p38 MAPK pour l'activer (Sweeney *et al*., 1999). L'activation par la GH de la p38 MAPK est minimale dans les adipocytes 3T3-F442A (Hodge *et al*., 1998) et ainsi, doit nécessiter l'utilisation d'une autre voie comme pour le récepteur de la leptine qui utilise la p42/44 MAPK pour l'activation du transporteur de glucose (Berti et Gammeltoft, 1999).

La GH affecte plus subtilement le métabolisme du glucose. Bien que l'utilisation musculaire du glucose soit intrinsèquement basse (Andres *et al*., 1956), une suppression de capture du glucose est typiquement observée suite à une exposition aigue de GH (Zierler et Rabinowitz, 1963 ; Moller *et al*., 1990a,b). L'augmentation de l'oxydation lipidique est suivie par une diminution proportionnelle de l'oxydation du glucose. Le « turnover » total du glucose n'est pas affecté et, comme une conséquence, celui du glucose non oxydé augmente (Moller *et al*., 1990a).

Dans l'ensemble, l'effet principal de la GH est la stimulation de la lipolyse et de l'oxydation des lipides. Les effets de l'IGF-1 sur le métabolisme sont souvent opposés à ceux de la GH. L'administration aigue de GH, mais non d'IGF-1, est lipolytique, et son administration chronique est diabétogène, alors que l'IGF-1 stimule l'action de l'insuline

(Hussain *et al*., 1993). Bien que quelques effets d'IGF-1 humain recombinant soient directs, il semble que son administration inhibe la sécrétion de GH et régule indirectement les effets de l'IGF-1 sur le métabolisme (Le Roith *et al.,* 2001).

V.3.4. Effets sur le métabolisme protéique

Les actions anaboliques de la GH sont induites par l'IGF-1. Des études sur le métabolisme protéique montrent que l'effet de la GH est réalisé par une stimulation de la synthèse protéique, une diminution de l'oxydation protéique sans atteinte du processus de traduction. Il est bien établi que la GH exerce des effets de rétention protéique chez l'homme. L'administration de GH conduit à une rétention de l'urée par une diminution de l'excrétion urinaire, des taux de production et, à une augmentation de la synthèse protéique (Manson et Wilmore, 1986 ; Welbourne *et al*., 1989 ; Horber et Haymond, 1990 ; Lundeberg *et al*., 1991 ; Fryburg *et al*., 1991, 1992 ; Wolthers *et al*., 1997). Lorsque l'action endogène de la GH est partiellement bloquée par le jeûne, le taux de production d'urée s'élèvent augmente de 50%, affirmant l'importance de la GH en tant qu'agent conservateur protéique durant le jeûne (Norrelund *et al*., 2001).

Puisqu'une exposition à la GH augmente invariablement la lipolyse et puisque les intermédiaires lipidiques ont des propriétés de conservation des protéiques, il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle la GH augmente la rétention d'azote en réponse à la stimulation de la lipolyse. Le blocage de la lipolyse par un dérivé de l'acide nicotinique entraîne une très forte augmentation des pertes d'urée et de protéines en annulant la capacité de la GH à induire la rétention d'urée et de protéines (Norrelund *et al*., 2003). Il apparaît alors concevable que la stimulation de la lipolyse constitue le plus important mécanisme de conservation protéique induit par la GH.

V.3.5. Effets sur la composition corporelle

La GH n'est pas seulement le régulateur principal de la croissance postnatale somatique, mais exerce de profonds effets sur la composition corporelle par l'intermédiaire d'une combinaison d'actions anaboliques et lipolytiques chez l'homme (Johannsson *et al*., 1994). Diverses observations cliniques et expérimentales ont indiqué l'importance de la GH dans la régulation du tissu adipeux. Une déficience en GH chez l'adulte est associée à une augmentation de la masse graisseuse, plus particulièrement au niveau des dépôts de graisse

viscérale, connue pour être un facteur à risque important dans le développement de la morbidité cardiovasculaire et de la mortalité qui en découle (Brummer, 1998 ; Nam et Marcus, 2000). Cette déficience en GH provoque également une augmentation de la concentration sérique de leptine, hormone sécrétée par les adipocytes, produit du gène *ob* (Kishi *et al*., 1993 ; Zhang *et al*., 1997). La taille moyenne et le contenu lipidique des adipocytes sous-cutanés chez ces patients sont plus importants que chez les sujets normaux et un traitement par la GH diminue ces deux composantes **(**Brook, 1973). Un certain nombre d'études ont montré une réduction de la masse graisseuse consécutive à un traitement par la GH (Brummer, 1998 ; Nam et Marcus, 2000). L'hypophysectomie chez les rats se traduit par une augmentation de leur masse graisseuse et une diminution de celle des masses non lipidiques. Ces masses sont normalisées lors d'un traitement par la GH (Li *et al*., 1949 ; Scow, 1959). Une partie de cet effet doit certainement être secondaire aux actions lipolytiques de la GH où l'hormone stimulerait préférentiellement la lipolyse dans la partie haute du corps (Gravholt *et al*., 1999).

L'inactivation de l'expression du transgène de la GH dans des souris transgéniques provoque l'apparition du phénotype d'obésité (Oberbauer *et al.*, 1997). Des enfants déficients en GH sont habituellement moyennement obèses et l'hormonothérapie de substitution par la GH réduit la présence des corps gras (Wabitsch *et al.*, 1995). Les adipocytes de ces enfants exhibent une augmentation moyenne du volume des adipocytes, mais sont moins nombreux comparé à des enfants sains. Une thérapie de remplacement par la GH normalise le volume et le nombre des cellules graisseuses chez ces enfants (Bonnet *et al*., 1974). L'obésité est associée à une réduction spontanée de sécrétion de GH chez l'homme adulte (Rasmussen *et al*., 1995). Des études récentes ont également montré que le traitement par la GH d'individus obèses réduits la masse graisseuse (Snyder *et al*., 1990 ; Skaggs et Crist, 1991 ; Nam et Marcus, 2000). Le mécanisme de ces effets a fait l'objet de nombreuses études (Johannsson *et al*., 1994 ; Jorgensen *et al*., 1997 ; Richelsen, 1997 ; Nam et Marcus, 2000). L'activation de l'action lipolytique du tissu adipeux par la GH en combinaison avec une diminution de l'accumulation en triglycérides *via* l'inhibition de l'activité de la lipoprotéine lipase apparaît être le mécanisme majeur par lequel la GH induit une diminution de la masse grasse totale (Richelsen, 1997, 1999 ; Richelsen *et al*., 2000). Les effets de la GH sur la fonction des adipocytes sont sans doute encore plus complexes. Cependant, un rapport récent regroupant de nombreuses études qui examinaient les effets d'un traitement de l'obésité par la GH chez des adultes a montré que ce type de thérapie utilisée simultanément avec un régime hypocalorique n'avait que peu, voire aucun effet sur la maladie (Shadid et Jeunsen, 2003).

Les signaux périphériques qui induisent la diminution de sécrétion de GH chez les individus souffrant d'obésité semblent être la leptine et les acides gras libres. Ces derniers et la GH maintiennent une boucle de rétrocontrôle négatif classique de régulation. La GH provoque une élévation de la concentration en acides gras libres par son action lipolytique inhibant en retour la sécrétion spontanée ou stimulée de GH (Casanueva et Dieguez, 1998). Mais les effets sont différents entre les modèles animaux et l'homme. En supposant que la leptine régule la sécrétion de GH, afin d'établir une boucle de rétrocontrôle classique (*cf.* §I.4.2), il est nécessaire d'aborder la participation de la GH à la régulation de la sécrétion de leptine. Un certain nombre d'études chez des humains déficients en GH ont examiné l'effet de remplacement chronique de GH et ont démontré une diminution du taux circulant de leptine (Florkowski *et al.*, 1996 ; Gill *et al.*, 1999). Ceci reflète probablement les changements de composition corporelle qui accompagnent la thérapie par la GH plutôt qu'un effet direct sur la leptine *per se* (Gill *et al.*, 1999). Le rôle potentiel de la leptine sur la prolifération cellulaire et l'angiogenèse a été suggéré (Park *et al.*, 2001). La découverte de l'action « anti-obésité » de la leptine a contribué à la compréhension de pathologie clinique apparentée au changement de masse et de composition corporelles. L'obésité est associée à la résistance à l'insuline et au diabète non insulino-dépendant (Saladin *et al*., 1995), mais le rôle précis joué par la leptine dans ces deux phénomènes n'est pas encore pleinement clarifié.

V.3.6. Effets sur le métabolisme énergétique

Comme cela vient d'être abordé, les effets directs de la GH sont pléïotropes et se manifestent à la fois sur la multiplication, la différenciation et le métabolisme cellulaires (Isaksson *et al*. 1985). Dans tous ces effets, les modifications du métabolisme énergétique réalisées par l'intermédiaire du fonctionnement mitochondrial (rôle énergétique et action anti-apoptotique) apparaissent fondamentaux même si les mécanismes d'action de la GH restent encore imprécis.

V.3.6.1. Effets sur le métabolisme et la fonction mitochondriale

Classiquement, l'hypophysectomie est associée à des changements morphologiques du foie, avec une réduction de la masse hépatique et de la taille des hépatocytes (Hurxthal et Musulin, 1953 ; Liberti *et al*., 1970), et une augmentation du nombre et du volume des mitochondries (Cardell, 1967 ; Maddaiah *et al*., 1973). Toutes ces modifications sont

corrigées après traitement par la GH, soulignant le rôle important de cette hormone dans le contrôle de l'intégrité hépatique (Maddaiah *et al*., 1970, 1976a).

L'hypophysectomie entraîne également des modifications de la composition phospholipidique des membranes mitochondriales avec une augmentation de la proportion des acides gras saturés et des perturbations fonctionnelles des mitochondries avec une importante réduction des concentrations des cytochromes (a, a_3, b, c et c_1) de la chaîne respiratoire (Matsubara *et al*., 1972 ; Maddaiah *et al*., 1976b ; Cléjan *et al*., 1980 ; Maddaiah et Cléjan, 1986). Un traitement par la GH restaure efficacement les concentrations en cytochromes et la composition phospholipidique des membranes chez le rat hypophysectomisé (Cléjan *et al*., 1980). Les effets de la GH, notamment sur la composition phospholipidique des membranes mitochondriales sont rapides (4 heures) et peuvent représenter un des mécanismes d'action possibles de l'hormone dans la régulation du métabolisme cellulaire. Un traitement chronique par la GH chez des rats hypophysectomisés augmente également l'état 3 (non limité par la disponibilité en ADP) de la respiration mitochondriale (Maddaiah et Cléjan, 1986 ; Cléjan *et al*., 1980). En plus d'effets liés à la composition phospholipidique des membranes, la GH pourrait affecter plus spécifiquement certains complexes de la chaîne respiratoire et en particulier le complexe I NADH déshydrogènase et le complexe IV mais les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont pas clarifiés.

Les effets de la GH peuvent passer en partie par une activation de l'expression des enzymes mitochondriales. Ainsi, la synthèse des protéines mitochondriales hépatiques, estimée par incorporation de leucine radioactive *in vivo* et *in vitro,* est réduite chez le rat hypophysectomisé et corrigée après traitement par la GH (De Favelukes *et al*., 1975). La GH pourrait donc réguler les concentrations des cytochromes de la chaîne respiratoire *via* son effet sur l'anabolisme protéique mitochondrial et cytosolique (Matsubara *et al*., 1972 ; Maddaiah *et al*., 1976b). Il faut cependant observer que l'activité de la cytochrome *c* oxydase (Cox), qui est dramatiquement effondrée après hypophysectomie, est seulement partiellement restaurée par un traitement par la GH alors que les concentrations en cytochromes sont elles complètement restaurées. La réduction de l'activité Cox après hypophysectomie ne découle donc pas uniquement de la diminution des concentrations en cytochromes a et a3 mais pourrait impliquer d'autres effets activateurs de l'hormone sur l'activité même de l'enzyme.

Cependant, l'effet de la GH a été récemment abordé sur la respiration de mitochondries issues de muscle squelettique de rat (Peyreigne *et al*., 2002). L'expérience consistait à injecter de la GH recombinante à des rats pendants 15 jours, puis à extraire les

mitochondries des tissus musculaires squelettique afin d'étudier leur consommation d'oxygène par oxygraphie. Les auteurs n'ont mis en évidence aucun effet significatif de la GH sur le métabolisme oxydatif de ces mitochondries isolées.

V.3.6.2. Effets anti-apoptotiques de la GH

Récemment, un nouveau rôle biologique important de la GH a été proposé. Il apparaît maintenant évident que cette hormone exerce des effets anti-apoptotiques sur différents types cellulaires qui expriment son récepteur. Le rôle anti-apoptotique de la GH est, par exemple, primordial dans la fonction de reproduction où elle favorise la folliculogenèse chez la rate par réduction du nombre d'atrésies folliculaires *in vitro* (Eisenhauer *et al.*, 1999) et *in vivo* chez les souris transgéniques surexprimant la GH humaine (Danilovich *et al.*, 2000). D'autres travaux montrent que la GH favorise la survie cellulaire, notamment chez la rate, où l'involution de la glande mammaire induite par le sevrage peut être prévenue par un traitement concomitant par la GH (Travers *et al.,* 1996). Il est intéressant de noter que dans ce cas, le rôle anti-apoptotique de la GH s'exercerait de façon autocrine/paracrine comme le démontrent des travaux menés sur des cellules MCF-7 transfectées avec le gène de la hGH (Kaulsay *et al.,* 2001) ou sur des cellules C2C12 exprimant l'ADNc codant pour le GHR (Segard *et al*., 2003). Récemment, l'effet anti-apoptotique de la GH a été indiqué dans des lignées cellulaires d'ostéoblastes, les cellules UMR 106 (Morales *et al*., 2003). Des études *in vivo* montrent également qu'un traitement par la GH exerce un effet cyto-protecteur important sur les cellules intestinales de rat soumis à des radiations ionisantes (Mylonas *et al*., 2000). Les effets cytoprotecteurs de la GH ont été montrés également *in vitro*, puisque l'hormone empêche l'apoptose de cellules CHO provoquée par un traitement à la colchicine (Goh *et al.*, 1998).

Au niveau moléculaire les effets anti-apoptotiques de la GH ont principalement été étudiés dans des lignées immortalisées. Ainsi les effets anti-apoptotiques de l'hormone sont induits par l'activation de protéines cytoplasmiques comme la protéine kinase Akt dans les cellules CHO (Costoya *et al.*, 1999), et la protéine kinase A dans des cellules folliculaires ovariennes de bœuf (Sirotkin et Makarevich, 1999). Le mécanisme d'inhibition de l'apoptose par la GH a également été caractérisé par l'activation au niveau nucléaire de facteurs transcriptionnels, tels que NF-kappaB, Bcl-2 et Bag-1 (Haeffner *et al.,* 1999 ; Jeay *et al.,* 2000, 2001) dans les lignées U937 et Ba/F3, ou encore le facteur de réparation de l'ADN, CHOP/GADD153 dans la lignée MCF7 (Mertani *et al*., 2001). La GH pourrait également

influer sur l'apoptose par l'intermédiaire des molécules de signalisation, notamment STAT-5. Les protéines STAT jouent en effet un rôle important, de part leur position centrale dans la signalisation des tyrosines kinases, dans l'activation du cycle cellulaire et dans l'inhibition de l'apoptose, contribuant à la progression oncogénique. Lorsque les thérapies moléculaires de tumeurs conduisent à l'inhibition de la signalisation au niveau des protéines STAT, la réponse tumorale à la chimiothérapie et à la radiothérapie conventionnelle est augmentée. Il a également été observé que plusieurs types de traitements échouent à cause de la présence de protéines STAT constamment activées qui stimulent la prolifération cellulaire et inhibent l'apoptose (Calo *et al*., 2003). La mitochondrie étant l'un des premiers organites modulateurs de la mort cellulaire (Wallace, 1992 ; Zamzami *et al.,* 1996), se situant au carrefour entre nécrose et apoptose (pour revue, Nieminen, 2003), il devient essentiel de clarifier les effets potentiels directs de la GH sur ces organites.

Dans la conception classique, les effets de la GH ont été interprétés par une action sur des récepteurs membranaires et des voies de signalisation intracellulaire. Pourtant, la GH et son récepteur peuvent être internalisés pour se retrouver dans différents compartiments intracellulaires. Ainsi, une accumulation de GH tritiée a été observée dans la fraction mitochondriale, 2 min après injection de l'hormone à des rat hypophysectomisés (Maddaiah *et al*., 1970). Par autoradiographie, Groves *et al.* (1972) ont détecté la présence de [^{125}I]-GH dans la mitochondrie, 5 min après l'injection. Une étude d'internalisation de la GH *in vivo* (Lobie *et al.*, 1994) menée sur des rats Lewis-dwarf, déficients en GH, confirme la capture très rapide de [^{125}I]-GH dans la fraction mitochondriale 2 min après l'administration ainsi que son accumulation durant 60 minutes. La GH, internalisée *in vivo*, n'est pas une forme dégradée de l'hormone mais correspond à la protéine de 22 kDa.

V.3.6.3. Organisation structurale de la mitochondrie

Les mitochondries sont connues pour constituer « l'usine énergétique » des cellules eucaryotes. Les processus métaboliques fondamentaux tels que le transport d'électrons, la phosphorylation oxydative, l'oxydation des acides gras, le cycle de l'acide citrique, une partie du cycle de l'urée prennent place au sein de cet organite.

Les mitochondries adoptent une grande variété de formes allant de la forme sphérique jusqu'au réseau tubulaire. L'apparence complexe des mitochondries dépend de l'organisme ainsi que de l'état métabolique du type cellulaire qui les renferme. Ces organites particuliers

sont faits de deux membranes : la membrane externe et la membrane interne qui peut s'invaginer en crêtes. Cette dernière peut être partagée en deux entités : la membrane interne jouant le rôle de barrière et la membrane des crêtes mitochondriales. La première, limitant la matrice, est continue et étroitement apposée à la membrane externe de façon à former une sorte d'enveloppe physiologique de la mitochondrie. Les membranes des crêtes sont des invaginations de la membrane interne faisant saillie dans l'espace matriciel. Les crêtes sont connectées à la membrane interne par des structures tubulaires étroites de longueurs variées, appelées jonctions des crêtes, plutôt que par de larges ouvertures comme cela est généralement montré (Daems et Wisse, 1966 ; Mannella *et al*., 1994 ; Perkins *et al*., 1997 ; Perkins et Frey, 2000) (Figure 31). De plus, il existe de nombreuses variations morphologiques des membranes formant les crêtes : elles peuvent être tubulaires, lamellaires ou triangulaires (pour revue, Scheffler, 2001).

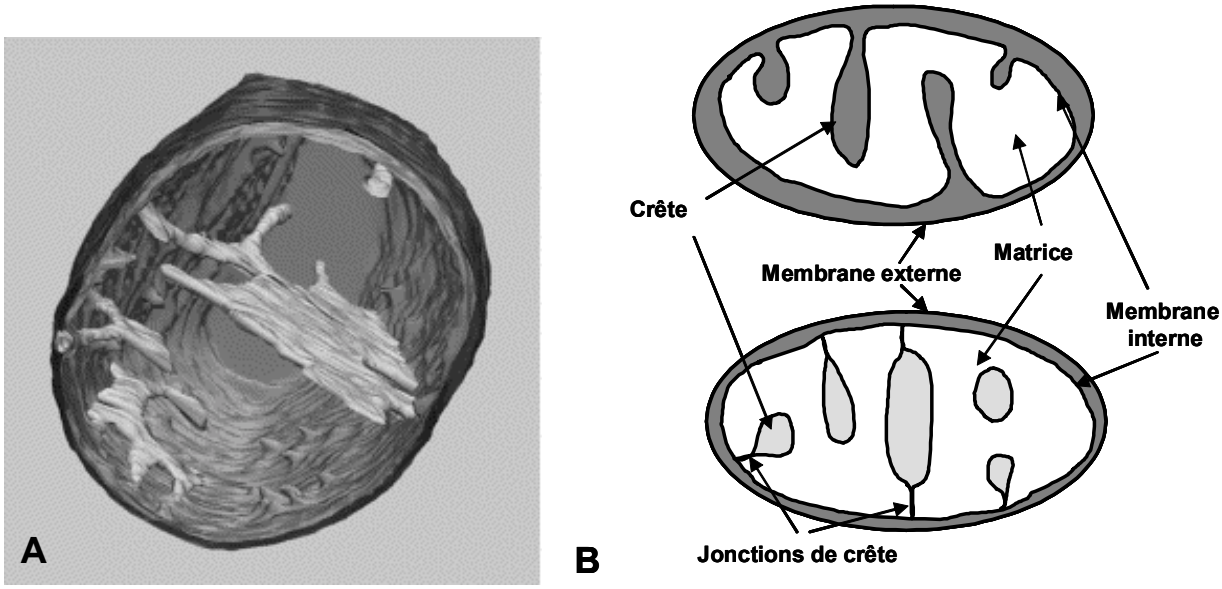


Figure 31 : Organisation structurale de la mitochondrie

Une reconstitution partielle d'une mitochondrie par tomographie en microscopie électronique est présentée en A. la membrane externe est très sombre et la membrane interne apparaît en gris plus clair. Seulement quelques crêtes sont visibles. Elles sont connectées à la membrane interne par des structures tubulaires, les jonctions de crêtes. Le schéma B montre l'interprétation des images obtenues par tomographie en microscopie électronique. Le modèle du haut représente l'interprétation conventionnellement admise, celle du bas l'intégration des jonctions de crêtes dans le nouveau modèle (d'après Scheffler, 2001).

V.3.6.4. Les voies d'entrées dans la mitochondrie

Chaque mitochondrie est constituée de plus de 1000 protéines différentes dont seulement 8 sont actuellement connues pour être codées et synthétisées par le génome mitochondrial de levure (13 chez l'homme). Le reste est codé et synthétisé au niveau des ribosomes cytosoliques. Chacune de ces protéines présente une identité biochimique propre et nécessite différents degrés d'assistance de la part des composants cellulaires permettant leur adressage à la mitochondrie. La mission de ce système cellulaire est de sélectionner les protéines cellulaires destinées à la mitochondrie et de faciliter le flux efficace de ces protéines depuis le cytosol vers cet organite.

Dans la plupart des cas, ce trafic est conduit par différents transporteurs selon deux étapes distinctes nécessitant la présence de protéines particulières au niveau de la membrane externe (TOM, « Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane ») et interne (TIM, « Translocase of the Inner Mitochondrial membrane »). Cependant, dans quelques cas, la translocation au niveau des deux membranes peut être couplée, nécessitant leur contact. Ces sites sont appelés points de contact. Aussi, une ferme association à certains points est indispensable à l'organisation structurale des membranes mitochondriales.

V.3.6.4.1. Import classique de protéines cytosoliques

La plupart des protéines matricielles et quelques protéines de la membrane interne et de l'espace inter-membranaire possèdent une préséquence N-terminale clivable qui fonctionne en tant que signal de ciblage. Cette séquence est clivée par une peptidase localisée dans la matrice (pour revue, Roise et Schatz, 1988 ; Endo et Kohda, 2002). Ces séquences nécessitent seulement une longueur minimale de 20 acides aminés et la capacité de former une hélice basique amphiphile afin de remplir leur fonction (Hurt *et al*., 1985 ; von Heijne, 1986 ; Hartl *et al*., 1989). Lors de la synthèse protéique ou juste après, les préprotéines mitochondriales sont liées à des protéines chaperonnes les maintenant dans une conformation relâchée compétente pour la translocation. Ces molécules chaperonnes incluent les membres de la famille hsp70 aussi bien que des facteurs spécifiques tel que le MSF (« Mitochondrial import Stimulating Factor ») qui reconnaît les préséquences mitochondriales (Deshaies *et al*., 1988 ; Murakami *et al*., 1988 ; Hachiya *et al*., 1995). Les précurseurs protéiques peuvent ensuite se lier aux sous unités réceptrices d'une translocase, le complexe TOM présent au

niveau de la surface mitochondriale. Ces précurseurs peuvent alors être transloqués à travers la membrane externe, triés, repliés, traités et assemblés dans le compartiment mitochondrial adéquat (Neupert, 1997 ; Voos *et al*., 1999 ; Koehler, 2000). D'autres protéines mitochondriales sont synthétisées sans préséquence signal. Quelques protéines de la membrane externe possèdent des signaux de ciblage mitochondrial dans le domaine N-terminal ressemblant aux préséquences clivables (Nakai *et al*., 1989 ; MacBride *et al*., 1992). Cependant, d'autres protéines possèdent de multiples signaux internes de ciblage mitochondrial (Folsch *et al*., 1996 ; Davis *et al*., 1998 ; Kanaji *et al*., 2000 ; Dembowski *et al*., 2001 ; Rapaport *et al*., 2001 ; pour revue, Rapaport, 2003).

Le complexe TOM représente une véritable machinerie multi sous unités de translocation (pour revue, Rassow et Pfanner, 2000 ; Pfanner et Wiedemann, 2002) (Figure 32). Le complexe TOM comprend une collection de récepteurs reconnaissant les protéines mitochondriales et un canal, ou GIP (« General Import Pore »), dirigeant les protéines destinées à la translocation. Les récepteurs guident les préprotéines vers le canal par interactions séquentielles avec des sites de liaison chargés négativement d'affinité croissante (Mayer *et al*., 1995 ; Komiya *et al*., 1998). Il est constitué d'un cœur de 400 kDa environ chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* contenant Tom40, Tom22, Tom6, Tom5. Tom22 interagissant avec Tom20 et Tom70, assimilés à des récepteurs, par l'intermédiaire de leurs domaines cytosoliques joue le rôle d'organisateur central du complexe TOM et agit en tant que relais des préprotéines depuis les récepteurs vers le GIP (Kiebler *et al*., 1993 ; Dekker *et al*., 1998 ; van Wilpe *et al*., 1999 ; Model *et al*., 2001). Tom5 entre également en jeu pour aider Tom20/Tom22 à guider les protéines vers le GIP (Dietmeier *et al*., 1997).

Une fois transloquées dans l'espace intermembranaire, les préprotéines destinées à la matrice interagissent avec le complexe TIM23 (Figure 33). Cette translocase présente au niveau de la membrane interne est constituée de Tim17, Tim23, Tim44 et d'une autre sous unité encore non caractérisée de 14 kDa. Les protéines membranaires intégrales Tim23 et Tim17 sont apparentées dans leurs séquences et forment le canal de guidage des protéines de la membrane interne (Berthold *et al*., 1995 ; Ryan *et al*., 1998). La protéine matricielle hydrophile Tim44 est associée à Tim23, Tim17 (Maarse *et al*., 1992 ; Berthold *et al*., 1995) et les lipides de la membrane interne (Weiss *et al*., 1999). Chez la levure, Tim23 se présente sous la forme d'un dimère induit par des glissières à leucine du domaine N-terminal en présence d'un potentiel membranaire (Bauer *et al*., 1996). La liaison des préprotéines cause la dissociation du dimère Tim23 et initie la translocation de la préprotéine à travers la

membrane interne. En plus de la dimérisation du complexe Tim23, le potentiel de membrane doit générer une force motrice afin de transloquer dans la matrice les préséquences chargées positivement. Dans la matrice, la préprotéine entrante est liée par la protéine chaperonne mt-Hsp70 («mitochondrial-Heatshock protein of 70 kDa ») associée à Tim44 d'une manière dépendante de l'ATP (Bomer *et al*., 1998). Suite à cette liaison, l'ATP subit une hydrolyse conduisant au renforcement de l'association de la préprotéine à la protéine mt-Hsp70 (« matrix-Heatshock protein ») et à la dissociation de cette dernière de Tim44 (Schneider *et al*., 1996).

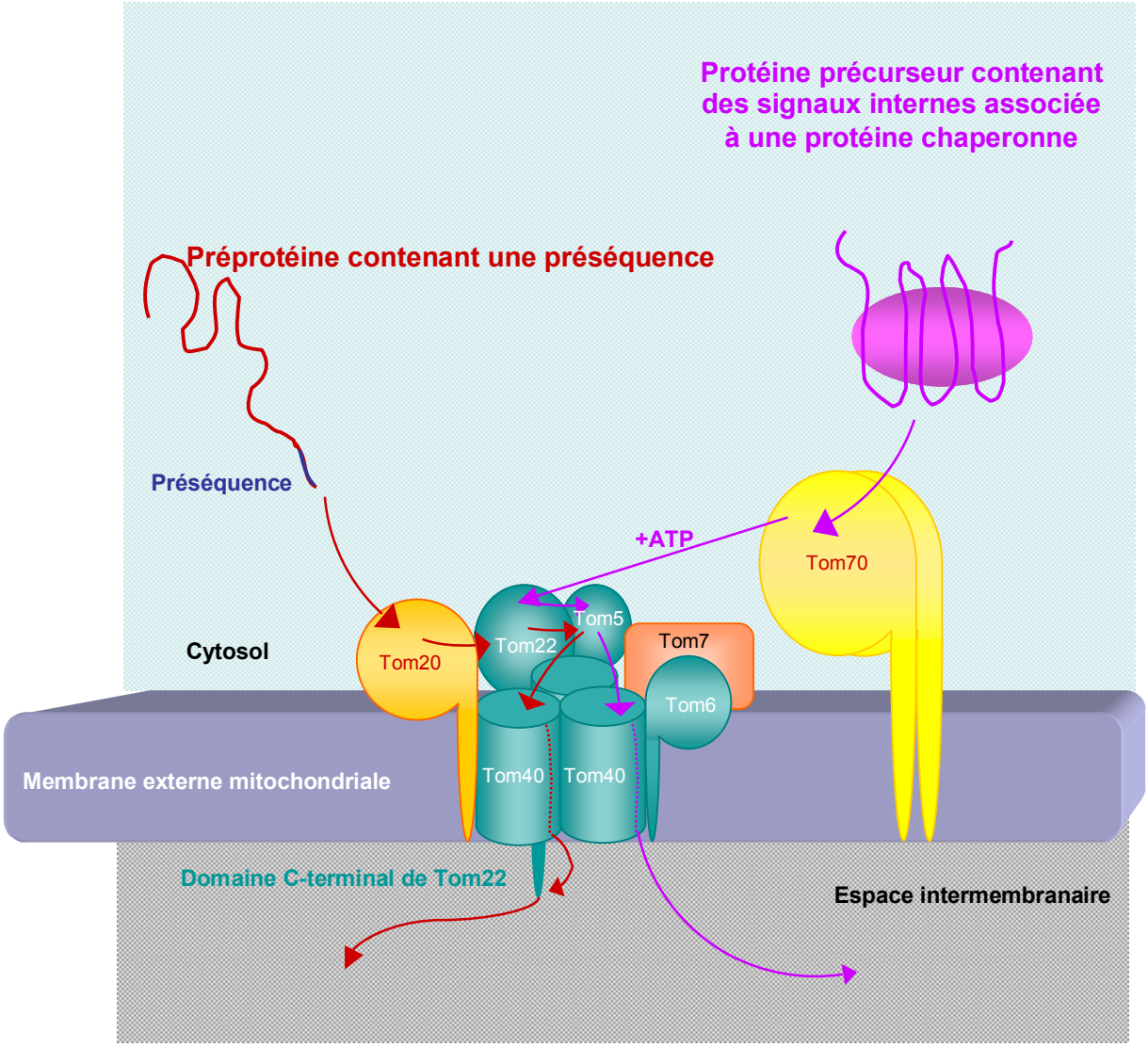


Figure 32 : Organisation du complexe TOM

Le complexe TOM comprend 3 récepteurs principaux : Tom20, Tom22 et Tom70. Les récepteurs initiaux (Tom70 et Tom20) sont associés de façon lâche au GIP formé par les protéines formant un pore, Tom40, et 3 petites protéines Tom, Tom7, Tom6 et Tom5. les préprotéines ayant une préséquence sont reconnues par Tom20, transférées à Tom22, Tom5 et Tom40 puis transloquées à travers la membrane externe. Lorsque la préséquence émerge dans l'espace intermembranaire, elle se lie au domaine C-terminal de Tom22 avant d'être transférée vers la membrane interne. Les protéines précurseurs ayant des signaux internes se lient aux multiples molécules réceptrices Tom70. Elles sont transférées lors d'une étape dépendante de l'ATP au complexe GIP par l'intermédiaire de Tom22 et Tom5 (d'après Pfanner et Wiedmann, 2002). TOM : « Transclocase of the Outer Mitochondrial membrane », GIP : « General Import Pore ».

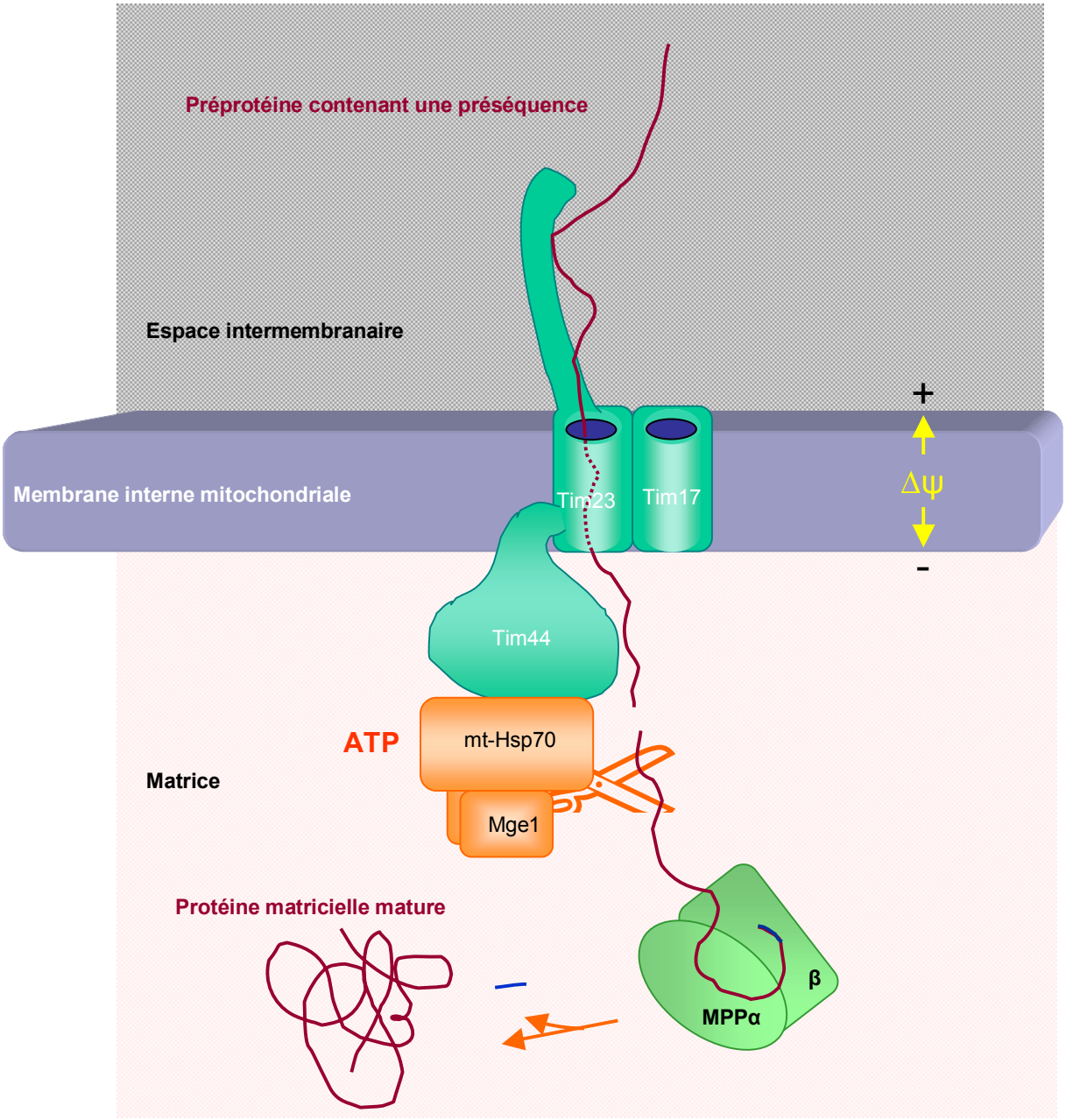


Figure 33 : Translocation des protéines matricielles par le complexe TOM23

Le complexe TIM23 est composé de Tim23, Tim17 formant un complexe stable, et de Tim44. le domaine N-terminal de Tim23 présent dans l'espace intermembranaire reconnaît les préséquences émergeant du complexe TOM. Le canal de Tim23 est activé par le potentiel de membrane (Δψ). Le moteur de l'import est constitué de mt-Hsp70, de Tim44 et d'une cochaperonne mitochondriale dimérique (Mge1). Le moteur est conduit par l'hydrolyse d'ATP, puis l'enzyme MPP clive la préséquence et libère la protéine matricielle sous une forme mature (d'après Pfanner et Wiedmann, 2001). mt : « matrix », Mge : « the mitochondrial homolog of procaryotic GrpE », MPP : « Mitochondrial Processing Peptidase ».

V.3.6.4.2. Transport des métabolites et des protéines au niveau des points de contact

Les préprotéines peuvent être insérées dans la membrane interne selon 3 voies distinctes. La translocation à travers la membrane interne peut être bloquée au niveau de Tim23 et la préprotéine est alors insérée dans la bicouche lipidique (Kaput *et al.*, 1982 ; van Loon et Schatz, 1987). Une autre alternative est la ré-insertion des préprotéines de la matrice dans la membrane interne par un complexe appelé TIM22 (Sirrenberg *et al.*, 1996) (Figure 34).

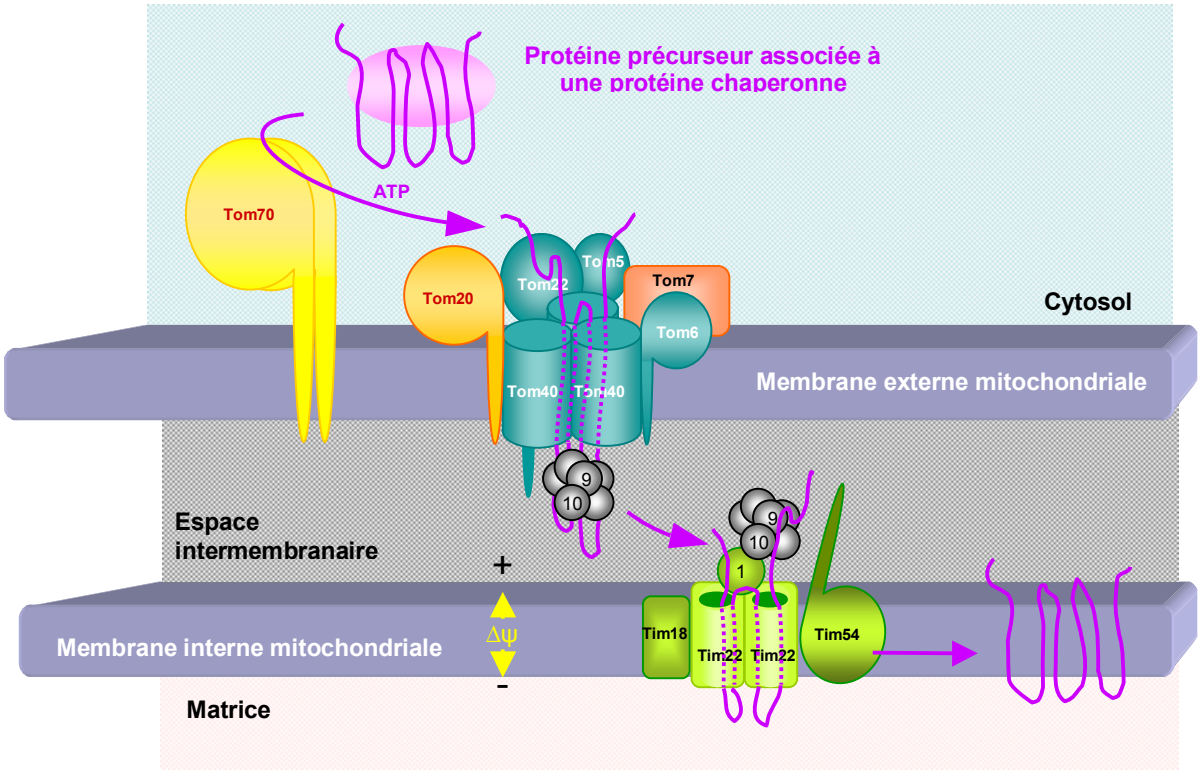


Figure 34 : Insertion de protéines hydrophobes dans la membrane interne mitochondriale par le complexe TIM22

La protéine chaperonne permet le maintien de la protéine précurseur sous une forme compétente qui va se lier à plusieurs molécule de Tom70, puis est transférée au niveau du GIP par un processus dépendant de l'ATP. Elle se lie au complexe Tim9/Tim10 par ses formations en boucle. L'intégration membranaire est réalisée par le complexe TIM22 sous la dépendance du potentiel de membrane (Δψ) (d'après Pfanner et Wiedmann, 2001). TOM : « Translocase of the Outer Membrane », TIM : « Translocase of the Inner Membrane », 9 et 10 : Tim9 et Tim10.

Après la translocation par le complexe TOM, un complexe soluble composé de Tim9 et Tim10 se lie aux préprotéines et les transfère au complexe TIM22, composé des sous unités Tim9, Tim10, Tim12, Tim18, Tim22 et Tim54, qui induit l'insertion des préprotéines dans la membrane interne (Sirrenberg *et al*., 1996, 1998 ; Koehler *et al*., 1998a,b ; Adam *et al*., 1999 ; van Wilpe *et al*., 1999) en présence d'un potentiel de membrane.

Les mitochondries peuvent subir des perturbations dans leur organisation structurale par choc osmotique ou sonication. Ce type de procédé conduit à la production de vésicules de membrane interne, de membrane externe et de vésicules particulières de membranes externe et interne assemblées par un point de contact (Ohlendieck *et al*., 1986 ; Adams *et al*., 1989 ; Kuyznierewicz et Thomson, 2002). Ces points de contact ont été observés en microscopie électronique (Thomson *et al*., 1995 ; Brdiczka *et al*., 1998) et ont été étudiés. Ils sont formés par l'interaction de protéines localisées dans la membrane interne telles que l'ANT pour « Adenine Nucleotide Translocase » et dans la membrane externe comme la porine ou VDAC pour « Voltage-Dependent Anion Channel » (Brdiczka *et al*., 1998, Thomson, 1998 ; pour revue, Dolder *et al*., 2001 ; Reichert et Neupert, 2002 ; Thomson, 2003). Ces formations membranaires existeraient sous différentes formes en fonction de leur rôle et des protéines qui les constituent : certaines seraient plus impliquées dans l'import de métabolites, de protéines et de corps lipidiques, alors que d'autres joueraient un rôle plus important dans l'export (Brdiczka *et al*., 1998). Un élément commun des modèles théoriques représentants les différents points de contact est l'interaction spatiale très proche entre les composants des membranes externe et interne qui facilite l'essentiel des fonctions mitochondriales. La fréquence des points de contact augmente en réponse à l'ATP (Bucheler *et al*., 1991), suggérant un transport actif par cette voie.

Un tel modèle décrit la conduite des métabolites et la perméabilité transitoire dans les mitochondries par l'intermédiaire de l'ANT/ mtCK (« mitochondrial Creatine Kinase ») et de la porine (ou VDAC) (pour revue, Dolder *et al*., 2001 ; Reichert et Neupert, 2002). L'étude de ce mode d'entrée a été entreprise *in vitro* et a montré la génération d'un complexe de 400 kDa (Brdiczka *et al*., 1994). Ce modèle montre « l'emprisonnement » de mtCK entre l'ANT de la membrane interne et la porine présente dans la membrane externe (Beutner *et al*., 1996 ; Dolder *et al*., 2001). Ce complexe induit un système de navette compétent de phosphocréatine et de créatine entre la mitochondrie et le cytosol. Le transport de précurseurs phospholipidiques et de phospholipides semble être facilité au niveau des points de contact (Ardail *et al*., 1990a,b, 1991 ; Simbeni *et al*., 1991) (Figure 35). En particulier, la phosphatidylsérine est transloquée au niveau de la membrane interne où elle subit une

conversion en phosphatidylethanolamine. De plus, l'acide phospholipidique cardiolipine est enrichi dans les fractions de densité intermédiaire entre la membrane interne et externe (Ardail *et al*., 1990b).

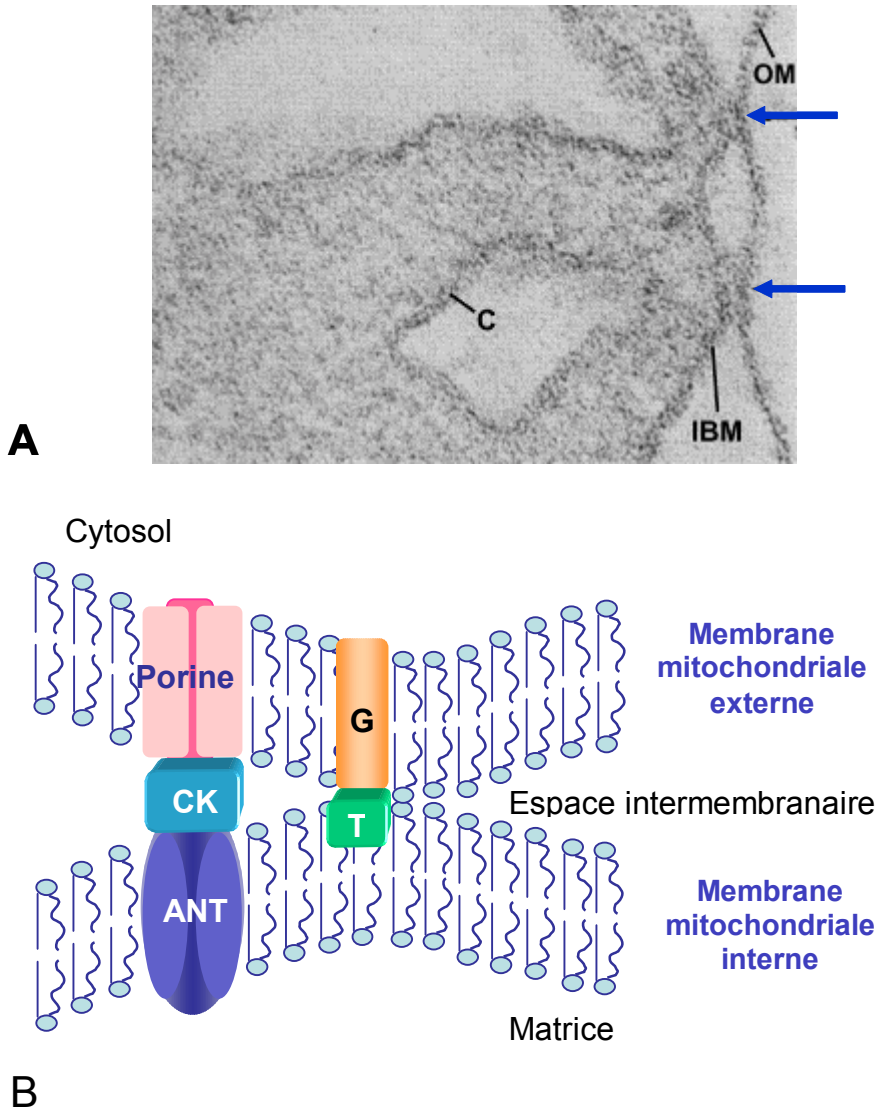


Figure 35 : Structure d'un point de contact mitochondrial

La figure A présente une photographie obtenue par microscopie électronique d'une mitochondrie isolée de foie de rat de forme condensée suite à une fixation chimique. Les flèches pointent les sites de contact entre la membrane interne et externe (Hackenbrock, 1968). La figure B représente un schéma de point de contact. La porine située dans la membrane externe interagit avec le translocateur adénylate (ANT) de la membrane interne soit directement, soit par l'intermédiaire d'un complexe intermédiaire formé par les unités de la crétine kinase (CK). Une protéine liée au GTP (G) se lie à sa protéine-cible (T) et induit une traction des membranes interne et externe conduisant à leur contact et fusion (d'après Thomson, 2003). IBM : « Inner Boundary Membrane », OM : Outer Membrane, C : « Cristae membrane ».

La première indication pour l'attribution d'une fonction biologique aux points de contact dans le phénomène de translocation protéique est venue d'études en microscopie électronique (Kellems *et al*., 1975). Des ribosomes cytoplasmiques ont été trouvés attachés à la membrane externe mitochondriale de levure. Cette association était particulièrement prononcée suite à l'inhibition de la synthèse protéique par addition de cycloheximide qui laissait les chaînes protéiques naissantes attachées aux ribosomes. Dans les mitochondries condensées, la liaison des ribosomes était limitée aux sites où les membranes externe et interne étaient étroitement apposées. Ceci indiquerait la possibilité d'une translocation mitochondriale co-traductionnelle. La présence d'enzymes responsables de la biosynthèse des glycosphingolipides a été mise en évidence dans un compartiment particulier, le MAM (« Mitochondrial-Associated Membrane »), fraction membranaire reliant le réticulum endoplasmique à la mitochondrie, suggérant le couplage entre la biosynthèse de ces métabolites et leur translocation dans la mitochondrie (Ardail *et al*., 2003). La voie des points de contact a également été proposée pour le transport du cholestérol depuis la membrane externe vers la membrane interne dans le processus de stéroïdogenèse (Thomson, 2003), comme cela avait été exposé pour les acides gras (Schleyer et Neupert, 1985).

Les points de contact morphologiquement stables sont présents même après une désintégration de la mitochondrie. En revanche, les sites de translocation des préprotéines semblent avoir une dynamique assez importante et un complexe supramoléculaire contenant des sous unités des complexes TIM23 et TOM n'est formé qu'en présence d'un intermédiaire de translocation bloqué. Un tel complexe verrouillé se déplacerait latéralement dans les 2 membranes et s'accumulerait par conséquent au niveau des aires où les 2 membranes sont étroitement proches. Ces points de contact sont observés dans tous les types de mitochondries indépendamment de la présence de précurseur en transit (Rassow *et al*., 1989). En fait, les complexes TIM et TOM, malgré la présence de préprotéines en transit, peuvent diffuser latéralement indépendamment l'un de l'autre dans leur membrane. Il semble alors peu probable que de telles connexions présentent la stabilité des points de contact et conduisent à une proche apposition des deux membranes. Lorsque les préprotéines sont fermement verrouillées dans la machinerie de l'import, les complexes TIM et TOM sont associés de façon stable l'un à l'autre. Actuellement, il n'existe pas de preuve montrant l'implication des complexes de translocation dans la génération des points de contact.

La structure moléculaire et les fonctions des points de contact demeure matière à spéculations. Les interactions entre les composants des membranes interne et externe servent les fonctions mitochondriales essentielles telles que le guidage des métabolites et la fusion et

fission des mitochondries. Ces interactions sont dynamiques, mais il manque la preuve de l'existence d'une protéine permettant la stabilité structurale des points de contact. Le même dilemme est rencontré pour les sites de translocation protéique, bien que dans ce cas, les interactions stables entre les deux membranes sont observées lorsque les préprotéines sont stoppées durant l'import mitochondrial. Lorsque les complexes TOM et TIM sont tous deux bloqués, ils bougeraient latéralement vers les points de contact et s'y accumuleraient jusqu'à la séparation des membranes externe et interne.

Les jonctions de crêtes mitochondriales seraient également impliquées dans la translocation protéique. Les crêtes sont connectées à la membrane interne par ces jonctions constituées par des segments tubulaires étroits de diamètre uniforme (28-30 nm) dans différents tissus et organismes (Mannella *et al*., 1994 ; Perkins et al., 1997 ; Perkins et Frey, 2000). Leur longueur varie et peut atteindre plusieurs centaines de nm. La membrane interne et la membrane de la crête sont contiguës, cependant, l'étroitesse de ces jonctions conduit à l'hypothèse d'une division de la membrane interne en plusieurs compartiments. Les crêtes joueraient le rôle de barrières de diffusion pour les protéines et les métabolites (Mannella *et al*., 1994 , 1997). Cependant, au contraire de ce qui avait été supposé (van der Klei *et al*., 1994), une étude de tomographie électronique a montré une distribution au hasard des points de contact et des jonctions des crêtes sans colocalisation (Perkins et al., 1997). Les jonctions de crêtes limiteraient la diffusion latérale dans la membrane des crêtes. Cette dernière jouerait le rôle d'une sorte de réservoir pour les composants de la membrane interne, qui, sur demande, seraient disponible pour l'interaction avec des composants de la membrane externe. La dynamique des points de contact serait alors affectée par un tel processus. Par conséquent, la quantité des échanges de métabolites avec le cytosol, la fusion et la fission mitochondriale, la quantité de protéines importées dans la mitochondrie, l'apoptose et autres processus pourraient être régulés par les jonctions des crêtes (Reichert et Neupert, 2002). A l'inverse, l'espace inter-crête jouerait le rôle de réservoir pour les protéines intermembranaires solubles telles que Tim9, Tim10 ou le cytochrome c. Une autre question soulevée est de savoir si les jonctions des crêtes régulent différemment la diffusion latérale des sous unités protéiques encore non assemblées des complexes supramoléculaires. Dans ce cas, elles serviraient de point de contrôle de la qualité des structures quaternaires. Seuls les complexes intégralement associés seraient autorisés à franchir la membrane limitante des crêtes. Ces fonctions sont encore au stade d'hypothèse. Jusqu'à présent, aucun composant moléculaire impliqué dans la

formation des crêtes n'a été caractérisé, cependant, une telle activité a été discutée au sujet d'une GTPase apparentée à la dynamine présente dans les mitochondries (Wong *et al*., 2000).

V.3.6.5. La chaîne respiratoire mitochondriale

Le fonctionnement mitochondrial implique principalement la chaîne respiratoire responsable des oxydations phosphorylantes. La chaîne respiratoire est un ensemble de quatre complexes multi-enzymatiques (complexes I, II, III, IV) et de l'ATP synthétase (complexe V), enchâssés dans la membrane interne des mitochondries au niveau des crêtes (Figure 36).

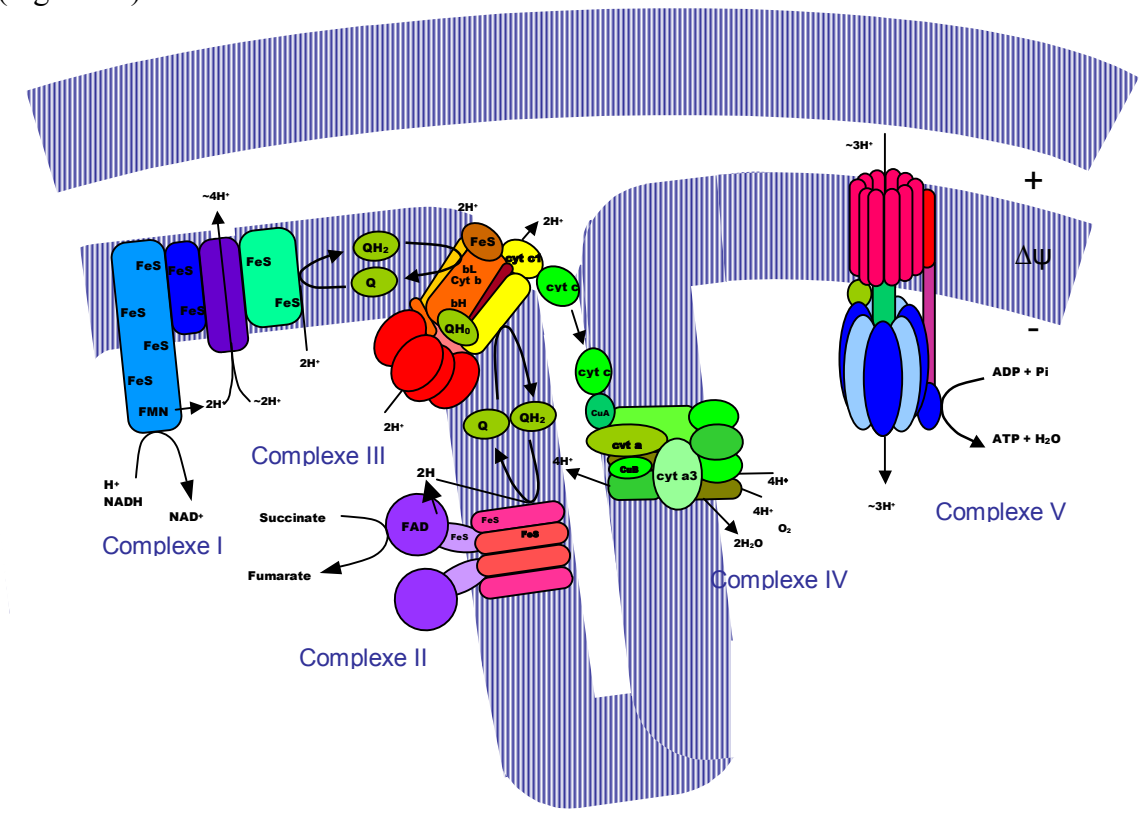


Figure 36 : Organisation de la chaîne respiratoire mitochondriale

Complexe I : NADH-ubiquinone oxydoréductase, complexe II : succinate-ubiquinone oxydoréductase, complexe III : ubiquinol-cytochrome c reductase, complexe IV : cytochrome c oxydase, complexe V : ATP synthase. FeS : centre Fer-Soufre, QH2 : quinol, Q : quinone, cyt : cytochrome, FMN : flavine mononucléotide, FAD : flavine dinucléotide.

La chaîne respiratoire ne va pas directement fabriquer de l'ATP, mais récupérer l'énergie stockée dans les métabolites utilisés par les complexes. Les transporteurs d'oxydoréduction de la chaîne respiratoire sont des flavoprotéines mononucléotides (FMN), des cytochromes, des protéines Fer-Soufre (Fe-S) et des ubiquinones couplées au cuivre. Le gradient de proton résultant de ce transport d'électrons fournit l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP au niveau du dernier complexe, le complexe V ou ATP synthétase.

Le complexe I, ou NADH-ubiquinone oxydoréductase, est un complexe lipoprotéique transmembranaire dont la masse globale est d'environ 1000 kDa (Walker, 1992 ; Fearnley *et al*., 2001). Il est constitué de plus de 40 sous unités dont seulement 14 sont indispensables à sa fonction principale. Il est le premier site accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire. La première étape consiste en un transfert d'électrons à partir du NADH provenant du cycle de Krebs, se déroulant dans la matrice vers le Coenzyme Q (ou ubiquinone) présent dans la bicouche lipidique. Le NADH est oxydé par la FMN puis les électrons passent à travers les 6 centres Fe-S dont le dernier cède ses électrons au Coenzyme Q. Lors de cette dernière étape, un transfert de protons s'effectue depuis la matrice vers l'espace intermembranaire à travers la membrane interne.

Le complexe II, ou succinate-ubiquinone oxydoréductase, comprend la succinate déshydrogénase et un ensemble de protéines contenant le cytochrome *b*. La structure de ce complexe a été étudié chez la levure et renferme 2 domaines particuliers, un domaine catalytique portant le FAD (« Flavin Adenine Nucleotide ») et un domaine protéique renfermant 3 centres Fe-S. Le domaine catalytique fixe le FAD par une liaison covalente dont la formation est stimulée par les intermédiaires du cycle de Krebs tels que le succinate, le fumarate, le malate et l'oxaloacétate (Brandsch et Bichler, 1989 ; Robinson et Lemire, 1996). Ce complexe permet d'oxyder le succinate en fumarate permettant le transfert de 2 électrons au complexe III par des ubiquinones diffusant dans la bicouche lipidique sans couplage avec un transfert de protons vers l'espace intermembranaire.

Après l'action du complexe I ou du complexe II, les molécules d'ubiquinone réduites vont transporter les deux électrons dans la membrane jusqu'au complexe III ou ubiquinol-cytochrome c réductase. Il peut également collecter les électrons provenant de la β-oxydation des acides gras (Brandt et Trumpower, 1994). Ce complexe multi-enzymatique est entièrement membranaire et présente une masse d'environ 280 kDa. Les ubiquinones réduites en ubiquinol forment un pool de coenzymes libres dans la phase lipidique membranaire et

jouent le rôle de navette des équivalents réducteurs entre tous les complexes membranaires et l'ubiquinol-cytochrome c réductase. Ce complexe permet le transfert d'électrons à un deuxième transporteur mobile situé dans l'espace intermembranaire, le cytochrome c. Cette ré-oxydation fournit l'énergie nécessaire pour éjecter les protons hors de la matrice mitochondriale.

Le cytochrome c va transporter les électrons jusqu'au complexe IV ou cytochrome c oxydase. Ce complexe, chez les mammifères, comprend plusieurs sous unités (13 chez le bœuf) dont le poids moléculaire est d'environ 200 kDa (Tsukihara *et al*., 1995). Il permet de catalyser la dernière réaction d'oxydoréduction de l'oxydation phopshorylante par l'intermédiaire de deux sous unités (I et II) contenant les centres d'oxydoréduction : CuA, hème *a* et *a3*/CuB (Capaldi, 1990). Les électrons donnés au cytochrome *c* entrent dans le complexe par l'intermédiaire d'un résidu tryptophane très conservé de la sous unité II (Witt *et al.*, 1998a,b ; Wang *et al.*, 1999b ; Zhen *et al.*, 1999) et sont transférés au di-oxygène par l'intermédiaire des 4 centres d'oxydoréduction pour former de l'eau. Le centre CuA est situé dans le domaine hydrophile de la sous unité II faisant face à l'espace intermembranaire. Ce centre est le premier et l'unique centre accepteur du complexe (Malatesta *et al.*, 1998). Les électrons sont transférés du centre CuA à l'hème *a* de la sous unité I. L'hème *a* se situe plus près du centre CuA que l'hème *a3* donc reçoit préférentiellement les électrons. Cependant, un transfert direct sur l'hème *a3* est possible mais avec des conséquences dramatiques sur l'efficacité du transfert d'énergie (Kannt *et al.*, 1999). Le centre binucléaire du complexe, situé sur la sous unité II et profondément enfoui dans la membrane. Il constitue le site de liaison de l'oxygène et le lieu de formation de l'eau. Il nécessite donc un accès facilité pour ses substrats (O_2 et H^+). Il joue probablement un rôle clé dans le transfert d'énergie (Trumpower et Edwards, 1979 ; Garcia-Horsman *et al.*, 1994). L'énergie libre liée à la réaction de la cytochrome c oxydase est stockée dans un gradient de protons, avec en général un rapport de 4 protons pompés pour une molécule d'oxygène réduite.

Le fonctionnement de la chaîne respiratoire a permis la création d'un gradient de pH et électrique entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaires des mitochondries *via* le transfert de protons (la face matricielle étant négative par rapport à la face externe où s'accumulent les charges positives). Mais il n'y a pas encore eu de synthèse d'ATP. Cette synthèse va être effectuée par une autre protéine membranaire, l'ATP synthétase ou F_0F_1-ATP synthase (450 kDa). La membrane interne étant imperméable aux protons, ceux-ci ne

peuvent retourner dans la matrice qu'en utilisant une perméase spécifique, l'ATP synthétase. Cette dernière permet la synthèse d'ATP. Ce complexe est formé par l'association de deux entités structurales distinctes : le complexe F_0 associant 5 types de sous unités, joue un rôle de tunnel transmembranaire (canal ionique) permettant le passage des protons ; le complexe F_1 formé de 5 types polypeptidiques différents, possède un site « ATPasique » actif sur la face matricielle de la membrane interne. Par l'intermédiaire de ce site, le complexe F_1 peut catalyser soit la déphosphorylation de l'ATP en ADP, soit la phosphorylation de l'ADP en ATP (elle fonctionne alors comme une ATP synthétase). Une région appelée tige assure la liaison de F_0 et F_1. Elle comprend plusieurs éléments dont l'OSCP, protéine conférant la sensibilité à l'oligomycine (inhibiteur spécifique de l'ATPase). Deux des sous unités intramembranaires constitutives de F_0 permettent à plusieurs complexes F_0-F_1 de s'associer pour former des chaînes spiralées, provoquant ainsi le reploiement de la membrane interne de la mitochondrie et la formation des crêtes mitochondriales. Les sous unités c et g de F_0 forment une sorte de rotor moléculaire capable de tourner à près de 100 tours/seconde, dont le sens de rotation est déterminé par le sens de passage des protons à travers F_0.

Les effets de la GH sont généralement générés indirectement *via* la stimulation de la production d'IGF-1 au niveau de ses tissus-cibles ou directement par interaction avec son récepteur spécifique présent à la surface des cellules-cibles. A la suite de cette interaction, les différentes voies de signalisation intracellulaires, conduisant aux effets biologiques, ainsi que l'internalisation du complexe hormone-récepteur sont induites. Cependant, la présence de l'hormone et de la cavéoline-1, principal marqueur des cavéoles, au niveau de la mitochondrie nous conduit à émettre une hypothèse concernant les interactions possibles entre la signalisation cellulaire et l'internalisation : est-ce que le mécanisme d'internalisation contribue à la régulation des effets de l'hormone ?

OBJECTIFS

Le mécanisme d'action de la GH inclut la liaison de l'hormone à un dimère de GHR suivie de l'activation de la protéine Jak2. Cette dernière s'autophosphoryle et phosphoryle les résidus tyrosine du domaine intracellulaire du GHR, fournissant des sites de liaison pour les molécules de signalisation et conduisant à l'activation de la plupart des voies qui contrôlent les effets de la GH, la transcription génique et le métabolisme. Parallèlement, le complexe GH-GHR_2 est internalisé par la voie des vésicules à clathrine ou par celle des cavéoles.

Considérant l'importance du domaine intracellulaire du GHR dans les actions biologiques induites par la GH, **notre premier objectif** est de définir les mécanismes impliquant la transduction du signal et/ou l'internalisation du complexe GH-GHR_2 dans l'obtention des effets physiologiques de la GH inhérents à la mitochondrie. Nous avons couplé l'analyse par oxygraphie de la consommation d'oxygène globale et la quantification des variations de NADH et de flavoprotéines obtenues par microscopie biphotonique de cellules CHO exprimant différentes constructions du GHR présentant des délétions et troncatures du domaine intracellulaire.

Les résultats que nous avons obtenus lors de cette précédente étude nous ont incité à étudier les voies d'internalisation de manière plus approfondie. A ce jour, deux voies sont connues pour l'internalisation du complexe hormone-récepteur : la voie des vésicules à clathrine, dépendante du système ubiquitine-protéasome et la voie des cavéoles. La première est responsable de la dégradation lysosomale de la GH et du GHR alors que la seconde serait plutôt privilégiée pour une redistribution intracellulaire de l'hormone au niveau de compartiments non hydrolysants tels que le noyau, l'appareil de Golgi et la mitochondrie. **Notre second objectif** est de déterminer l'implication de la voie des cavéoles dans l'internalisation du complexe hormone-récepteur au niveau du principal tissu-cible de la GH, le foie. Les études réalisées en microscopie électronique et biochimie nous ont permis d'aborder le rôle de cette voie d'internalisation dans la présence de la GH et du GHR au niveau du compartiment mitochondrial. Par oxygraphie sur des cellules BRL exprimant le GHR entier, nous avons cherché à vérifier l'existence d'une corrélation entre la cavéoline-1 et/ou les cavéoles dans la capacité respiratoire globale cellulaire suite à une stimulation par la GH.

Cependant, la présence de la GH associée à la mitochondrie permet d'émettre l'hypothèse d'une action directe de l'hormone sur la fonction de cet organite. **Notre dernier objectif** est de démontrer l'import spécifique de la GH marqué avec de l'iode par des

mitochondries isolées de façon à éliminer toute influence de la fonctionnalité des GHR présents à la surface cellulaire. Par la mesure des activités enzymatiques des différents complexes de la chaîne respiratoire en spectrophotométrie et de la capacité respiratoire globale par oxygraphie sur des mitochondries isolées, nous avons essayé d'évaluer l'impact direct de l'hormone sur la fonction mitochondriale.

RESULTATS

Les résultats sont présentés selon les 3 articles suivants :

I. Implication de la boîte 1 du GHR dans la consommation d'oxygène mitochondriale en réponse à une stimulation par la GH

II. Rôle de la cavéoline-1 dans le transport de la GH vers la mitochondrie

III. Action directe de la GH sur la fonction mitochondriale

I. Implication de la boîte 1 du GHR dans la consommation d'oxygène mitochondriale en réponse à une stimulation par la GH

Les actions biologiques de la GH sont initiées par son interaction avec ses récepteurs spécifiques (GHR) ancrés dans la membrane cellulaire des cellules-cibles. Le GHR appartient à la classe I de la superfamille des récepteurs des cytokines caractérisée par la présence d'un seul domaine transmembranaire et l'absence d'activité tyrosine kinase intrinsèque (Finidori et Kelly, 1995). La phosphorylation des résidus tyrosine du GHR induite par la GH est dépendante de l'habilité du GHR à activer une protéine tyrosine kinase, Jak2, membre de la famille Janus kinase. Jak2 est la protéine qui permet l'initiation de la plupart des voies de transduction du signal induite par la GH (Frank *et al*., 1994b ; Vanderkuur *et al*., 1994 ; Carter-Su et Smit, 1998). Une région riche en résidus proline, appelée boîte 1, est localisée entre les résidus 297 et 311 du domaine intracellulaire du GHR et est conservée chez les membres de la superfamille. Cette région est indispensable à l'association de Jak2 au GHR ainsi qu'à l'activation de Jak2 dépendante de la GH (Kelly *et al*., 1993 ; Goujon et al., 1994 ; Vanderkuur *et al*., 1994). Malgré le rôle très important joué par la boîte 1, le domaine C-terminal du récepteur prend également part à la signalisation intracellulaire induite par la GH (Sotiropoulos *et al*., 1994 ; Billestrup *et al*., 1995). De plus, ni la délétion de la boîte 1 ni la mutation simultanée des 4 résidus proline de cette région ne perturbent l'internalisation ou la translocation nucléaire de l'hormone (Mertani *et al.*, 2003). Une fois liée à son dimère de récepteurs, la GH peut être internalisée selon la voie classique des vésicules à clathrine, aboutissant à la dégradation lysosomale (Murphy et Lazarus, 1984 ; Roupas et Herrington, 1988, 1989), ou bien par la voie des cavéoles probablement dans le but d'une redistribution subcellulaire au niveau du noyau ou de la mitochondrie (Lobie *et al*., 1999). Le système de conjugaison à l'ubiquitine régule l'endocytose du GHR dépendante de la voie des clathrines (Govers *et al*., 1997 ; van Kerkhof *et al*., 2000, 2001a, 2002 ; Gent *et al*., 2002). En effet, la région intracellulaire du GHR ciblée par le système ubiquitine-protéasome est localisée dans un motif constitué de 10 résidus aminés appelé motif UbE (Govers *et al*., 1999). Ce motif inclut un résidu phénylalanine en position 346 chez le rat qui est considéré comme critique pour l'internalisation induite par le ligand (Allevato *et al*., 1995).

La combinaison des mécanismes intracellulaires aboutit aux réponses biologiques anaboliques (Isaksson *et al*., 1982) et lipolytiques (Davidson, 1987). La GH améliore l'oxydation lipidique en augmentant la disponibilité des substrats et, dans quelques cas, en

stimulant l'activité mitochondriale (Dudley et Portanova, 1987). L'action de la GH sur la fonction mitochondriale hépatique de rats hypophysectomisés est maintenant généralement admise (Katkocin *et al*., 1979 ; Clejean *et al*., 1981 ; Maddaiah et Clejean, 1986), mais reste cependant controversée selon le type d'étude réalisée (Postel-Vinay *et al*., 1982 ; Mutvei *et al*., 1989 ; Peyreigne *et al*., 2002).

Afin de déterminer le mécanisme sous-jacent à cette action de la GH, nous avons testé l'habilité de cellules CHO transfectées avec différentes constructions de l'ADNc codant pour le GHR à stimuler le métabolisme oxydatif par l'étude des variations d'autofluorescence du NADH et des flavoprotéines en utilisant la microscopie biphotonique. Les différentes constructions que nous avons utilisées produisent des GHR délétés de la boîte 1 ($GHR_{\Delta 297-311}$) ou d'une partie du domaine C-terminal (GHR_{1-454}), tous deux incapables d'induire la transduction du signal ; des GHR mutés ponctuellement (GHR_{F346A}) ou délétés de la totalité du domaine intracellulaire (GHR_{1-294}) présentant une internalisation perturbée. Nous avons également mesuré la capacité oxydative de ces cellules en réponse à la GH par oxygraphie. La consommation d'oxygène et l'oxydation du NADH ont été augmentées dans les cellules CHO-GHR_{1-638}, où le domaine intracellulaire du GHR est impliqué dans la transduction du signal et l'internalisation du complexe GH-GHR_2, et dans les cellules CHO-GHR_{1-454} où la région manquante est responsable de la stimulation de la transcription des gènes *via* STAT5 et des oscillations calciques intracellulaires libres. Aucune variation de la consommation d'oxygène n'a été détectée dans les CHO-$GHR_{\Delta 297-311}$ et CHO-GHR_{1-294}. L'augmentation de la réduction du NADH et le ralentissement de la consommation d'oxygène dans les CHO-GHR dont le résidu muté est compris dans le motif UbE (CHO-GHR_{F346A}), permettant une internalisation par la voie des clathrines, indique l'existence d'un système de régulation négative de la respiration cellulaire.

Ainsi, la respiration cellulaire est probablement stimulée en réponse à la GH par un mécanisme impliquant la voie de signalisation passant par la boîte 1. Ce mécanisme d'action induirait l'oxydation du NADH et serait régulé positivement par l'internalisation du complexe GH-GHR_2 par la voie des vésicules à clathrine.

GROWTH HORMONE RECEPTOR-BOX-1 IMPLICATION IN MITOCHONDRIAL OXYGEN CONSUMPTION IN RESPONSE TO GH STIMULATION

[1]Vivancos C.*, [1]Abbate A.*, [2]Usson Y., [3]Lobie P. and [1]Morel G.

1- CNRS UMR 5123 – Université Claude Bernard - Lyon 1, Bâtiment Dubois, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France.

2- CNRS UMR 5525, GDR 2588 - Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

3- Liggins Institute, University of Aukland, 2-6 Park Avenue, Private Bag, Aukland, New Zeland 92019, Nouvelle-Zélande

* The first two authors contributed in the same way to this work.

Address for correspondence

Dr. Gérard Morel

CNRS UMR 5123, Bât. R. Dubois, 3ème étage, Université Claude Bernard-Lyon 1,

43 Bd. du 11 Novembre 1918, F69622 Villeurbanne cedex, France

Phone/Fax: (33) 4 72 43 29 27

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

Key words: GH, GHR mutations, endocytosis, mitochondrion, respiration.

ABSTRACT

The effects of GH on metabolism are well documented. Some of these effects occurred through a control of mitochondrial function. The binding of GH to its receptor (GHR) initiates GH-dependent signal transduction and internalization pathways. Following in vivo injection of labeled GH, it was found in the mitochondrial compartment. To determine its underlying mechanism of action on mitochondrial respiration we used CHO transfected cells with different truncated or deleted constructs of GHR (unable to induce signal transduction ($GHR_{\Delta 297-311}$ and GHR_{1-454}) or internalization (GHR_{F346A}) or both (GHR_{1-294})) by measuring oxidative capacity by polarography and changes in NADH and flavoproteins (FPs) autofluorescences using two-photon excitation (TPE) microscopy, and GH and GHR internalization pathways by confocal laser scanning microscopy. Cellular oxygen consumption and NADH oxidation were increased in response to GH stimulation, in CHO cells expressing the full-length GHR (GHR_{1-638}) involved in signal transduction and GH-GHR_2 internalization, and the C-terminally truncated GHR (GHR_{1-454}), responsible for gene transcription and intracellular free Ca^{2+} oscillations. No variation was detected using GHR constructs deleted of box-1 region ($GHR_{\Delta 297-311}$) and devoid of both box-1 and intracellular domain (GHR_{1-294}). The increase in NADH reduction and the slowdown of oxygen consumption in CHO-GHR_{F346A} cells, well-known to disrupt GH clathrin-coated pits internalization, indicates the existence of a negative regulatory system acting on cellular respiration. In conclusion, cellular respiration is stimulated in response to GH by a way involving signal transduction via NADH oxidation and is negatively regulated when GH endocytosis is impaired.

INTRODUCTION

The biological actions of growth hormone (GH) are initiated by its interaction with specific membrane-bound receptors present at the surface of target cells. The growth hormone receptor (GHR) belonging to the type I of cytokine receptors family is characterized by a single trans-membrane domain and the lack of an intrinsic catalytic activity (1). GH-induced tyrosine phosphorylation of GHR depends on the ability of the receptor to activate the tyrosine kinase Jak2, a member of Janus kinase family (2-4) which initiates most of GH-dependent signal transduction pathways. A proline-rich region, termed box-1, localized between amino acid 297 and 311 of GHR intracellular domain and well-conserved within members of cytokine receptors family, is required for association of Jak2 with GHR as well as for GH-dependent activation of Jak2 (3, 5, 6). Despite the leading role played by box-1, the C-terminal domain of the receptor also takes part in GH-induced intracellular signalization (7, 8). Upon binding to its receptor, GH internalizes via clathrin coated pits pathway to be degraded in lysosomes (9-11) and via caveolae probably to be redistributed to different subcellular compartments including nucleus and mitochondria (12). Neither deletion of box-1 nor simultaneous mutation of the 4 prolines in this region impaired GH internalization and nuclear translocation (13). Clathrin coated pit-dependent GHR endocytosis has been demonstrated to be regulated by the ubiquitin conjugation system (14-18). GHR intracellular region targeted by the ubiquitin system is localized in the cytosolic tail as a 10 amino-acid-long sequence, DSWVEFIELD, termed UbE (Ubiquitin-dependent Endocytosis) motif (19). This motif includes a phenylalanine residue in position 346 in rat GHR that has been identified as being critical for ligand-mediated internalization (20). GHR ubiquitination, endocytosis and degradation could be independent of signal transduction via Jak2 (21).

Combined intracellular mechanisms result in the biological responses among which anabolic (22, 23) and lipolytic (24-26) effects of the hormone are well demonstrated. GH improves lipid oxidation by increasing the availability of substrates and, in some cases, by raising the cell mitochondrial activity (27). GH action on hepatic mitochondrial function of hypophysectomized rats has been reported (28-30) to activate respiration but remains however questioned (31-33). Moreover, GH was specifically found within liver (34) and pituitary (35) mitochondria *in vivo* as early as 2 min. The detection of GH in mitochondria raises the question of its functional importance.

To elucidate the mechanism involved in the GH-induced stimulation of mitochondrial oxidative capacity and the role played by its receptor, GH effects were analyzed on mitochondrial activity by using two-photon excitation (TPE) microscopy and polarography approaches. In the same time, we tracked GH internalization in CHO cell lines stably transfected with truncated, deleted or mutated forms of GHR. Our results showed that GH acts on mitochondrial oxidative capacity through the box-1 region of GHR supposedly by activating NADH oxidation within mitochondria.

MATERIALS AND METHODS

Hormone and antibodies

Recombinant rat GH (rGH) and a guinea pig anti-rGH antibody were obtained from Dr AF Parlow (National Hormone and Pituitary program). The murine anti-rGHR (mAb 263) was a generous gift from Dr MJ Waters (Queensland University, Brisbane).

Cellular transfection of GH receptor cDNA

The expression plasmid, pIPB-1, containing the full-length rat GH receptor cDNA (GHR_{1-638}), under the transcriptional control of the human metallothionein IIa promoter and the simian virus (SV) 40 enhancer was constructed as previously described (36). cDNAs encoding GHR truncation mutants were constructed by introducing stop codons at position 295 (GHR_{1-294}) and at position 455 (GHR_{1-454}) using *in vitro* mutagenesis. The construction of GH receptor cDNA expression plasmids containing deletion of box 1 ($GHR_{\Delta 297-311}$) and a single point mutation in position 346 (GHR_{F346A}) has been previously described (3, 20, 37). The cDNA constructions were transfected into CHO-K1 cells with lipofectin together with the pIPB-1 plasmid that contains a neomycin resistance gene fused to the thymidine kinase promoter (38). Stable transfected cells were selected using 1 mg/ml G418 and transfectants were expressed into CHO-GHR_{1-638}, -$GHR_{1-295,}$ -$GHR_{1-455,}$ -$GHR_{\Delta 297-311}$ and -GHR_{F346A}.

Polarographic analysis of CHO cells respiratory activity

Exponentially growing CHO cells were incubated in serum-free medium for 12 h before being washed twice in ice-cold PBS. The cells were harvested in Tris-based, Mg^{2+}-, Ca^{2+}-deficient (TD) buffer (0.137 M NaCl/5 mM KCl/0.7 mM Na_2HPO_4/25 mM Tris-HCl, pH 7.4 at 4°C), spun and resuspended in ice-cold TD buffer after removing the supernatant (39). The concentration of cellular proteins was quantified with Bio-Rad protein assay (500-0113; with BSA as standard) and adjusted to a final concentration of 10 mg/ml. Rates of oxygen consumption were measured with a Clarck-type oxygen electrode, model DW1 from Hansatech Instruments Laboratories (Norfolk, U.K.). The chamber, thermostatically controlled at 37 ± 2 C, was filled with 1.8 ml of respiratory medium (corresponding to TD buffer pH 7.4) saturated with room air. For each cell line (CHO-GHR_{1-638}, -$GHR_{1-295,}$ -$GHR_{1-455,}$ -$GHR_{\Delta 297-311}$ and -GHR_{F346A}), 4.5 mg cellular protein in 1.8 ml TD buffer were added to the cell and incubated for 15 min with 50, 200 or 500 nM rGH under constant stirring. Controls were

performed in the same conditions for each cell line without rGH. The electrode was calibrated with demineralized water and TD buffer at 37 C based on the oxygen content of water (39).

Hormone internalization

For hormone internalization kinetics, CHO cells were grown to ~80% confluence in Ham's F12 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin before being serum deprived for 12 h. Cells were then incubated for the indicated time periods with 50 nM rGH, washed in serum free media and subsequently fixed for 15 min in ice-cold 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 at the end of respective time intervals. The cells were permeabilised in 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min, washed extensively with PBS and incubated for 1 h with an anti-rat GH antibody diluted to 1/1000 (1 µg/ml) and an anti-rGHR (mAb 263) antibody diluted to 1/50 (25 µg/ml). GH and GHR detection was performed with Cy3™ conjugated goat anti-guinea pig IgG diluted to 1/500 and Rhodol green™ conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) diluted to 1/100, respectively. Controls were performed by (a) omission of the primary antibody, (b) replacing primary antibody with the same protein concentration of preimmune mouse or guinea-pig serum and (c) preincubation (24 h at 4 C) of anti-rGH with 50 µg/ml of recombinant hGH or mAb 263 with 20 µg/ml recombinant receptor extracellular domain.

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 Cy3 and Rhodol green were collected sequentially on two different channels to avoid cross talk between fluorescence signals. Cy3 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, and an additional 590 nm long-pass filter was used after the pinhole in order to reject non-specific fluorescence. Rhodol green fluorescence was excited with a 488 nm Argon laser source. A 510 nm dichroic beam splitter was used to separate laser excitation from emitted fluorescence and an additional 515-545 nm band-pass filter was used after the pinhole 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 and nuclear contour delineation in the further image analysis stage. Image averaging (Kalman filtering) was used for the acquisition of the fluorescence images to improve the signal-versus-noise ratio.

Analysis of CLSM images

Ten image triplets (Cy3 – Rhodol green – 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 cytoplasm and nucleus binary masks of each cell. Then the Cy3 image was loaded. For each cell, the fluorescence intensities (arbitrary unit) were measured using the previously obtained binary masks inside the cytoplasm and the nucleus. 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. Next, the Rhodol green image was loaded and the same measurements were made using the binary masks as previously described (13).

Analysis by TPE fluorescence microscopy of NADH and FPs in CHO cells.

Redox fluorometry was based on intrinsic fluorescence of reduced pyridine nucleotides (NADH) and oxidized flavoproteins (FPs), providing a way to determine cellular energy metabolism as a reflect of mitochondrial functioning (40-43). Fluorescence images were collected *in situ* by using TPE with near-infrared (NIR) excitation. TPE microscopy provides advantages such as negligible out-of focus photobleaching, reduced light scattering and photodamage, and improved fluorescence collection efficiency (44, reviewed by 45, 46, 47).

Autofluorescence of mitochondrial FPs and NADH was imaged using a confocal microscope (LSM510 NLO, Zeiss). The images were collected with a 40x water immersion lens that prevented from geometrical aberrations when observing *in vitro* living cells. The autofluorescence of FPs was excited with the 488 nm line of an Argon laser, the laser output power was set to an average of 8 mW. The fluorescence was collected through a 510 nm dichroic beam-splitter and a 505-550 nm band pass filter. The pinhole aperture was set to one

Airy disk unit. The autofluorescence of NADH was imaged by two-photon excitation using a femto-second pulsed infra-red laser (Tsunami+MilleniaVIII, SpectraPhysics). The pulse frequency was set at 80 MHz with a pulse width of 100 femto-second. The infra-red line was tuned to 720 nm. The laser output power was set to 400 mW. The fluorescence signals were collected through a multiline beam splitter with maximum reflections at 488 ± 10 (for rejection of the 488 nm line) and above 700 nm (for rejection of infra-red excitation). A second 490 nm beam splitter was used to discriminate the NADH signal from the flavoprotein signal. Then, the flavoprotein signal passed through a 500-550 nm band-pass filter with an additional infra-red rejection filter before being collected through a pinhole (one Airy disk unit). The NADH signal was redirected to a 390-465 nm band-pass filter with an additional infra-red rejection filter.

CHO cells were cultured in 2 wells cover-glass in Hams'F12 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin and incubated for 12 h in serum-free medium before rGH stimulation. During the experiment, cells could only be kept at room temperature. To monitor GH-induced fluorescence changes, one image was acquired to characterize the baseline autofluorescence intensity. Each image (512 x 512 pixels) was collected by raster scanning the focused laser beam over a typical sample area of ~197 x 296 µm. Each image was acquired in ~1 s, and the average pixel dwell time for the scanning laser beam was ~0.6 μs. Subsequently, increasing rGH concentrations were added carefully without disturbing the attached cells within the microscopic field of view. Images were acquired for specified time periods immediately after hormone addition. Both NADH and FPs fluorescences of single field were sequentially integrated for the studied time period in cytoplasm and nucleus using the image analysis program SAMBA 2005 (SAMBA Technologies, Meylan, France) modified for this particular application. The average fluorescence intensity of cytoplasm was set off the nucleus background intensity to improve signal-versus-noise ratio.

Statistics

All data are expressed as mean ± SEM. Data were analyzed using the two tailed t-test or ANOVA. Results were considered significant at the 5% level.

RESULTS

In CHO cells overexpressing cDNAs encoding the full-length GHR (CHO-GHR_{1-638}) we have observed a stimulation of oxygen consumption in response to rGH exposure. The optimal concentration of oxygen to obtain the maximal response was 200 nM rGH. Metabolic activity reached a maximum (60% stimulation compared to control without GH) within 10 minutes and then stabilized until 15 minutes (Figure 1). With lower concentration (50 nM), oxygen consumption increased progressively between 2 and 15 minutes (40% stimulation). Inversely, no change arose from an exposure to 500 nM rGH, which is known to be a non physiological dose inducing a saturation effect. Similarly a saturation phase after 10 minutes was observed with 200 nM.

The functional short term effect of GH on oxygen consumption was correlated with the GH effect on mitochondrial NADH oxidation and FPs reduction as a reflect of mitochondrial metabolism in CHO-GHR_{1-638} cells using TPE microscopy. A decrease in NADH fluorescence expresses an increase in NADH-oxidized form, which could result from an acceleration of respiratory chain activity or from a slowdown in NADH formation. In the same way, an increase in FAD fluorescence could result from an acceleration of mitochondrial respiration or from an increase in FPs amount covalently bound to FAD in mitochondria (48). Figure 2 represents the autofluorescences emitted by NADH (in blue) and FPs (in green) in CHO-GHR_{1-638} cells exposed for 30 minutes to 200 nM rGH. The NADH signal was homogeneously distributed in a peri-nuclear area rather extended from the nucleus, while FPs fluorescence was mainly concentrated in large bright congregates randomly localized into cytoplasm. The demonstration of a distinctive distribution in NADH and FPs into the cell could reveal the coexistence of 2 mitochondrial populations or a behavior own to each cofactor according to the stimulus. The incubation of CHO-GHR_{1-638} with 200 nM rGH during 30 minutes resulted in a decrease of NADH signal intensity (Figure 3A) as early as 2 minutes and became significant from 5 minutes ($P<0.05$) compared to control (Figure 4A). Signal intensity declined progressively until 15 minutes and stabilized (20%) between 15 and 30 minutes with 200 nM and 50 nM rGH (Figure 4A). In contrast, no change in FPs autofluorescence was observed in these cells in response to rGH (Figures 5A, 6A). In other way, we have previously shown that GH was quickly internalized in these CHO-GHR_{1-638} cells both in cytoplasm and nucleus (13).

The deletion of total GHR intracellular domain results in the impairment of signal transduction and CHO-GHR_{1-294} cells were characterized by the absence of the hormone endocytosis phenomenon (Figure 7A). GH and GHR immunoreactivities did not show any variation following rGH stimulation. GH did not internalize in these cells and the GHR distribution pattern was similar in control and stimulated cells (Figure 7B). Therefore, in absence of signal transduction and internalization, the oxygen consumption was not affected by rGH stimulation (Figure 8). In the same way, NADH (Figure 3B) and FPs (Figure 5B) autofluorescences were not modified in response to rGH stimulation. These results were confirmed by the quantitative analysis (Figures 4B, 6B).

In absence of signal transduction mediated by Jak2, in CHO-$GHR_{\Delta 297-311}$ cells, no change in oxidative capacity in response of rGH stimulation suggested the involvement of the GHR box-1 region in rGH-dependent stimulation of mitochondrial respiration (Figure 8). Interestingly, if no variation in NADH autofluorescence intensity was observed (Figures 3C, 4C), the lack of box-1-dependent signal transduction induced an increase in FPs signal intensity (Figures 5C, 6C). Our results showed that only $GHR_{\Delta 297-311}$ construct was likely to induce modification in FPs signal intensity. The remove of box-1-dependent signal transduction resulted from a significant increase in FPs autofluorescence ($P<0.05$) which appeared from 5 minutes and persisted during 30 minutes with 50 and 200 nM rGH (Figure 6C). The FAD reduction reaching a maximum around 25% 15 minutes after 200 nM rGH exposure could reflect a stimulation of mitochondrial respiration as well as an other mechanism involving an increase in mitochondrial FPs amount under reduced form for example. The GH internalization process in CHO-$GHR_{\Delta 297-311}$ cells revealed, as described in our previous study (13), that neither deletion in box-1 nor box-1 prolines mutation changed the kinetic of GH internalization, even if the nuclear retention of GH was increased. Thus, signal transduction mediated by the activation of the box1 region is implicated in the GH activation respiration effect.

The presence of box-1, but the lack of ability to activate certain gene transcription (49) and intracellular free Ca^{2+} oscillations (8) in CHO-GHR_{1-454} cells in response to rGH was associated to a kinetic of GH uptake closely related to those described for CHO-GHR_{1-638} (Figure 9). The half C-terminal part truncation of the intracellular domain altered neither GH trafficking nor GHR distribution. Within 5 minutes of CHO-GHR_{1-454} cells exposure to 50 nM rGH, cytoplasmic and nuclear compartments already exhibited a significant GH immunoreactivity. Between 15 and 30 minutes, the nucleus was particularly immunoreactive,

indicating an important nuclear translocation of the hormone. The localization of GHR immunoreactivity following GH exposure was mainly in the peri-nuclear area. However, a nuclear translocation was observed within 15 minutes and was correlated to the nuclear uptake of GH. This nuclear GHR immunoreactivity accumulation was transient and declined within 30 minutes. Dual detection showed similar location of both GH and GHR immunoreactivities essentially in the peri-nuclear area suggesting that only a portion of GH was imported in the nucleus under a complexed form with its receptor. The time course of GH endocytosis and GHR rearrangements was also measured by quantitative analysis in CHO-GHR_{1-454} cells (Figure 9B). In cytoplasmic and nuclear compartments, variations of GH and GHR associated-fluorescence intensities were similar to those obtained by CSLM images, confirming the previous description of changes in GH trafficking and GHR distribution (13). GH immunoreactivity in both subcellular compartments was early detectable (1 minute), reached a peak within 15 minutes (60%) and then stabilized within 30 minutes. Pattern of GHR labeling variations displayed the same pattern including a cytoplasmic accumulation (+30%) associated to a nuclear translocation (+40%) as early as 1 minute, an increase of GHR immunoreactivity in each compartment (+60%) until 15 minutes followed by a progressive decrease until 30 minutes. According to these results and those obtained with the GHR_{1-638}, it seems that the half C-terminal part of GHR intracellular domain known to take part in GH-mediated signalization was not involved in GH endocytosis.

CHO-GHR_{1-454} cells showed, like the CHO-GHR_{1-638} cells, an activation of their respiration state (Figure 8). In both cases, oxygen consumption increased as early as 2 minutes following rGH stimulation and reached a maximum about 50% within 15 minutes. CHO-GHR_{1-638} cells supplied a better response to rGH exposure than CHO-GHR_{1-454}, suggesting the contribution of GHR C-terminally domain in GH-induced metabolic activation. Hypothesis according to NADH oxidation observed in these cells (Figure 4D) leading to a stimulation of the respiration was validated by displaying an increase in oxygen consumption.

According to results obtained with TPE microscopy analysis, signal appeared stronger in CHO-GHR_{1-638} and CHO-GHR_{1-454} cells for 0 minute time period than in CHO-GHR_{1-294} and CHO-$GHR_{\Delta 297-311}$ cells. Incubation with 200 nM rGH during 30 minutes resulted in a decrease of NADH signal intensity in CHO-GHR_{1-454} cells compared to 0 minute time period (Figure 4D). According to the absence of photobleaching in CHO cells exposed for 30 minutes without rGH (data not shown), this result is not likely due to artifacts. No variation in FP autofluorescence was detected in CHO-GHR_{1-454} (Figure 6D).

Absence of GH internalization induced by mutation of phenylalanine 346 residue in alanine resulted in serious disruption of GH internalization (Figure 10A) as described by Allevato *et al.* (20). Although signal intensity remained very low, GH immunoreactivity was already detectable from 1 minute to 30 minutes in both cytoplasm and nucleus and was closely related to changes in GHR distribution (Figure 10A). GHR immunoreactivity distribution varied depending on whether cells were incubated with or without GH. A slight peri-nuclear accumulation and nuclear translocation of GHR labeling occurred between 1 and 30 minutes. Dual detection of GH and GHR immunoreactivities showed GH mainly localized in the nucleus and partly colocalized to its receptor. Quantitative analysis corroborated these results (Figure 10B). The GH-associated signal was mainly detected in nucleus during the first 30 minutes (20%). In the same time, GHR signal intensity increased about 15% in each subcellular compartment between 1 and 30. Based on these results, this mutation which prevented ubiquitin GHR conjugation could strongly delay GH internalization and nuclear translocation without total inhibition. This would reveal a GH endocytosis mechanism different from the classical system involving the GHR conjugation to ubiquitin.

A decrease of oxygen consumption was observed with CHO-GHR_{F346A} cells (Figure 8). The respiratory activity was the lowest level as early as 2 minutes after rGH exposure and tended towards control within 15 minutes. This mutation of phenylalanine 346 residue resulted in a transient increase in NADH signal intensity (10%) detectable from 2 minutes and statistically significant from 5 to 15 minutes ($P<0.05$) with 50 and 200 nM rGH (Figure 4E). It could correspond to an inhibition of the NADH oxidation inducing a slowing down of the mitochondrial oxidative capacity or to an activation of NADH reduction above the first complex of the respiratory chain. Inversely, no modification of FP autofluorescence was detected (Figure 6E). By preventing rGH internalization *via* clathrin-coated pits, oxygen consumption was slowed down by a way involving the NADH oxidation.

As evidenced by polarographic results, cell oxygen consumption could be stimulated by rGH *via* a signal transduction pathway involving GHR box-1 region acting on NADH to be more or less oxidized. Lack of this signaling pathway revealed a mechanism likely to induce the reduction of mitochondrial FPs. This effect would be regulated according to the pathway used by the hormone for its internalization.

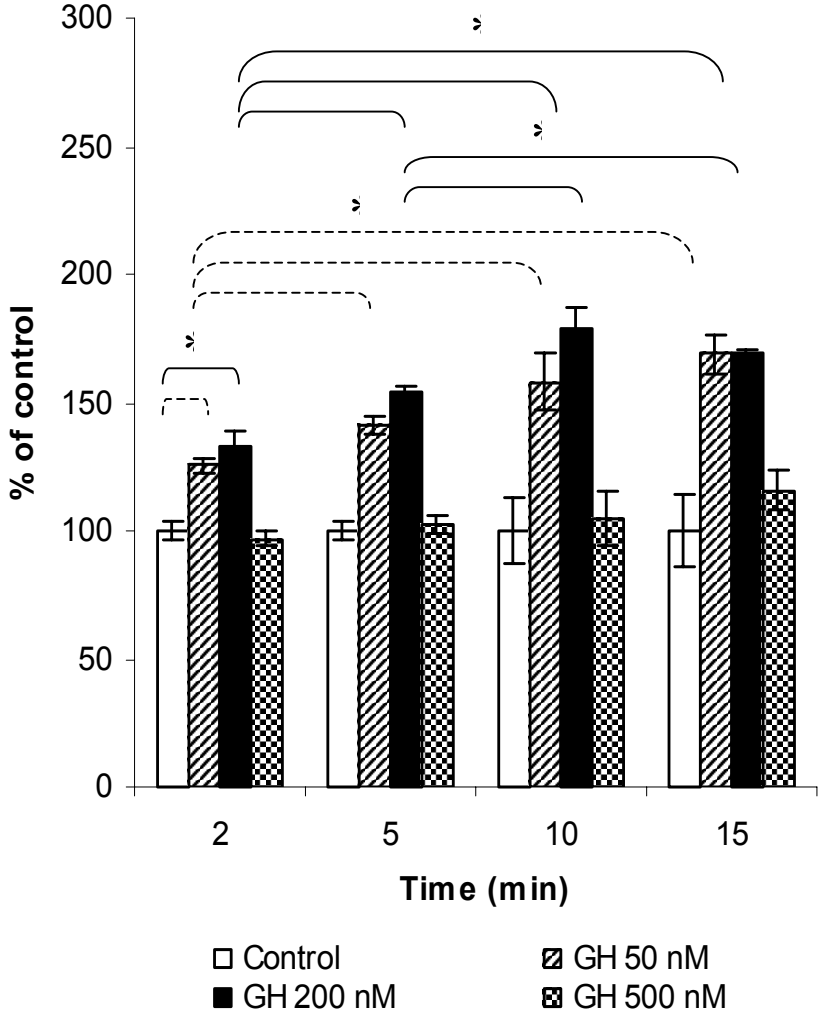

300
250
200
150
100
50
0
% of control
2
5
10
15
Time (min)
Control
GH 50 nM
GH 200 nM
GH 500 nM

Figure 1

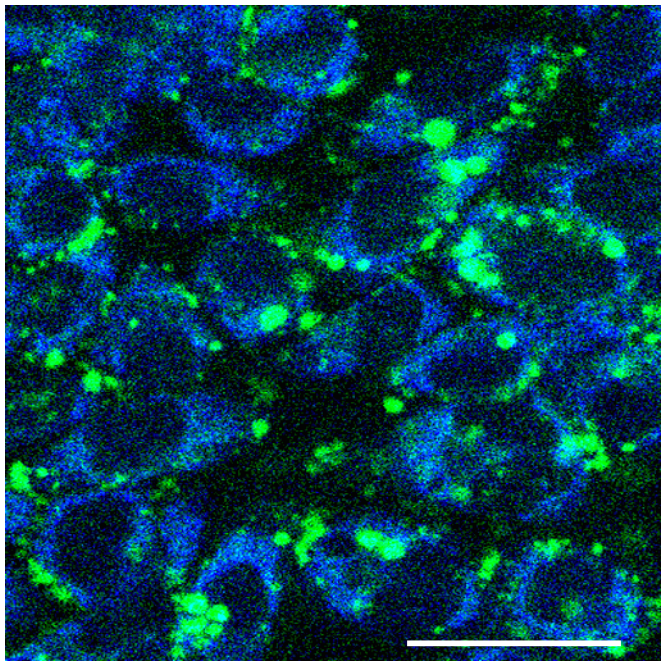


Figure 2

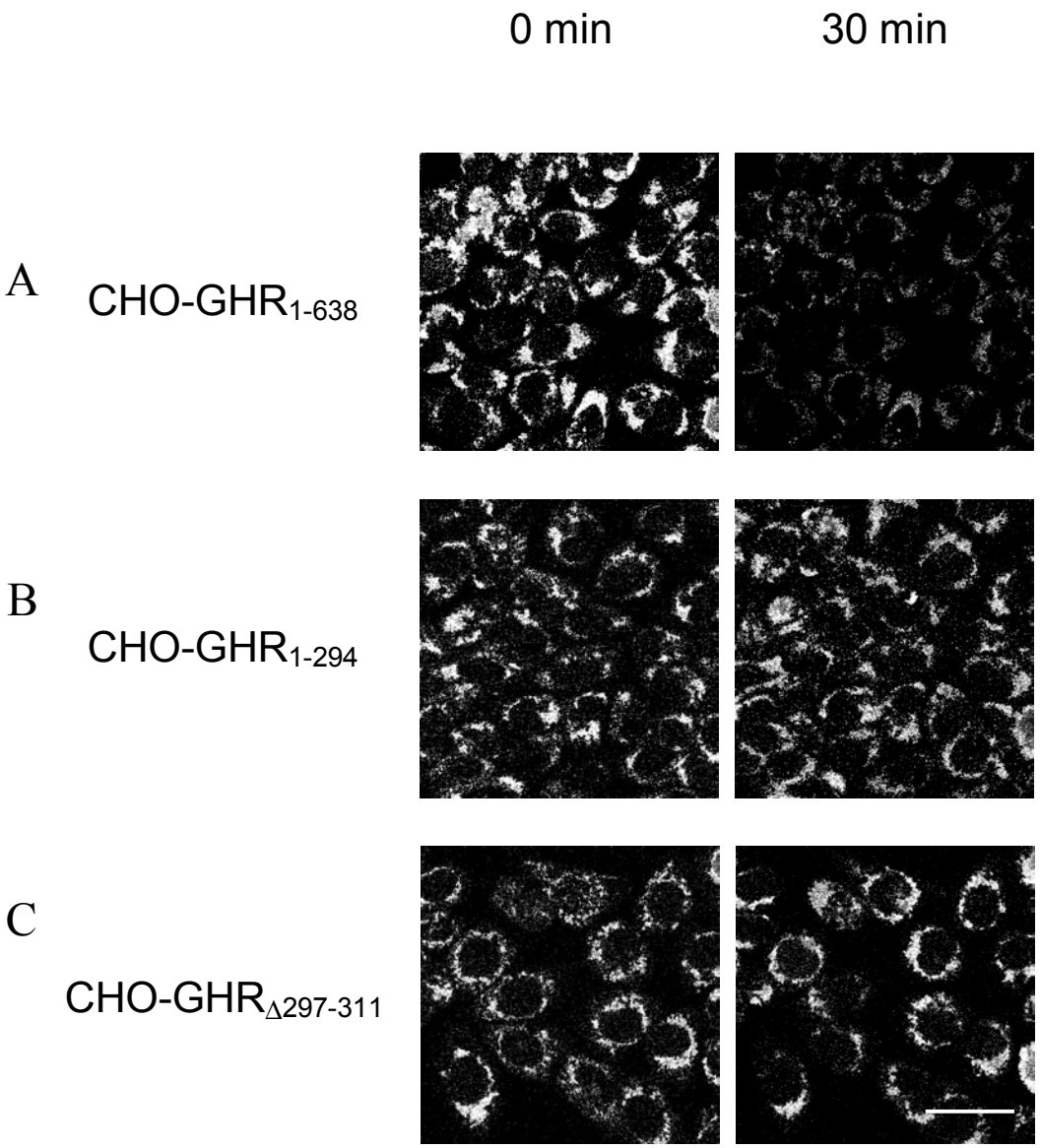
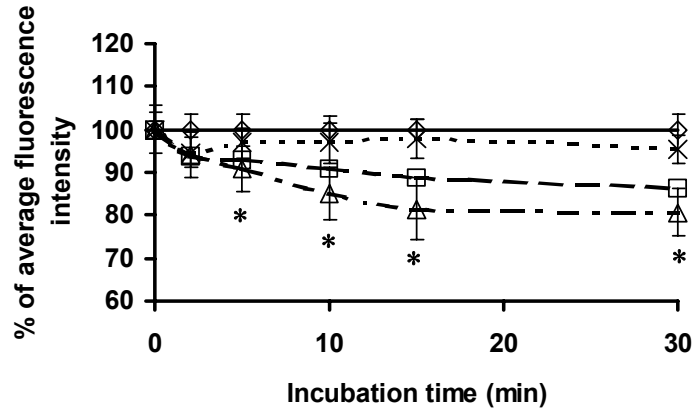
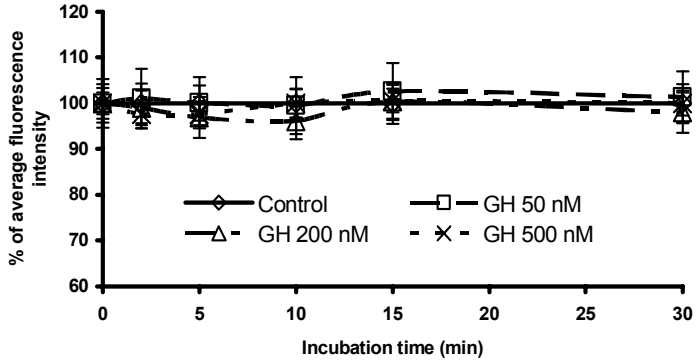


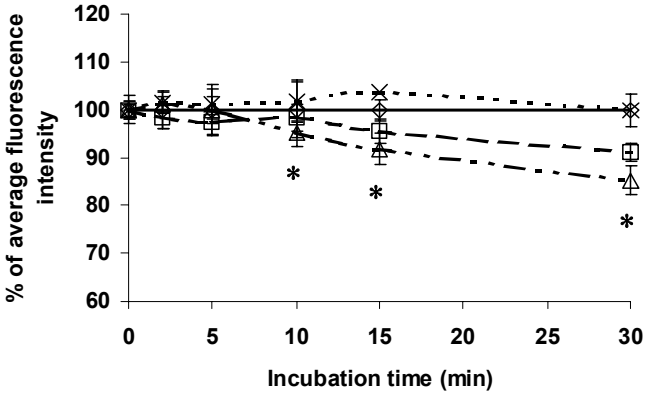
Figure 3



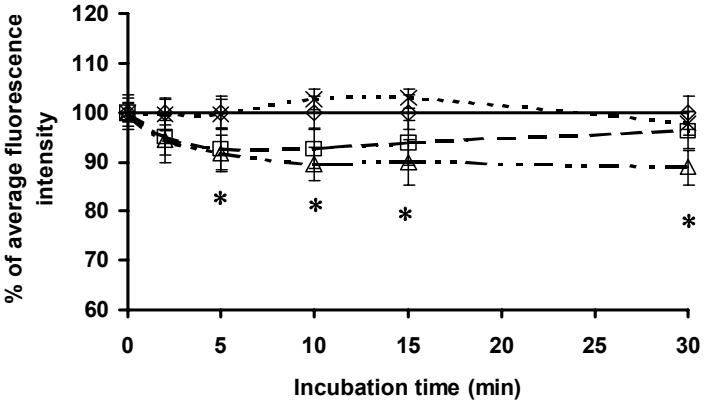
A



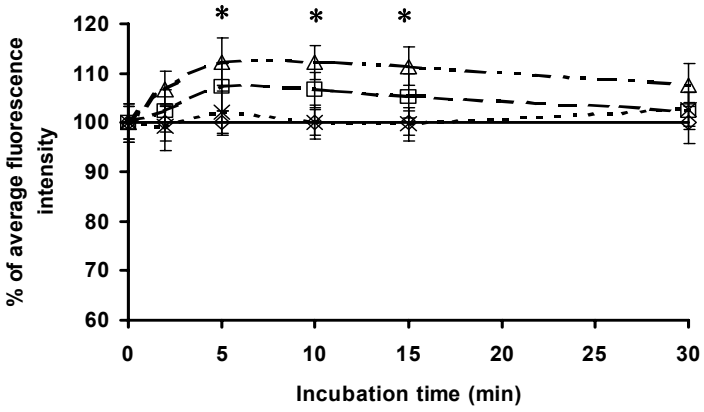
B



C



D



E

Figure 4

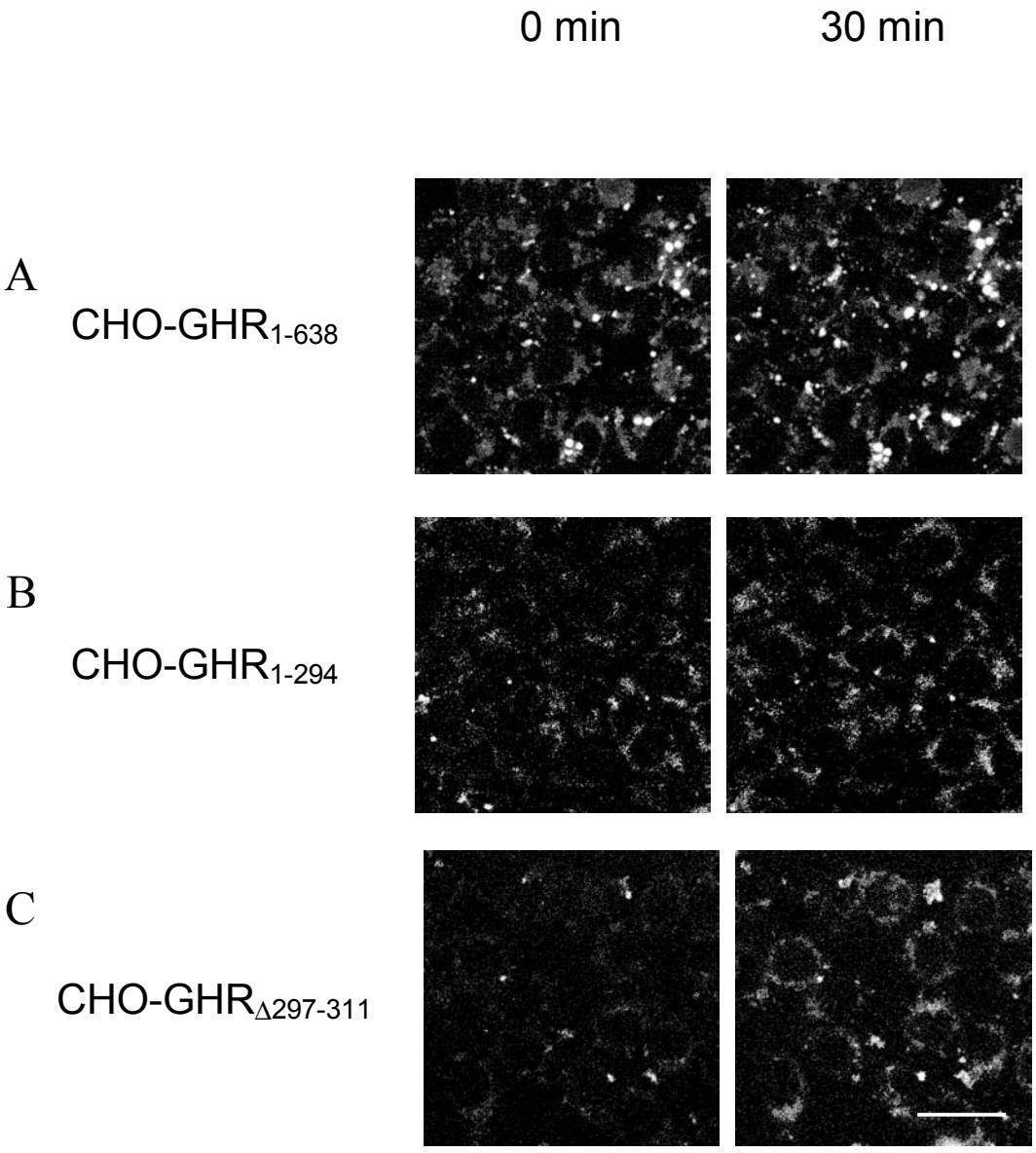
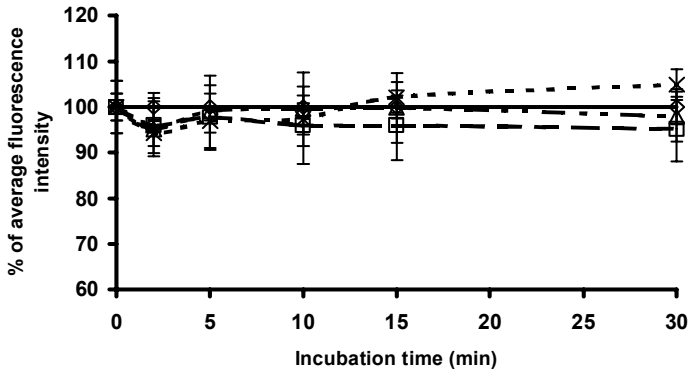
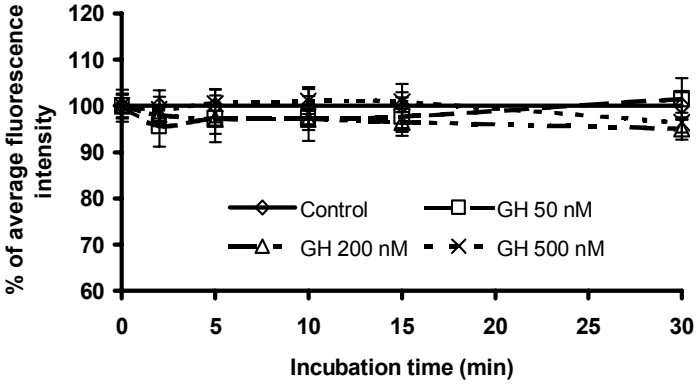


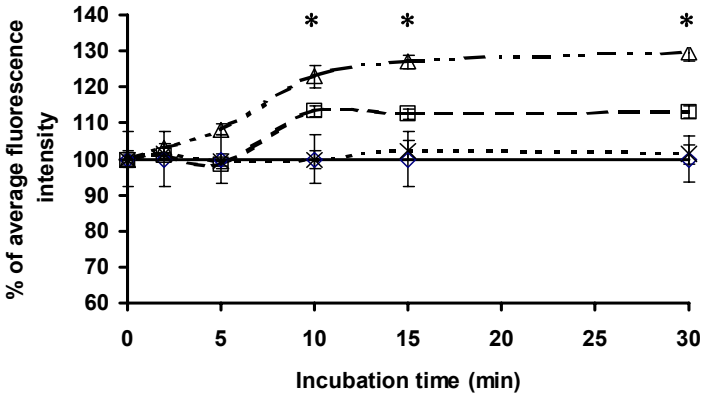
Figure 5



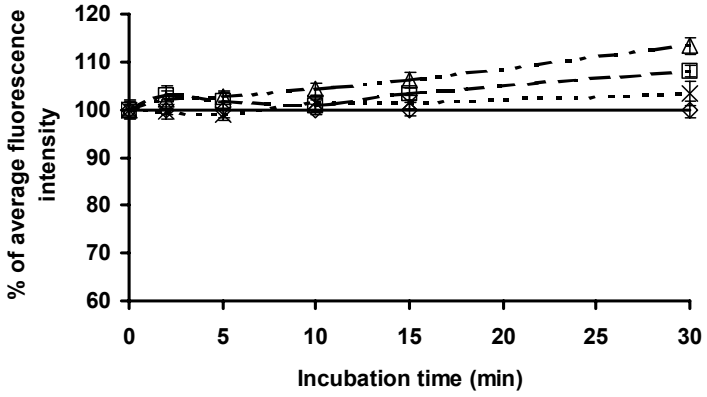
A



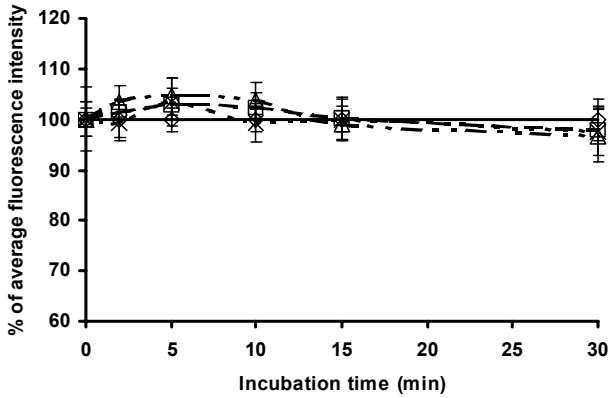
B



C



D



E

Figure 6

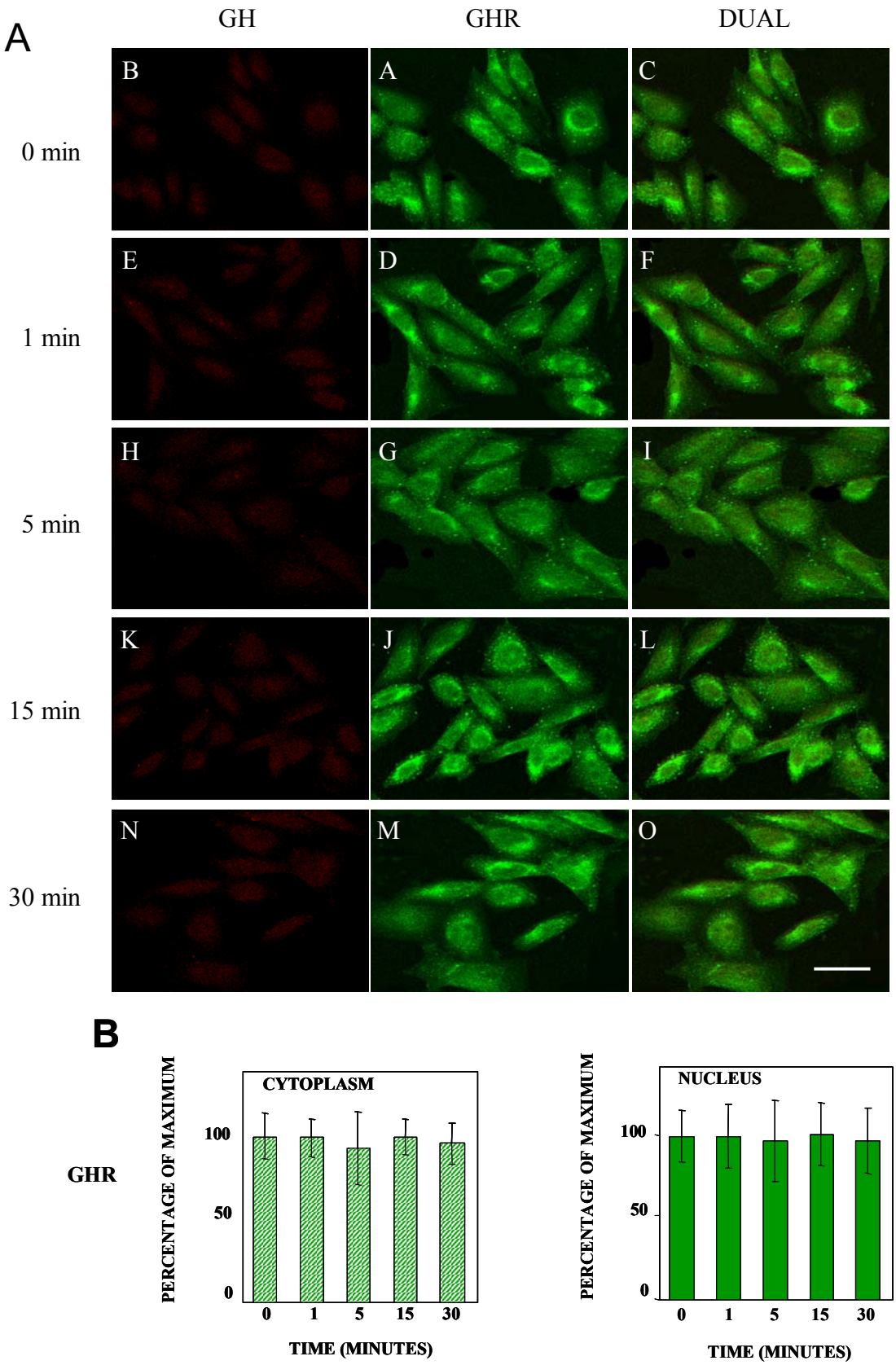

A
GH
GHR
DUAL
0 min
1 min
5 min
15 min
30 min
B
GHR
PERCENTAGE OF MAXIMUM
CYTOPLASM
100
50
0
0 1 5 15 30
TIME (MINUTES)
PERCENTAGE OF MAXIMUM
NUCLEUS
100
50
0
0 1 5 15 30
TIME (MINUTES)

Figure 7

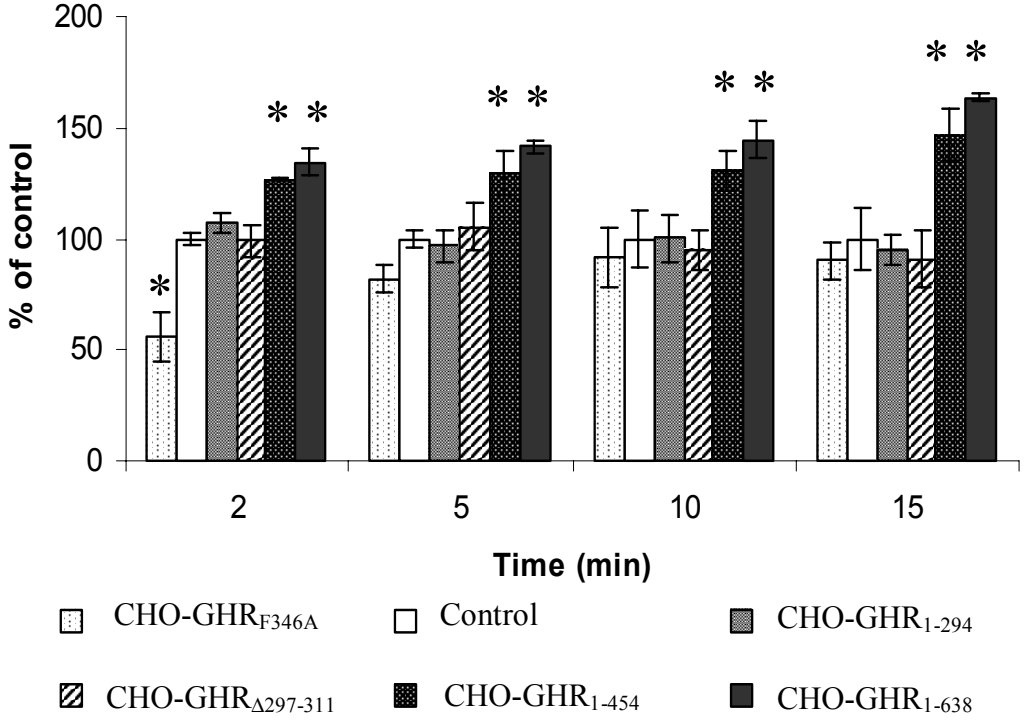

200
150
100
50
0
% of control
2
5
10
15
Time (min)
CHO-GHR$_{F346A}$
Control
CHO-GHR$_{1-294}$
CHO-GHR$_{\Delta 297-311}$
CHO-GHR$_{1-454}$
CHO-GHR$_{1-638}$

Figure 8

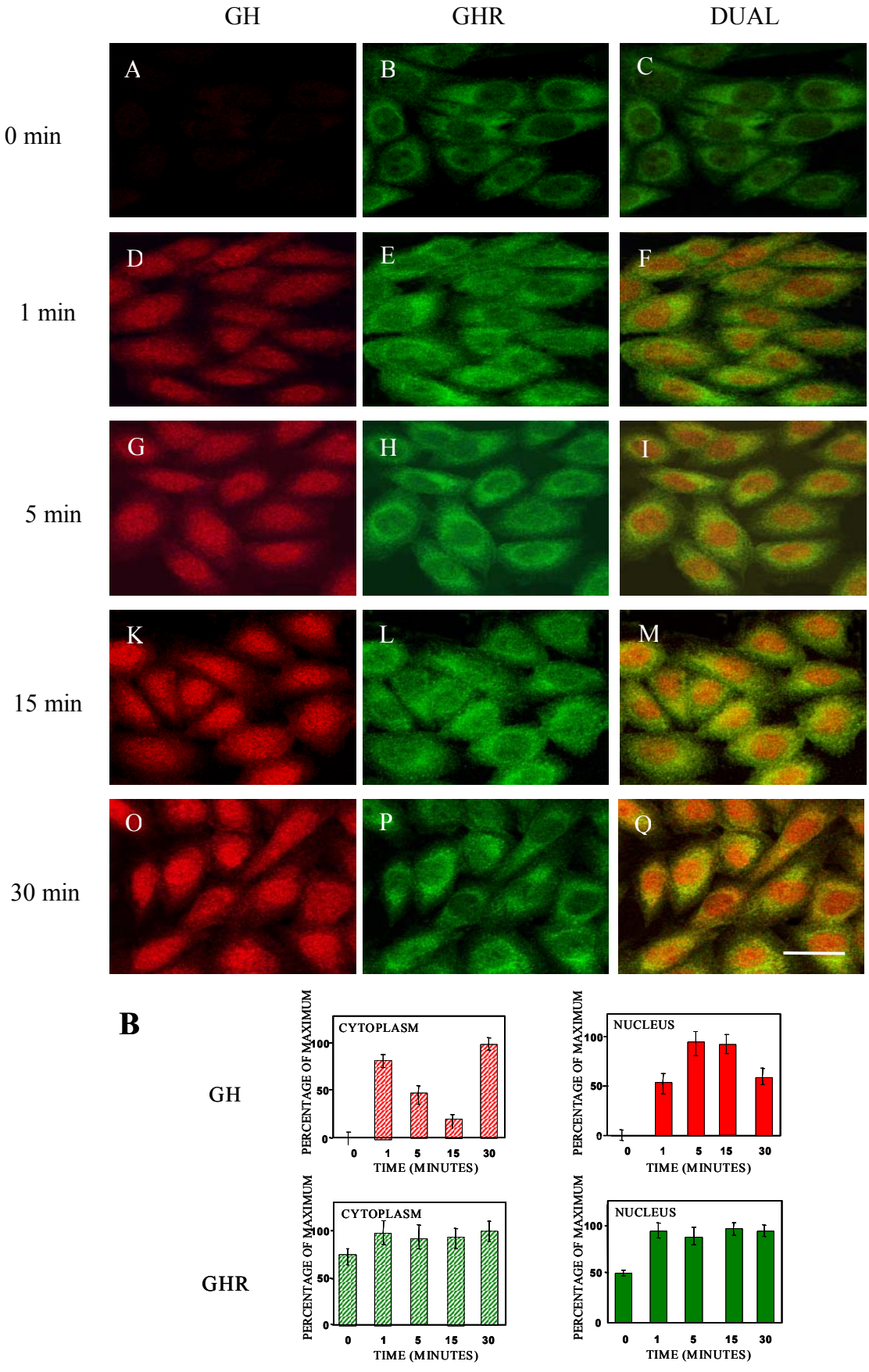
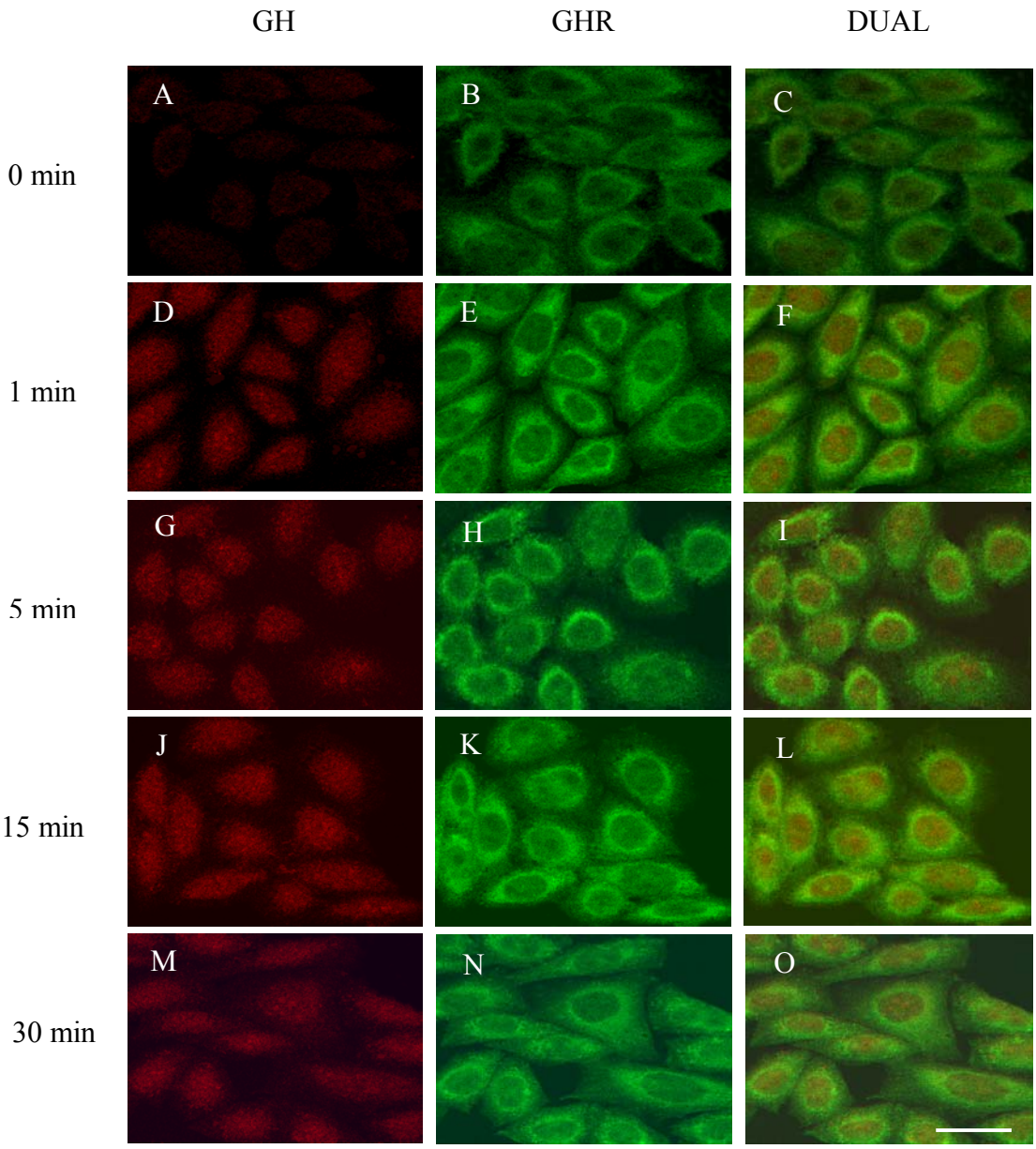

GH
GHR
DUAL
0 min
1 min
5 min
15 min
30 min
A
B
C
D
E
F
G
H
I
K
L
M
O
P
Q
B
GH
GHR
CYTOPLASM
NUCLEUS
PERCENTAGE OF MAXIMUM
TIME (MINUTES)
0
50
100
1
5
15
30

Figure 9


GH
GHR
DUAL
0 min
1 min
5 min
15 min
30 min
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O

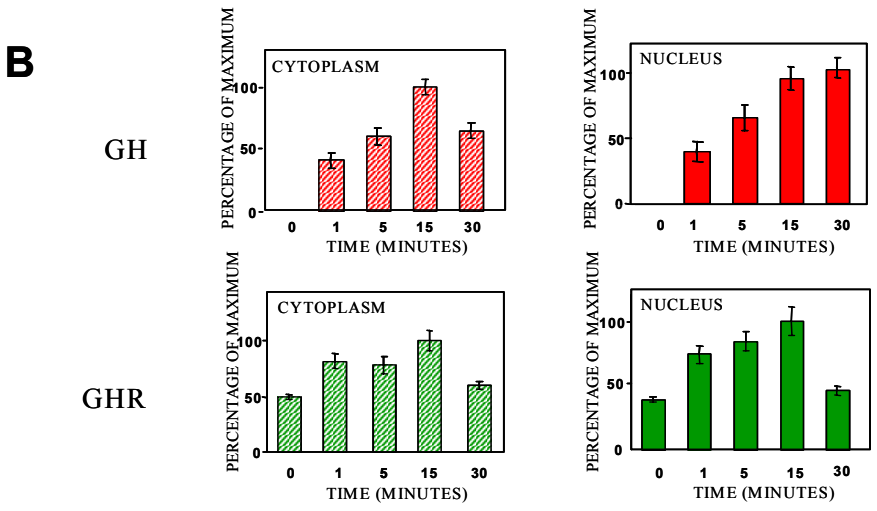

B
GH
GHR
CYTOPLASM
NUCLEUS
PERCENTAGE OF MAXIMUM
TIME (MINUTES)
0
50
100
0
1
5
15
30

Figure 10

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Polarographic analysis of CHO cells expressing the full-length GHR. The oxygen consumption of CHO-GHR_{1-638} cells was analyzed as a reference after 15 min 0, 50, 200 and 500 nM GH incubation as described in *Materials and Methods.* Control is corresponding to polarographic analysis performed on CHO-GHR_{1-638} without GH stimulation. This step allowed us to determine 200 nM rGH as the optimum concentration to obtain maximal oxygen consumption. The results are expressed as the mean of 3 experiments ± SEM and are normalized as a percentage of those obtained with the controls taken to represent 100% of maximal oxygen consumption.

Figure 2: Dual localization of intrinsic fluorescence of reduced pyridine nucleotides (NADH) visualized in blue with two-photon excitation CLSM and oxidized flavoproteins (FPs) visualized in green with one-photon excitation CLSM as described in *Materials and Methods* in CHO cells expressing the full-length GHR (GHR_{1-638}). Magnification bar is 30 µm.

Figure 3: Effect of 30 minutes exposure to GH on NADH autofluorescence in CHO cells expressing the full length GHR (CHO-GHR_{1-638}) (A), the GHR deleted of intracellular domain (CHO-GHR_{1-294}) (B), and in CHO cells expressing the GHR lacking the Box-1 region ($GHR_{\Delta 297-311}$) (C). The intrinsic fluorescence of NADH was visualized in the left hand column for the controls and in the right hand column for GH-stimulated CHO cells by two-photon excitation CLSM as described in *Materials and Methods*. *Magnification bar*, 30 µm for all photographs.

Figure 4: Quantitative analysis of changes in NADH autofluorescence intensity in CHO cells expressing (A) the full length GHR (CHO-GHR_{1-638}), (B) the GHR deleted of intracellular domain (CHO-GHR_{1-294}), (C) the GHR lacking the Box-1 region ($GHR_{\Delta 297-311}$), , (D) the C-terminally truncated GHR (GHR_{1-454}), and (E) the GHR construct with a point mutation of phenylalanine 346 (GHR_{F346A}). The intrinsic fluorescence of NADH was quantified after 0, 2, 5, 10, 15 and 30 min incubation with increasing GH concentrations of between 50 and 500 nM in each cell type as described in *Materials and Methods*. Data are expressed as the mean

of 3 experiments ± SEM. The results are normalized as a percentage of those obtained with the controls, which were taken to represent 100% of maximal signal intensity.

Figure 5: Effect of 30 minutes exposure to GH on FPs autofluorescence in CHO cells expressing (A) the full length GHR (CHO-GHR_{1-638}), (B) the GHR deleted of intracellular domain (CHO-GHR_{1-294}), and (C) the GHR lacking the Box-1 region ($GHR_{\Delta 297-311}$). The intrinsic fluorescence of FPs was visualized in the left hand column for the controls and in the right hand column for GH-stimulated CHO cells by one-photon excitation CLSM as described in *Materials and Methods*. *Magnification bar*, 30 µm for all photographs.

Figure 6: Quantitative analysis of changes in FPs autofluorescence intensity in CHO cells expressing (A) the full length GHR (CHO-GHR_{1-638}), (B) the GHR deleted of intracellular domain (CHO-GHR_{1-294}), (C) the GHR lacking the Box-1 region ($GHR_{\Delta 297-311}$), , (D) the C-terminally truncated GHR (GHR_{1-454}), and (E) the GHR construct with a point mutation of phenylalanine 346 (GHR_{F346A}). The intrinsic fluorescence of FPs was quantified after 0, 2, 5, 10, 15 and 30 min incubation with increasing GH concentrations of between 50 and 500 nM in each cell type as described in *Materials and Methods*. Data are expressed as the mean of 3 experiments ± SEM. The results are normalized as a percentage of those obtained with the controls, which were taken to represent 100% of maximal oxygen consumption.

Figure 7: (A) Kinetics of GH and GHR internalization and nuclear translocation in CHO cells expressing the GHR deleted of intracellular domain (CHO-GHR_{1-294}). CLSM analysis was performed at 0, 2, 5, 15 and 30 min after GH stimulation as described in *Materials and Methods*. The localization of GH is exposed in the left hand column, the GHR in the middle column and the dual localization (surimposed images) in the right hand column. *Magnification bar*, 30 µm for all photographs. (B) Quantitative analysis of GH and GHR internalization and nuclear translocation in CHO-GHR_{1-294} cells. GH and GHR immunoreactivities were quantified in cytoplasm and nucleus as described in *Materials and Methods*. Data are expressed as the mean of normalized values from 3 experiments ± SEM, and are considered significantly different from control at the 95% confidence level from 100% of maximal signal intensity.

Figure 8: Polarographic analysis of CHO cells expressing the GHR deleted of intracellular domain (CHO-GHR_{1-294}), the full length GHR (CHO-GHR_{1-638}), the C-terminally truncated GHR (GHR_{1-454}), the GHR lacking the Box-1 region ($GHR_{\Delta 297-311}$) and the GHR construct with a point mutation of phenylalanine 346 (GHR_{F346A}). 200 nM rGH was used for the incubation of all the cell types with the hormone and oxygen consumption was analyzed in the same conditions as in Figure 1. The results are expressed as the mean of 3 experiments ± SEM and are normalized as a percentage of those obtained with the controls taken to represent 100% of maximal oxygen consumption.

Figure 9: (A) Kinetics of GH and GHR internalization and nuclear translocation in CHO cells expressing a C-terminally truncated GHR (GHR_{1-454}). CLSM analysis was performed at 0, 2, 5, 15 and 30 min after GH stimulation as described in *Materials and Methods*. The localization of GH is exposed in the left hand column, the GHR in the middle column and the dual localization (surimposed images) in the right hand column. *Magnification bar*, 30 µm for all photographs. (B) Quantitative analysis of GH and GHR internalization and nuclear translocation in CHO-GHR_{1-454} cells. GH and GHR immunoreactivities were quantified in cytoplasm and nucleus as described in *Materials and Methods*. Data are expressed as the mean of normalized values from 3 experiments ± SEM, and are considered significantly different from control at the 95% confidence level from 100% of maximal signal intensity.

Figure 10: (A) Kinetics of GH and GHR internalization and nuclear translocation in CHO cells expressing a GHR construct with a point mutation of phenylalanine 346 (GHR_{F346A}). CSLM analysis was performed at 0, 2, 5, 15, 30 and 60 min after GH stimulation as described in *Materials and Methods*. The localization of GH is exposed in the left hand column, the GHR in the middle column and the dual localization (surimposed images) in the right hand column. *Magnification bar*, 30 µm for all photographs. (B) Quantitative analysis of GH and GHR internalization and nuclear translocation in CHO-GHR_{F346A} cells. GH and GHR immunoreactivities were quantified in cytoplasm and nucleus as described in *Materials and Methods*. Data are expressed as the mean of normalized values from 3 experiments ± SEM, and are considered significantly different from control at the 95% confidence level from 100% of maximal signal intensity.

DISCUSSION

Although many metabolic and biochemical dysfunction are well recognized among results of GH defect, progress in determining the underlying cause in mitochondrial activity has been difficult. Impairment of energy production within the cell, specifically via defective mitochondrial oxidative metabolism, has been proposed as a possible explanation for some GH-dependent metabolic alterations. Previous investigators have studied GH subcellular localization in hypophysectomized or GH-deficient rats and have attempted to correlate GH mitochondrial localization with an oxidative dysfunction (34, 35, 50, 51). Reports have suggested a GH-induced regulation in the mitochondrial oxidative function of liver cells from GH-treated hypophysectomized rats (28-30, 52), yet other studies have been unable to confirm any changes in hepatic mitochondrial respiration (31-33).

To determine the ways by which GH regulated the mitochondrial respiration through the interaction with its specific receptor, we have examined the ability of mutated and truncated GHRs to generate variation in NADH and FPs autofluorescences in rGH short-term exposed CHO cells. As exposed in *"Results"*, a decrease in NADH fluorescence expressed an increase in NADH-oxidized form which could result from an acceleration of respiratory chain activity or from a slowdown in NADH formation. In the same way, an increase in FAD fluorescence could result from an acceleration of mitochondrial respiration or from an increase in FPs amount covalently bound to FAD in mitochondria (48). It has long been admitted that NADH and FAD act simultaneously in response to stimuli suggesting their colocalization in a same compartment. Strikingly, observation of NADH and FAD autofluorescences codetection revealed distinctive distribution between the 2 cofactors. It was shown that the efficiency of oxidative phosphorylation depended on the nature of the respiratory substrates, which feed electrons to the respiratory chain at different levels (reviewed by 53). Moreover, it has already been proposed that cells could display a wide range of mitochondrial morphologies as well as heterogeneous mitochondrial functionalities, raising the possibility that subpopulations of these organelles could carry out diverse processes within different areas of a cell (54). The particular distribution we observed could confirm either the existence of 2 mitochondrial subpopulations using selectively one of them or according to the expected response, preferential use of NADH or FAD by mitochondria

(Figure 4) as it was suggested (55). In this last report, the authors predicted that hepatocytes could tolerate very different respiratory capacities according to cellular energy demand.

Simultaneously, to evaluate the respiratory state corresponding to NADH and FAD variation, we performed cell respiration using polarographic analysis. To determine the part played by the receptor observed by the variations of cofactors fluorescence, we studied the response to GH exposure of CHO cells expressing deleted or mutated GHR. The use of GHR deleted of its intracellular domain (GHR_{1-294}) expressed in CHO cells made it possible to demonstrate GHR implication in GH-stimulated cellular respiration. Really, as we suspected, the lack of intracellular domain does not induce any effect on oxygen consumption or NADH and FPs fluorescence.

Using CHO cells expressing the full-length GHR (GHR_{1-638}) and the C-terminally truncated GHR (GHR_{1-454}), we observed a decrease as early as 2 min in NADH autofluorescence but no change in FAD autofluorescence. Simultaneously, respiratory response to GH administration of these cells was rapidly increased. However, in CHO cells stably transfected with the box-1 deleted GHR cDNA ($GHR_{\Delta 297-311}$), no variation has been detected neither in NADH autofluorescence nor in oxidative capacity. Only the FPs fluorescence increased in response to GH. These results likely indicate box-1 implication in GH-stimulated cellular respiration mediated by NADH oxidation. The CHO-$GHR_{\Delta 297-311}$ was the only cell type to show a specific FPs autofluorescence increase, reinforcing the hypothesis that NADH and FAD could be differentially distributed according to their assigned role.

We postulated that GH could induce a stimulation of mitochondrial respiration resulting from GHR-dependent intracellular signalization and/or GH internalization. To elucidate the underlying mechanism, we needed to understand the role played by the receptor in the GH endocytic machinery. By studying CHO cells expressing the GHR construct devoid of box-1 region and intracellular domain (CHO-GHR_{1-294}), we observed an absence of GH internalization and GHR rearrangements, confirming the functional importance of GHR cytoplasmic region in GH endocytosis. The critical role for phenylalanine 346 residue (20) was also verified by the demonstration of a very weak internalization of the hormone and GHR down-regulation in CHO-GHR_{F346A} cells. As described by Govers *et al.* (19), GH/GHR complex was internalized in an ubiquitin-dependent manner by a way involving a DSWVEFIELD domain of the receptor (the UbE motif) in which the phenylalanine residue

at position 346 was critical (20). The UbE motif was required for efficient incorporation of GHR in clathrin-coated pits (56), so it was likely that mutation of phenylalanine 346 residue in alanine (GHR_{F346A}) disrupted the GHR clathrin-mediated endocytosis. A role for caveolae in GH internalization has been suggested by Lobie *et al.* (12) and the remaining presence of GH immunoreactivity observed during 30 min after GH exposure in CHO-GHR_{F346A} could result from this endocytic pathway. Caveolae present different functions according to their lipid and protein composition favoring many different functions dictated by the actual demand of the cell, for example the stage of growth, differentiation or transformation. These structures are well-known for their implication in processes such as intracellular signalization (57, 58 ~~56, 57~~), tumor progression (59, 60) and lipid (61) and protein transport (12, 62, 63). It was demonstrated for others cytokines, IFNγ (64, 65) and TGFβ (63, 66), existence of 2 distinct endocytic pathways, clathrin-coated pits and caveolae. However, the resurgence of studies focused on clathrin-independent endocytosis led to the identification of macropinocytosis, non-coated invaginations and lipids rafts which were as much endocytic tracks in mammalian cells likely to participate to GH internalization. Finally, we demonstrated that the C-terminally truncation of GHR (GHR_{1-454}), responsible for gene transcription (49) and intracellular free Ca^{2+} oscillations (8), responded to rGH in the same way that the full-length receptor (GHR_{1-638}). We already knew that Jak2 activity and/or tyrosine phosphorylation within the cell is not required for internalization and nuclear translocation of the hormone (13). Thus, we confirmed that GH endocytosis was independent of GHR domains integrity responsible for intracellular signalization.

In CHO-GHR_{F346A}, the increase in NADH fluorescence associated to the lack of FAD fluorescence variation and concomitantly to an inhibition of metabolic response to GH administration suggests the existence of a negative regulatory mechanism dependent on GHR and involving NADH reduction. We could then suspect an interaction between the signal transduction and internalization pathways in order to regulate GH action. As we just described, the punctual mutation of phenylalanine 346 prevents normal GH internalization via clathrin-coated pits. However, GH could enter in the cell via caveolae pathway since a residual internalization was detected during the first 30 minutes using immunofluorescence analysis by CLSM. Caveolae are suspected to transport GH to subcellular compartments such as the nucleus and mitochondria (12).

This study clearly shows that the different GHR domains contribute to different events. First, the lack of total intracellular domain can not induce any internalization or signal

transduction which implies no effect on the cellular respiratory state. Second, internalization and signal transduction are independent events concerning their initiation: the cells expressing the GHR lacking the box-1 region are unable to induce any signal transduction translating no effect on respiration through NADH oxidation, but internalize normally the GH-GHR_2 complex (13). Third, the GHR C-terminal region (residues 455 to 638) seems to be implicated only partially in respiration GH effect since its deletion has poor effect on NADH oxidation en global respiration. This deletion does no more disrupt internalization, demonstrating that this domain is not involved in endocytosis. Fourth, the UbE motif is clearly involved in GH-GHR_2 internalization. The cells that expressed the GHR present the punctual mutation of the phenylalanine 346 residue showed a perturbation in their respiratory state, suggesting the implication of the internalization phenomenon in the regulation of GH effects.

In conclusion, we have demonstrated that GH stimulates cellular oxygen consumption through GHR signaling pathway involving box-1 region via NADH oxidation and that this stimulation is negatively regulated by clathrin-coated pits disruption.

REFERENCES

1. **Finidori J, Kelly PA** 1995 Cytokine receptor signalling through two novel families of transducer molecules: Janus kinases, and signal transducers and activators of transcription. J Endocrinol 147: 11-23

2. **Frank SJ, Gilliland G, Kraft AS, Arnold CS** 1994 Interaction of the growth hormone receptor cytoplasmic domain with the JAK2 tyrosine kinase. Endocrinology 135: 2228-2239

3. **Vanderkuur JA, Wang X, Zhang L, Cambell 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

4. **Carter-Su C, Smit LS** 1998 Signaling via JAK tyrosine kinases: growth hormone receptor as a model system. Recent Prog Horm Res 53: 61-83

5. **Kelly PA, Ali S, Rozakis M, Goujon M, Nagano M, Pellegrini l. Gould D, Djiane J, Edery M, Finidori J, Postel-Vinay MC** 1993 The growth hormone/prolactin receptor family. Recent Prog Horm Res48: 123-164

6. **Goujon L, Allevato G, Simonin G, Paquereau L, Le Cam A, Clark ., Nielsen JH, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M, Kelly PA** 1994 Cytoplasmic sequences of the growth hormone receptor necessary for signal transduction. Proc Natl Acad Sci USA 91: 957-961

7. **SotiropoulosA, Perrot-Applanat 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: 1292-8

8. **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

9. **Murphy LJ, Lazarus L** 1984 The mouse fibroblast growth hormone receptor: ligand processing and receptor modulation and turnover. Endocrinology 115: 1625-1632

10. **Roupas P, Herington AC** 1988 Intracellular processing of growth hormone receptors by adipocytes in primary culture. Mol Cell Endocrinol 57: 93-99

11. **Roupas P, Herington AC** 1989 Cellular mechanisms in the processing of growth hormone and its receptor. Mol Cell Endocrinol 61: 1-12

12. **Lobie PE, Sadir R, Graichen R, Mertani HC, Morel G** 1999 Caveolar internalization of growth hormone. Exp Cell Res 246: 47-55

13. **Mertani HC, Raccurt M, Abbate A, Kindblom J, Tornell J, Billestrup N, Usson Y, Morel G, Lobie PE** 2003 Nuclear translocation and retention of growth hormone. Endocrinology 144: 3182-3195

14. **Govers R, van Kerkhof P, Schwartz AL, Strous GJ** 1997 Linkage of the ubiquitin-conjugating system and the endocytic pathway in ligand-induced internalization of the growth hormone receptor.. EMBO J 16: 4851-4858

15. **van Kerkhof P, Govers R, Alves dos Santos CM, Strous GJ** 2000 Endocytosis and degradation of the growth hormone receptor are proteasome-dependent. J Biol Chem 275: 1575-1580

16. **van Kerkhof P, Sachse M, Klumperman J, Strous** GJ 2001 Growth hormone receptor ubiquitination coincides with recruitment to clathrin-coated membrane domains. J Biol Chem 276: 3778-3784

17. **van Kerkhof P, Smeets M, Strous GJ** 2002 The ubiquitin-proteasome pathway regulates the availability of the GH receptor. Endocrinology 143: 1243-1252

18. **Gent J, van Kerkhof P, Roza M, Bu G, Strous GJ** 2002 Ligand-independent growth hormone receptor dimerization occurs in the endoplasmic reticulum and is required for ubiquitin system-dependent endocytosis. Proc Natl Acad Sci USA 99: 9858-9863

19. **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

20. **Allevato G, Billestrup N, Goujon L, Galsgaard ED, Norstedt G, Postel-Vinay MC, Kelly PA, Nielsen JH** 1995 Identification of phenylalanine 346 in the rat growth hormone receptor as being critical for ligand-mediated internalization and down-regulation. J Biol Chem 270: 17210-17214

21. **Alves dos Santos CM, ten Broeke T, Strous GJ** 2001 Growth hormone receptor ubiquitination, endocytosis, and degradation are independent of signal transduction via Janus kinase 2. J Biol Chem 276: 32635-32641

22. **Henneman PH** 1968 The effect of human growth hormone on growth of patients with hypopituitarism. A combined study. JAMA 205: 828-836

23. **Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA** 1982 Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. Science 216: 1237-1239

24. **Altszuler N, Rathgeb I, Winkler B, De Bodo RC, Steele R** 1968 The effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism in the dog. Ann N Y Acad Sci 148: 441-458

25. **Winkler B, Steele R, Altszuler N** 1969 Effects of growth hormone administration on free fatty acid and glycerol turnover in the normal dog. Endocrinology 85: 25-30

26. **Davidson MB** 1987 Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. Endocr Rev 8: 115-131

27. **Dudley GA, Portanova R** 1987 Histochemical characteristics of soleus muscle in hGH transgenic mice. Proc Soc Exp Biol Med 185: 403-408

28. **Katkocin DM, Gupta KM, Collipp PJ, Maddaiah VT** 1979 Effects of growth hormone on respiration and ATPase activity of rat liver and heart mitochondria. Biochem Med 22: 134-144

29. **Clejan S, Collipp PJ, Maddaiah VT** 1980 Hormones and liver mitochondria: influence of growth hormone, thyroxine, testosterone, and insulin on thermotropic effects of respiration and fatty acid composition of membranes. Arch Biochem Biophys 203: 744-752

30. **Maddaiah VT, Clejan S** 1986 Growth hormone and liver mitochondria: time course of effects on respiration and fatty acid composition in hypophysectomized rats. Endocrinology 119: 250-252

31. **Postel-Vinay MC, Kayser C, Desbuquois B** 1982 Fate of injected human growth hormone in the female rat liver in vivo. Endocrinology 111: 244-51

32. **Mutvei A, Husman B, Andersson G, Nelson BD** 1989 Thyroid hormone and not growth hormone is the principle regulator of mammalian mitochondrial biogenesis. Acta Endocrinol (Copenh.) 121: 23-228

33. **Peyreigne C, Raynaud E, Fedou C, Prefaut C, Brun JF, Mercier J** 2002 Does growth hormone treatment alter skeletal muscle mitochondrial respiration in rats? Horm Res 58: 287-291

34. **Lobie PE, Mertani H, Morel G, Morales-Bustos O, Norstedt G, Waters MJ** 1994 Receptor-mediated nuclear translocation of growth hormone. J Biol Chem 269: 21330-21339

35. **Mertani HC, Waters MJ, and Morel G** 1996 Cellular trafficking of exogenous growth hormone in dwarf rat pituitary. Neuroendocrinology 63: 257-268

36. **Billestrup N, Møldrup A, Serup P, Mathews LS, Norstedt G, Nielsen JH** 1990 Introduction of exogenous growth hormone receptors augments growth hormone-responsive insulin biosynthesis in rat insulinoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 87: 7210-7214

37. **Møldrup A, Allevato G, Dyrberg T, Nielsen JH, Billestrup N** 1991 Growth hormone action in rat insulinoma cells expressing truncated growth hormone receptors. J Biol Chem 266: 17441-17445

38. **Möller C, Hansson A, Enberg B, Lobie PE, Norstedt G** 1992 Growth hormone (GH) induction of tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in cells transfected with rat GH receptor cDNA. Biol Chem 267: 23403-23408

39. **Villani G, Attardi G** 1997 In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in wild-type and mitochondrial DNA mutation-carrying human cells. Proc Natl Acad Sci USA 94: 1166-1171

40. **Balaban RS, Mandel LJ** 1990 *In* Non invasive Techniques in Cell Biology. J.K. Foskett and S. Grinstein, editors. Wiley-Liss, New York. pp213-236.

41. **Chance B** 1991 Optical method. Annu Rev Biophys Biophys Chem 20: 1-28

42. **Masters BR, Chance B** 1993 Redox confocal imaging: intrinsic fluorescent probes of cellular metabolism. In Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity. W.T. Mason, editor. Academic Press, New York. pp44-57

43. **Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, Kay L, Sikk P, Tiivel T, Tranqui L, Olivares J, Winkler K, Wiedemann F, Kunz WS** 1998 Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. Mol Cell Biochem 184: 81-100

44. **Denk W, Strickler JH, Webb** WW 1990 Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. Science 248: 73-76

45. **Denk W, Piston DW, Webb WW** 1995 Two-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy. In Handbook of Biological Confocal Microscopy. J.B. Pawley, editor. Plenum Publishing, New York, pp445-458

46. **Xu C, Webb WW** 1997 Multiphoton excitation of molecular fluorophores and non-linear laser microscopy *In* Topics in fluorescence Spectroscopy, vol 5. J.R. Lakowics, editor. Plenum Press, New York, pp471-540

47. **Usson Y** 2001 The two-photon microscope, In Imaging of Nucleic Acids and Quantitation in Photonic Microscopy, Eds X. Ronot & Y. Usson, CRC-Press, pp80-84

48. **Huang S, Heikal AA, Webb WW** 2002 Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. Biophys J 82: 2811-2825

49. **Sotiropoulos A, Moutoussamy S, Renaudie F, Clauss M, Kayser C, Gouilleux F, Kelly PA, Finidori J** 1996 Differential activation of Stat3 and Stat5 by distinct regions of the growth hormone receptor. Mol Endocrinol 10: 998-1009

50. **Maddaiah VT, Rezvani I, Chen SY, Collipp PJ** 1970 Distribution of 3 H-acetyl human growth hormone in subcellular fractions of rat liver. Biochem Med 4: 492-499

51. **Groves WE, Houts GE, Bayse GS** 1972 Subcellular distribution of 125 I-labeled bovine growth hormone in rat liver and kidney. Biochim Biophys Acta 264: 472-480

52. **Maddaiah VT, Clejan S, Palekar AG, Collipp PJ** 1981 Hormones and liver mitochondria: effects of growth hormone and thyroxine on respiration, fluorescence of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate and enzyme activities of complex I and II of submitochondrial particles. Arch Biochem Biophys 210: 666-677

53. **Leverve XM, Fontaine E** 2001 Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ. IUBMB Life. 52:221-9

54. **Collins TJ, Bootman MD** 2003 Mitochondria are morphologically heterogeneous within cells. J Exp Biol 206:1993-2000

55. **Nogueira V, Rigoulet M, Piquet MA, Devin A, Fontaine E, Leverve XM** 2001 Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. J Biol Chem 276(49):46104-10

56. **Strous GI, Govers R** 1999 The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. J Cell Sci 112: 1417-1423

57. **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

58. **Xiang Y, Rybin VO, Steinberg SF, Kobilka B** 2002 Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. J Biol Chem 277: 34280-34286

59. **Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP** 1999 Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. Mol Cell Biol 19: 7289-7304

60. **Fiucci G, Ravid D, Reich R, Liscovitch M** 2002 Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. Oncogene 21: 2365-2375

61. **Fielding CJ, Fielding PE** 2001 Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. Adv Drug Deli. Rev 49: 251-264

62. **Pelkmans L, Helenius** A 2002 Endocytosis via caveolae. Traffic 3: 311-320

63. **Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL** 2003 Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. Nat Cell Biol 5: 410-421

64. **Sadir R, Lambert A, Lortat-Jacob H, Morel G** 2001 Caveolae and clathrin-coated vesicles: two possible internalization pathways for IFN-gamma and IFN-gamma receptor. Cytokine 14: 19-26

65. **Subramaniam PS, Johnson HM** 2002 Lipid microdomains are required sites for the selective endocytosis and nuclear translocation of IFN-gamma, its receptor chain IFN-gamma receptor-1, and the phosphorylation and nuclear translocation of STAT1alpha. J Immunol 169: 1959-1969

66. **Felberbaum-Corti M, Van Der Goot FG, Gruenberg J** 2003 Sliding doors: clathrin-coated pits or caveolae? Nat Cell Biol 5: 382-384

FOOTNOTES

Abbreviations: CHO, Chinese hamster ovary, CLSM, Confocal laser scanning microscopy; FPs, Flavoproteins; rGH, rat growth hormone; GHR, GH receptor; NADH, reduced pyridine nucleotides; TPE, two-photon excitation.

Acknowledgments. This study was supported by a grant from “La Région Rhône-Alpes (Emergence 2002)”.

II. Rôle de la cavéoline-1 dans le transport de la GH vers la mitochondrie

La GH agit sur ses tissus-cibles par interaction avec le GHR présent sur la membrane cellulaire de façon à délivrer le signal (Zhu *et al*., 2001) conduisant aux effets cellulaires. Une autre conséquence de la liaison de l'hormone à son récepteur est l'internalisation du complexe (Roupas et Herrington, 1988, 1989). L'accumulation de [^{125}I]-hGH a été montrée *in vivo* au niveau du foie, son principal tissu-cible, dans les compartiments de dégradation tels que les les lysosomes, mais également au niveau de l'appareil de Golgi, du noyau (Lobie *et al*., 1994) et de la mitochondrie (Maddaiah *et al*., 1970 ; Groves *et al*., 1972 ; Lobie *et al*., 1994). L'hormone a également été détectée dans les mitochondries des cellules hypophysaires (Mertani *et al*., 1996). Ces résultats suggèrent une endocytose conventionnelle par la voie des vésicules à clathrine pour initier la dégradation lysosomale (Eshet *et al*., 1984), mais la présence de la GH dans un compartiment tel que la mitochondrie suggère une voie d'internalisation non dégradative. Dans ce sens, nous avons proposé l'implication de la voie des cavéoles qui avait déjà été mise en évidence pour l'internalisation du complexe hormone-récepteur dans des cellules CHO stimulées par la GH exprimant le GHR entier (Lobie *et al.*, 1999). De plus, la cavéoline-1, considérée comme le marqueur principal des cavéoles (Rothberg *et al*., 1992), a été détectée au niveau du foie (Pol *et al*., 1998 ; Calvo et Enrich, 2000) et de la mitochondrie (Li *et al*., 2001).

Nous avons donc entrepris l'étude du rôle joué par la cavéoline-1 dans le transport de la GH jusqu'à la mitochondrie. Tout d'abord nous avons réalisé une étude morphologique sur des coupes de foie de rat obtenues par cryo-ultramicrotomie afin de préserver les sites antigéniques puis sur des fractions mitochondriales de foie de rat hautement purifiées incluses en résine LR-White. Cette première étape nous a permis de montrer par microscopie électronique la présence de colocalisations de la GH et du GHR avec la cavéoline-1 au niveau de l'espace de Disse, du cytoplasme, à la surface et à l'intérieur des mitochondries avec notamment près ces dernières, l'observation de structures vésiculaires associées au marquage de la cavéoline-1.

Dans un second temps, nous avons réalisé une analyse biochimique par western blot de la présence de la cavéoline-1 au niveau de fractions de foie de rat, de mitochondries de foie de rat et de fractions membranaires mitochondriales (externe, interne et points de contact). Une bande correspondant au poids moléculaire de la cavéoline-1 (environ 21-24 kDa) a été détectée dans tous ces échantillons, confirmant les résultats obtenus en

microscopie électronique. La présence de la cavéoline-1 dans la mitochondrie associée à la GH indique l'implication de la voie des cavéoles dans le transport de l'hormone à l'organite.

Dans un troisième temps, nous avons voulu savoir si l'hormone jouait un rôle dans la fonction mitochondriale en étudiant la consommation d'oxygène des cellules CHO exprimant le GHR entier par oxygraphie. Suite à une stimulation par la GH, la consommation d'oxygène des cellules a été augmentée. Nous avons également cherché à savoir s'il existait une régulation de la transduction du signal induisant les effets stimulateurs respiratoires de la GH par la voie d'internalisation. La voie des cavéoles de ces cellules CHO a alors été bloquée en utilisant une drogue perturbant le cholestérol membranaire et l'analyse par oxygraphie n'a montré aucune stimulation de la consommation d'oxygène en réponse à la GH.

Ces résultats suggèrent l'implication de la cavéoline-1 dans l'acheminement de la GH à la mitochondrie. La GH exerce un véritable rôle stimulateur de la respiration cellulaire. De plus, il existe une interaction entre l'internalisation par la voie des cavéoles et la transduction du signal : la cavéole et/la cavéoline-1 régulent positivement la respiration cellulaire globale.

CAVEOLIN-1 IMPLICATION FOR GH-GHR EVIDENCE IN MITOCHONDRIA

Cécile Vivancos, Aude Abbate, Dominique Ardail*, Peter E. Lobie** and Gérard Morel.

CNRS UMR 5123, Bât. R. Dubois, 3ème étage, Université Claude Bernard-Lyon 1,
43 Bd. du 11 Novembre 1918, F69622 Villeurbanne cedex, France.

*INSERM U189 - Faculté de médecine Lyon Sud, 69921 Oullins cedex, France.

**Liggins Institute, University of Aukland, 2-6 Park Avenue, Private Bag, Aukland, New Zeland 92019, Nouvelle-Zélande

Address for correspondence
Dr. Gérard Morel
CNRS UMR 5123, Bât. R. Dubois, 3ème étage, Université Claude Bernard-Lyon 1,
43 Bd. du 11 Novembre 1918, F69622 Villeurbanne cedex, France
Phone/Fax: (33) 4 72 43 29 27
E-mail: gerard.morel@univ-lyon1.fr

ABSTRACT

Growth hormone is internalized into the cell by a receptor-mediated process, providing the signal to generate biological responses. It is now well established that the complex is internalized by the clathrin coated pits to be degraded in the lysosomes and to allow GHR turnover. But caveolae pathway was suggested to intervene in the complex internalization in CHO transfected cells. We focused on GH entry into the cell via the caveolae pathway in the main GH target tissue, liver. Once in the cell, GH is found in many cellular compartments, including mitochondria. We show by immunogold electron microscopy on rat liver frozen sections and on rat liver mitochondrial fractions that GH and GHR associated to caveolin-1 are present at the surface and within mitochondria. Moreover, by Western Blot method, we confirmed caveolin-1 presence in liver, liver mitochondria, inner, outer and contact sites of mitochondrial membranes. These findings led us to hypothesize that the GH-GHR_2 complex could enter in mitochondria through the mitochondrial membranes contact sites associated to caveolin-1 which is embedded in a lipid particle. In the same time we examined internalization role in GH signal transduction. GH stimulation of CHO cells expressing the full length GHR shows an increase of oxygen consumption, but if the caveolae pathway was disrupted, no modification was detected.

These results clearly show that GH and GHR are routed to liver mitochondria via caveolae and that this mean of transport interact with signal transduction in order to modulate cellular oxygen consumption.

Key words: caveolin-1, growth hormone, growth hormone receptor, internalization, mitochondrion, respiration, electron microscopy.

INTRODUCTION

Growth hormone (GH) operates on its target cells by binding to a cell surface receptor (GHR) (1). One molecule of GH interacts with the extracellular domain of two receptors leading to receptor homodimerisation (GH-GHR_2) (2), thus providing the signal to generate biological responses (3, 4). Two processes occur as consequences of this dimerization phenomenon: signal transduction pathways (5) and internalization of the GH-GHR_2 complex (6, 7). Accumulation of GH in mitochondria has been shown in vivo in the liver (8, 9, 10) and pituitary (11), suggesting a functional significance for the hormone by direct interaction with the organelle (8, 9). GHR immunoreactivity has also been shown in mitochondria somatotrophs (12). At the sight of these findings, one could expect the existence of a specific transport for the GH-GHR_2 complex towards this particular subcellular compartment. In addition to clathrin-coated pits for conventional GH endocytosis (13), caveolae pathway was put forward in a model of GHR-transfected cells (14) for GH internalization and intracellular trafficking.

Caveolae are thought of as a subset of membranes entities known as lipid rafts (15). Lipid rafts form via a coalescence of cholesterol and sphingolipids which imparts a more rigid "liquid-ordered" assembly. They function to organize the plasma membrane into a series of microdomains that act as platforms for conducting many cellular functions (16). They present the unusual distinction of being resistant to solubilization by mild nonionic detergents such as Triton-X-100 at 4°C. What distinguishes caveolae as a specialized form of lipid raft, is the selective association with a key structural and functional membrane protein, caveolin, which is a cytoplasmically oriented integral protein. It belongs to a three-protein caveolin family which gene was sequenced by Glenney (17). Caveolin-1 appears to be the major protein in many cell types (18). Certain populations of caveolae invaginations can detach from the plasma membrane to form discrete caveolae within the cytoplasm (19), affording the potential to mediate the vesicular transport of both low molecular weight solutes and macromolecules. Recently, caveolin-1 has been identified in liver subcellular fractions (20, 21).

Besides, Li et al. (22) found caveolin-1 in mitochondria, since neither GH, nor its receptor expressed any known mitochondrial targeting sequence, we hypothesized the role of caveolae for mitochondrial import. Simultaneously, we performed polarographic experiment on CHO cells expressing the full length GHR (CHO-GHR_{1-638}) incubated or not with GH. We found that GH stimulated the CHO cells oxygen consumption compared to control. In

contrast, when the caveolae pathway was disrupted with β-methylcyclodextrin, a cholesterol-depleting drug, GH could no more exert its effect on respiratory metabolism.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Recombinant rat GH (rGH) was a gift from the National Hormone and Pituitary Program (NHPP, Harbour-UCLA Medical Center, Torrance, CA, USA). Reagents for cell culture were purchased from Eurobio (Les Ulis, France). Adult male Wistar rats (250 g) were from Iffa Credo (L'Arbresle, France). Prestained molecular weight markers were obtained from BioRad (Ivry sur Seine, France). Hybond-P PVDF membrane, ECL plus Western Blotting Detection System were purshased from Amersham Biosciences Europe, GmbH (Orsay, France). β-methycyclodextrin was purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France).

The polyclonal IgG raised against rat caveolin-1 was from Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA), and polyclonal IgG raised in guinea-pig against rGH was a gift from the National Hormone and Pituitary Program (NHPP, Harbour-UCLA Medical Center, Torrance, CA, USA). Monoclonal Mouse antibody against GH receptor (mAb 263) was a gift from M.J. Waters. Rabbit IgG against guinea-pig IgG were obtained from DAKO (Copenhaguen, Netherlands). Goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase was purchased from Amersham Biosciences Europe GmbH (Orsay, France).

Cellular transfection of GH receptor cDNA

Rat GH receptor cDNA was cloned into an expression plasmid containing an SV40 enhancer and a human metallothionein IIa promoter. The cDNA was transfected into Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cells with lipofectin together with the pIPB-1 plasmid, which contains a neomycin resistance gene fused to the thymidine kinase promoter (23). Stable transfected cells were selected using 1 mg/ml G418. The complete rat GH receptor cDNA (24) coding for amino acids 1-638 was expressed in CHO4-638 or CHOA-638 (23), and will be referred to as CHO-GHR_{1-638} (23).

Preparation of liver mitochondrial fraction

Rat liver mitochondria were prepared as previously described (25). Briefly, livers were immersed in ice-cold isolation medium (250 mM sucrose, 10 mM Hepes buffer, pH 7.4, 1 mM EDTA). Mitochondria were prepared by differential centrifugations and extensively washed in isolation medium before purification. The integrity of isolated mitochondria was determined polarographically with a Clark-type oxygen electrode. The respiratory control

(state 3/state 4 respiration) ratios of different liver mitochondrial preparations were in the ranges of 5.5-6.5. Crude mitochondria were purified by layering on top of 20 ml of medium containing 25 mM Hepes buffer, pH 7.4, 225 mM mannitol, 1 mM EDTA, 1% BSA and 30% Percoll. Gradients were centrifuged for 30 minutes at 95,000 *g* as previously reported (26) after which a dense band containing purified mitochondria was recovered from approximately 2/3 down the tube. Purified mitochondria were removed from the gradient and extensively washed in the isolation medium in order to remove Percoll.

Preparation of submitochondrial fractions and contact site-enriched fractions

Outer mitochondrial membranes were prepared by a swelling procedure as described (25). Inner mitochondrial membranes were obtained from the remaining mitoplasts after an other swelling procedure and the two preparations were further layered on two distinct 38 ml discontinuous sucrose gradients and centrifuged for 20 hours at +4°C (25). Subsequently, the gradients were collected as 1 ml fractions, washed in the isolation medium and assayed for marker enzyme activities before use.

Marker enzyme activities

The determination of monoamine oxidase (a marker for outer mitochondrial membranes), cytochrome c oxidase (a marker for inner mitochondrial membranes) and NADPH cytochrome c reductase (a marker for microsomes) were carried out as in Ardail et al. (27). Galactosyltransferase activity (a marker for Golgi membranes) was determined as described in reference 26.

Electron microscopic preparations

Liver ultrathin frozen sections

After rat decapitation, liver was quickly removed and fixed in 4% paraformaldehyde as small pieces during 2 hours at room temperature. Samples were cryoprotected in 0.4 M sucrose phosphate buffer solution for 2 hours at room temperature, and frozen in a cold gradient of fuming nitrogen (Biogel, CFPO, Saint Priest, France) to –6 C. Samples were then immersed in liquid nitrogen (28). Ultrathin frozen sections of 80 nm thickness were obtained using a dry sectioning method at –120 C with an ultracut S microtome (Leica, Vienna, Austria). All sections were mounted on 400 mesh collodion-carbon-coated nickel grids.

Liver mitochondria fraction

Purified mitochondria were centrifuged at 8500 *g* and the pellet was washed twice in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 at 4°C. Then, the pellet was cut into small pieces and fixed for 30 minutes at room temperature in 4% paraformaldehyde-0.1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Samples were washed 3 times 10 minutes in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. They were then dehydrated successively by 15 minutes incubation with 30%, 50%, 70% and 95% alcohol. They were progressively embedded at room temperature in increasing mixture of LR-White (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)/alcohol 95%: 3 baths of 60 minutes with the mixture LR-White/alcohol (1:2, 1:1 and 2:1, respectively). Finally, they were embedded in pure resin for 90 minutes. Polymerisation was performed in gelatin capsules at 60C for 24 hours. Ultrathin sections of 80 nm were obtained using an Ultracut S (Leica, Vienna, Austria) and transferred on 200 mesh collodion-carbon-coated nickel grids.

Immunocytological reactions

For cryo-immunogold electron microscopy (14, 29), localization of GH, GHR and caveolin-1 were performed using respectively an anti-rGH (1/1000), mAb 263 (1/1000) and anti-caveolin-1 (1/400) sera, in 0.1 M phosphate buffer, 0.3 M NaCl, 0.5% BSA, pH 7.4). They were revealed by an anti-guinea pig IgG, an anti-mouse IgG conjugated with 10 nm gold particles and with an anti-rabbit IgG conjugated with 5 nm gold particles, respectively. Immunogold reagents were used at 1/50 in 20 mM Tris, 0.3 M NaCl, 0.5% BSA, pH 8.2. Concomitantly, co-immunodetection of GH and caveolin-1 or GHR and caveolin-1 were performed. The contrast was realized by incubation in 3% uranyle acetate pH 7 during 10 minutes and sections were then embedded in methylcellulose.

For localization of the same proteins on mitochondria fractions embedded in LR-White resin, the same antibodies were used but at different dilutions: anti-rGH (1/500), mAb 263 (1/500) and anti-caveolin-1 (1/200). Dilution buffers were supplemented by 0.05% Tween 20 and contrast was performed using 4% uranyle acetate pH 7 for 30 minutes at room temperature.

Electron micrographs were taken with a Philips CM120 electron microscope, operating at 80kV (Centre Technologique des Microstructures, Villeurbanne, France).

Western blotting

Samples were diluted in 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) containing 90% (vol/vol) glycerol, 0.05% bromophenol blue, 3% (wt/vol) SDS. Protein weight marker, rGH standard and protein concentrates were denatured at 95 C for 5 minutes with DTT and loaded onto a discontinuous polyacrylamide gel with a 4% acrylamide stacking gel and a 15% resolving gel. Each gel was run for 1 h with a constant current of 40 mA per gel. After SDS/PAGE, proteins were blotted onto Hybond-P membranes (Amersham Biosciences Europe, GmbH) at 4°C for 1 hour using a Bio-Rad transblotting apparatus at 200 mA. The membrane was incubated with 5% (wt/vol) fat-free milk in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% (wt/vol) Tween-20, pH 7.3 (TBST) at room temperature during 1 hour. An affinity-purified polyclonal antibody raised in guinea-pig against rGH was used at 1:1000 in TBST with 5% (wt/vol) fat free milk overnight at 4 C. Then the membrane was washed four times in TBST (5 minutes per wash). Second antibody, rabbit anti-guinea-pig IgG (1:10000 in blocking solution), was incubated with membrane at room temperature for 90 minutes. Third antibody, goat anti-rabbit coupled to horseradish peroxidase (1:10,000 in blocking solution), was incubated with membrane at room temperature for 90 minutes. Membrane was then washed 4 times in TBST. Bound antibody was detected using an ECL detection system (Amersham Biosciences Europe, GmbH).

Polarographic analysis of CHO cells respiratory activity

Exponentially growing CHO cells were incubated in serum-free medium for 12 hours and incubated or not with 3mM methyl-β-cyclodextrin in PBS for 1 hour at 37 C. All cells were then washed twice in ice-cold PBS. The cells were harvested in Tris-based, Mg^{2+}-, Ca^{2+}-deficient (TD) buffer (0.137 M NaCl/5 mM KCl/0.7 mM Na_2HPO_4/25 mM Tris-HCl, pH 7.4 at 4°C), spun and resuspended in ice-cold TD buffer after removing the supernatant (30). The concentration of cellular proteins was quantified with Bio-Rad protein assay (500-0113; with BSA as standard) and adjusted to a final concentration of 10 mg/ml. Rates of oxygen consumption were measured with a Clarck-type oxygen electrode, model DW1 from Hansatech Instruments Laboratories (Norfolk, U.K.). The chamber, thermostatically controlled at 37 ± 2 C, was filled with 1.8 ml of respiratory medium (corresponding to TD buffer pH 7.4) saturated with room air. 4.5 mg cellular protein in 1.8 ml TD buffer were added to the cell and incubated for 15 minutes with 200 nM rGH under constant stirring. Control was performed in the same conditions without rGH. The electrode was calibrated with demineralized water and TD buffer at 37 C based on the oxygen content of water (31).

Statistics

All data are expressed as mean ± SEM. Data were analyzed using the two tailed t-test. Results were considered significant at the 5% level.

RESULTS

Localization of caveolin-1, GH and GHR on liver frozen sections

Caveolin-1 was localized on rat liver ultrathin frozen sections by immunogold electron microscopy (Figure 1). Specificity of the immunocytological reactions was assessed by omission of the primary antibodies or by pre-incubation of the antibodies with the corresponding antigen (Figure 1C). Caveolin-1 was firstly localized on the membrane of the space of Disse, then in cytoplasm (Figure 1A), at the periphery and in mitochondria (Figure 1, A and B). Some caveolae vesicles were detectable close to the outer mitochondrial membrane (white arrows, Figure 1, A and B). By Western Blot analysis on rat liver and mitochondrial fractions, a protein band between 20 kDa and 30 kDa was put in evidence (Figure 2A). It corresponds to caveolin-1 molecular weight (21-25 kDa). GH was detected in cytoplasm, in endoplasmic reticulum, near and in mitochondria (Figure 3A) and also at the surface of a blood vessel epithelium (Figure 3B).

Colocalization of GH and caveolin-1, 10 and 5 nm gold particles respectively, was observed in the Disse's space (Figure 4A), in cytoplasm compartment and within mitochondria (Figure 4B). GHR and caveolin-1 were also co-immunodetected near (Figure 5A), and in mitochondria (Figure 5, B and C).

Localisation of caveolin-1, GH and GHR in mitochondrial fraction

As a prerequisite, contamination of mitochondrial fractions was estimated by measuring the content of marker enzymes respectively characteristic of microsomes and Golgi. As shown in Table I, the level of contamination of mitochondrial fractions was very low which allowed us to consider our submitochondrial fractions as suitable for further localization studies. Western Blot analysis (Figure 2C) revealed the presence of Caveolin-1 in mitochondrial subfractions (outer, inner and contact sites). Colocalizations of caveolin-1 (5 nm gold particles) with either GHR or GH (10 nm gold particles) were confirmed on mitochondrial fractions prepared for classical electron microscopy, at the membrane surface level and within the organelle (Figure 6, A and B). Colocalization of GH with its receptor was also observed at the surface and within mitochondria (Figure 6C).

GH biological action on mitochondrial metabolism

GH effect on mitochondrial function was investigated by the study of oxygen consumption by the CHO-GHR_{1-638} cells. Incubation of these cells with 200 nM rGH

revealed a stimulation of global respiration compared to control cells which were not put in presence of GH (Figure 7). When cells were treated with methyl-β-cyclodextrin in order to perturb caveolae internalization by depleting membrane cholesterol, oxygen consumption in GH-stimulated cells was not different from control without GH incubation or from control without drug administration and GH (Figure 7).

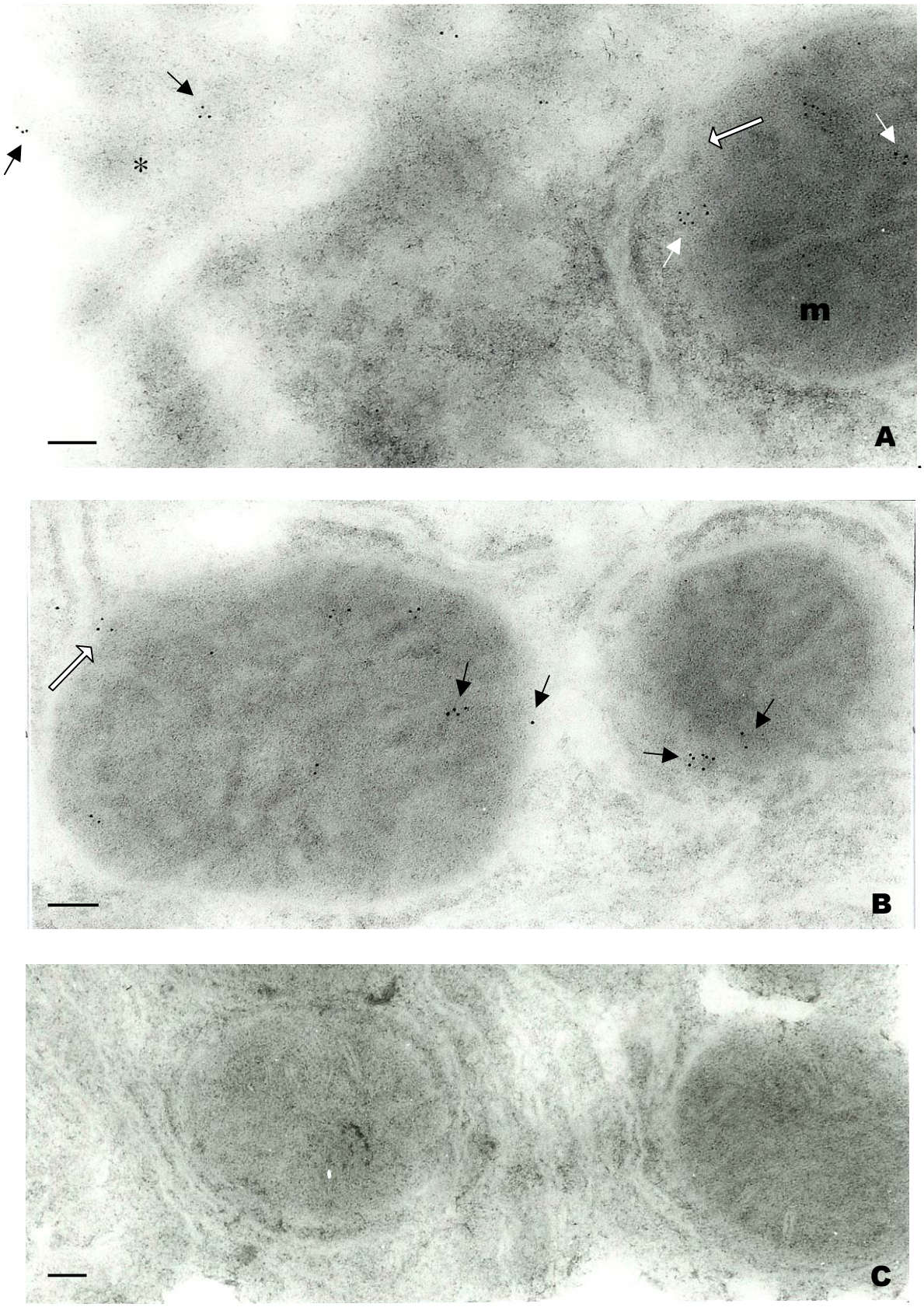


FIGURE 1

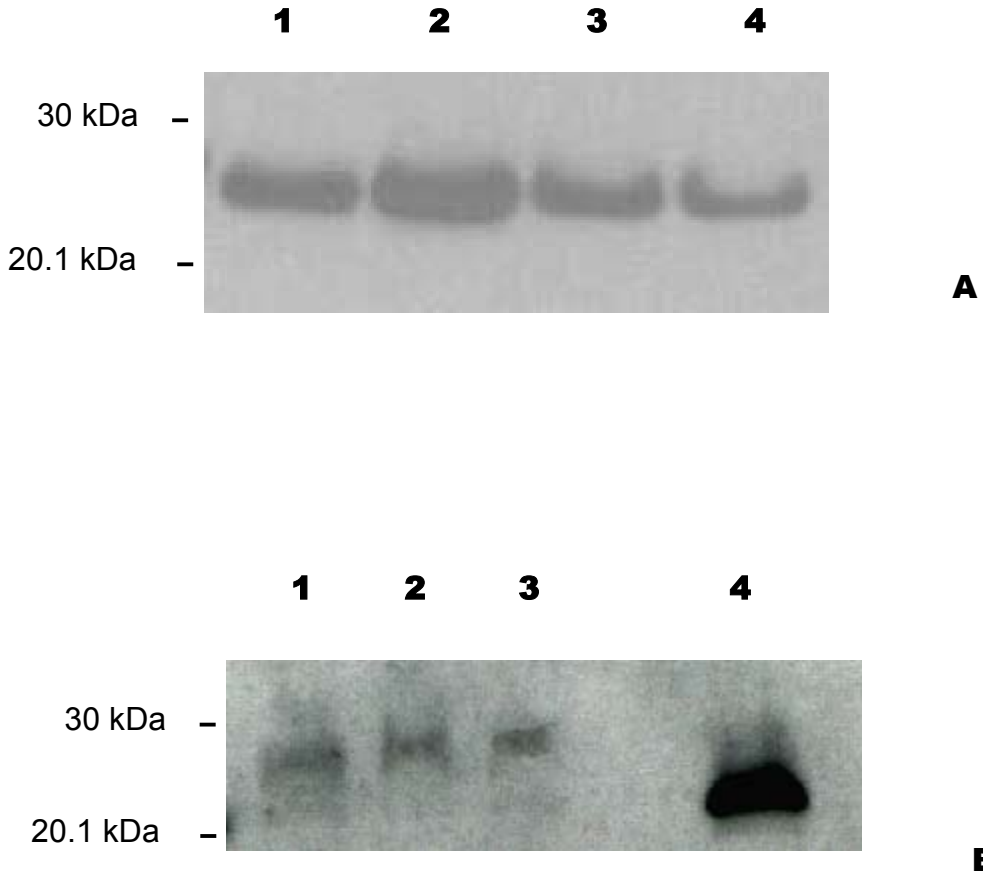


FIGURE 2

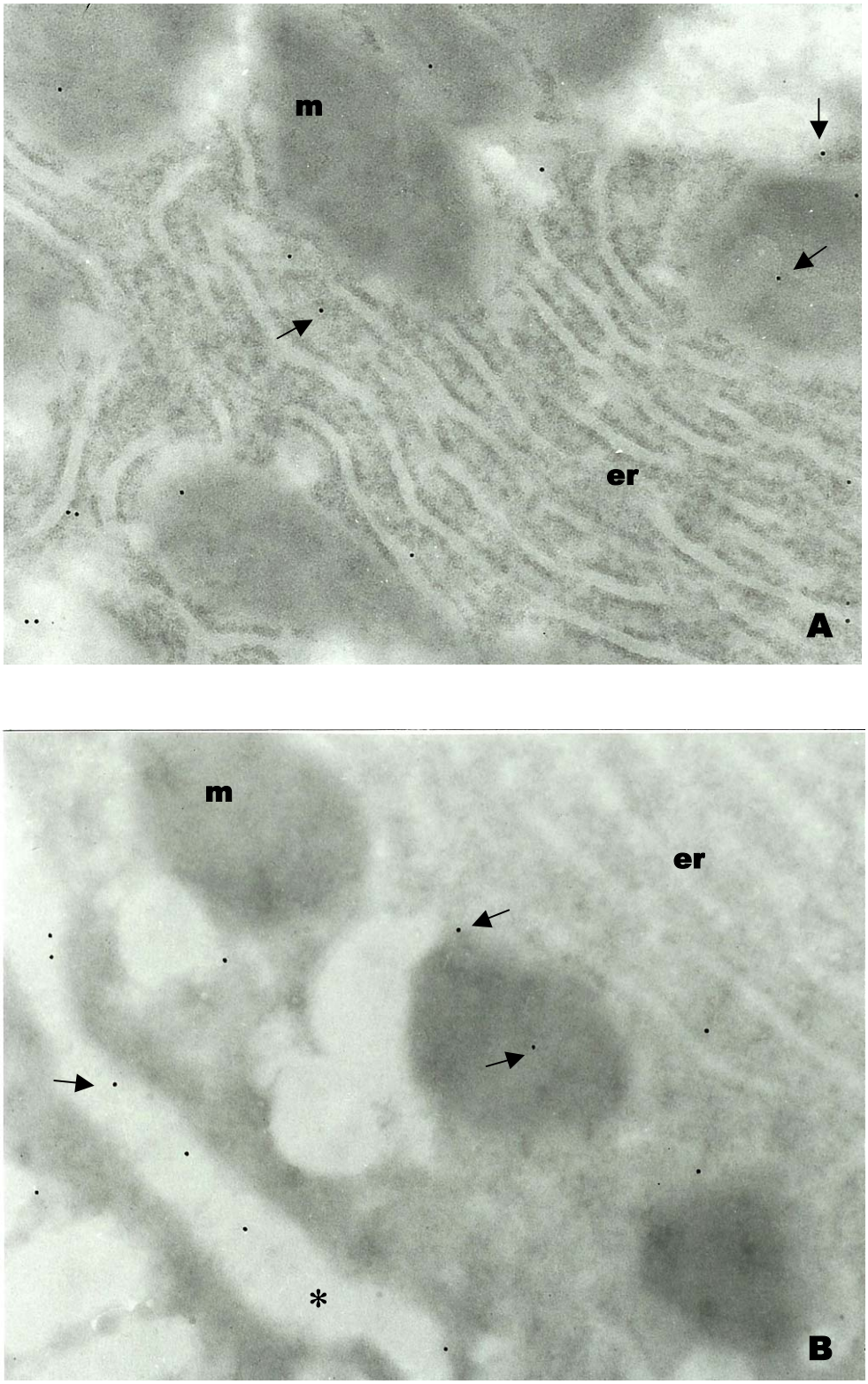


FIGURE 3

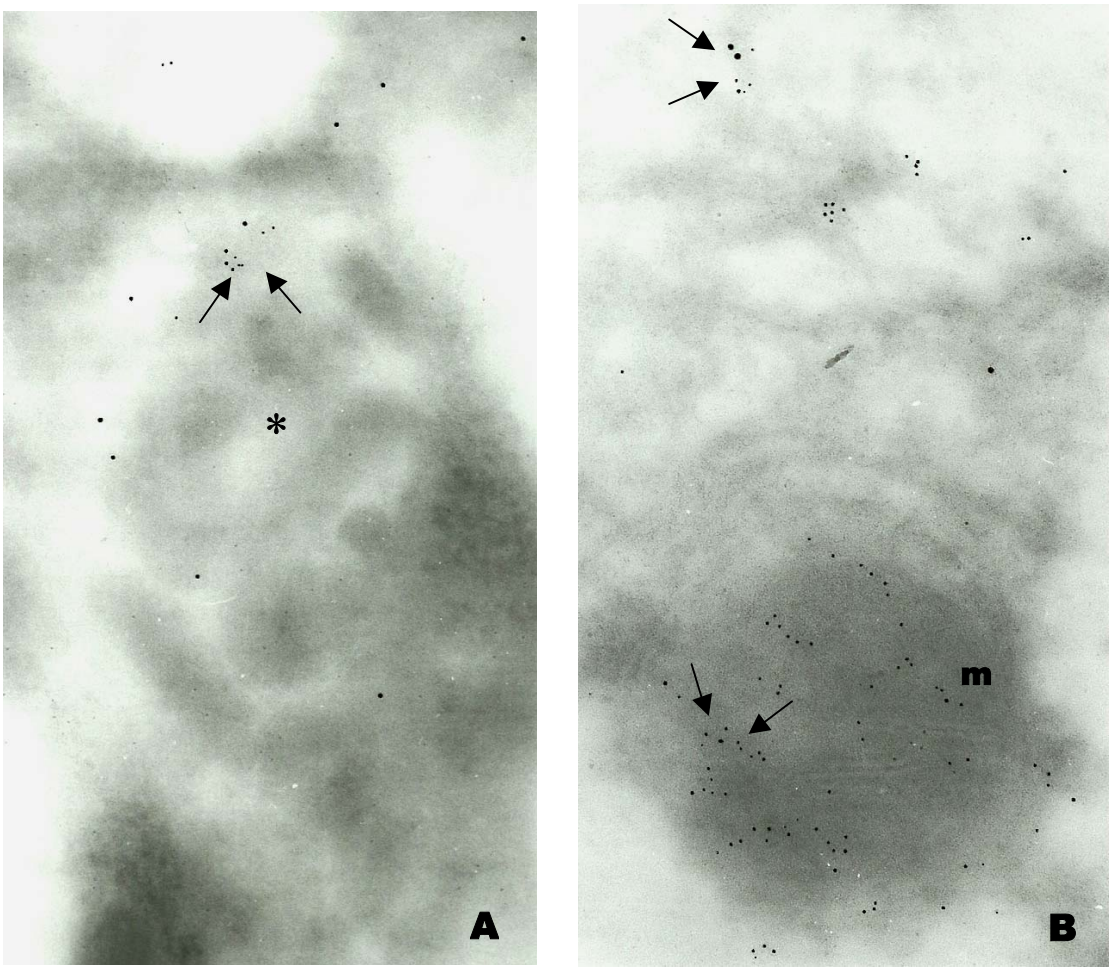


FIGURE 4

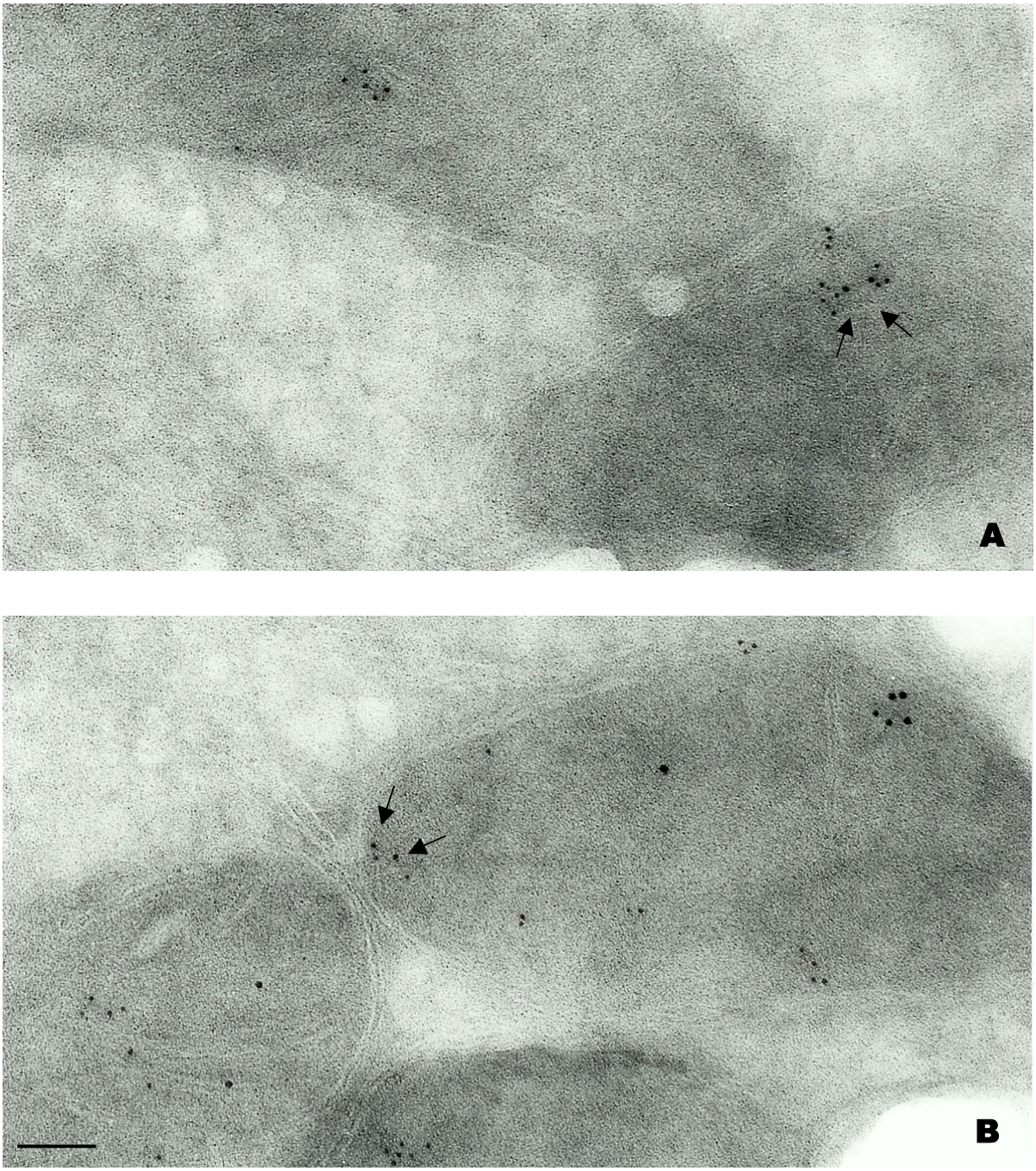


FIGURE 5

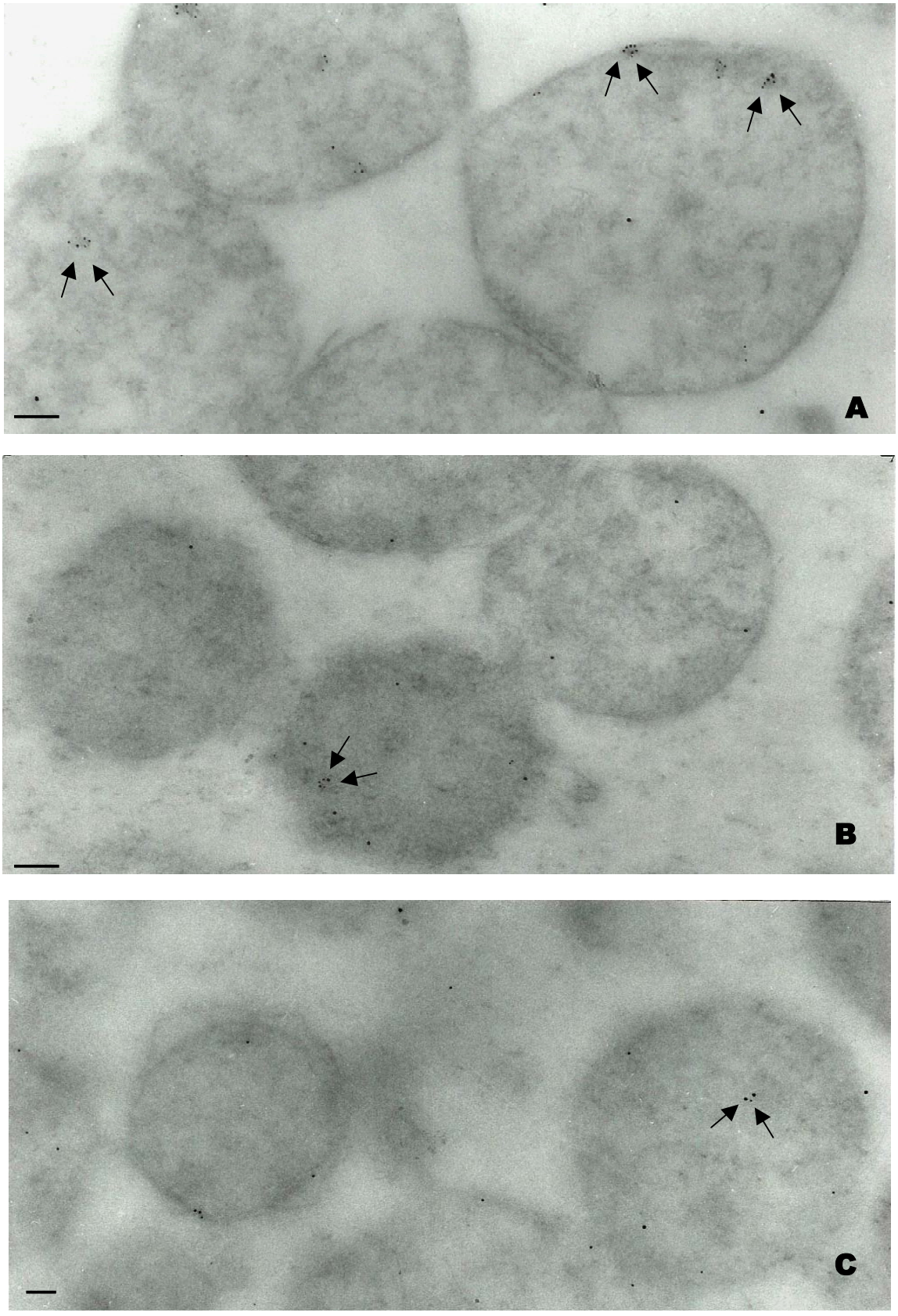


FIGURE 6

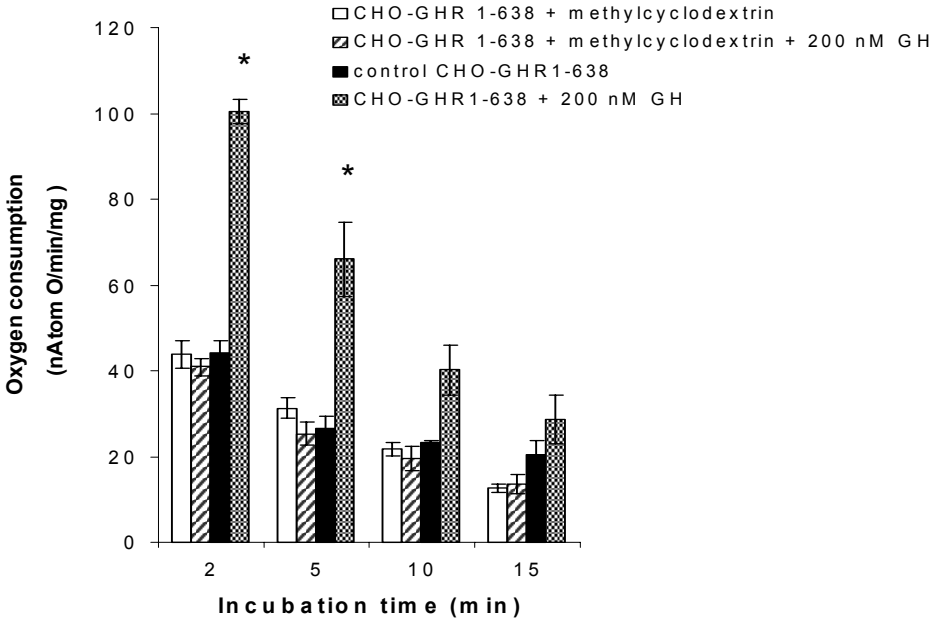

CHO-GHR 1-638 + methylcyclodextrin
CHO-GHR 1-638 + methylcyclodextrin + 200 nM GH
control CHO-GHR1-638
CHO-GHR1-638 + 200 nM GH
Oxygen consumption (nAtom O/min/mg)
120
100
80
60
40
20
0
*
*
2
5
10
15
Incubation time (min)

FIGURE 7

FRACTION	CYTOCHROME C OXIDASE (Inner mitochondrial membrane)	MONOAMINE OXIDASE (Outer mitochondrial membranes)	GALACTOSYLTRANSFERASE (Golgi)	NADPH CYTOCHROME C REDUCTASE (Microsomes)
MICROSOMES	43,3 ± 5,5 (N = 3)	ND	19,5 ± 3,0 (N = 3)	35,2 ± 8,2 (N = 3)
GOLGI	25,6 ± 4,0 (N = 3)	ND	195 ± 29,0 (N = 4)	3,09 ± 0,8 (N = 3)
OUTER MITOCHONDRIAL MEMBRANES	44,3± 6,0 (N = 3)	49,0 ± 4,5 (N = 3)	5,85 ± 0,3 (N = 2)	2,5 ± 0,3 (N = 3)
INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANES	490 ± 35 (N = 4)	4,2 ± 0,15 (N = 2)	2,14 ± 0,2 (N = 2)	0,25 ± 0,03 (N = 2)

ND : Not determined

TABLE 1

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Localization of caveolae structures on rat liver ultrathin frozen sections

(A) Caveolin-1 (5 nm gold particles) was detected at the plasma membrane, in the Disse's space (*), in cytoplasm (black arrows), in mitochondria (white arrows). (B) Caveolae vesicles (open arrow) were localized at the level of mitochondrial outer membrane. (C) Control without primary antibody presented no signal. *: Disse's space, m: mitochondrion. Bar represents 100 nm.

Figure 2: Cellular and subcellular localization of caveolin-1 and GH

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis were performed on mitochondrial membranes fractions obtained as described in "Materials and Methods". (A) Caveolin-1 detection in rat liver fraction containing 15 an 30 µg protein (lanes 1 and 2 respectively), and isolated rat mitochondria samples comprising 15 and 30 µg protein (lanes 3 and 4 respectively). (B) Caveolin-1 detection in rat liver mitochondrial membrane contact sites (lane 1), inner membrane (lane 2), outer membrane (lane 3), and rat liver fractions (lane 4).

Figure 3: Detection of endogenous GH on rat liver ultrathin frozen sections

GH (10 nm gold particles) was observed in hepatocyte cytoplasm, in endoplasmic reticulum, at the mitochondrial surface and in mitochondria (A). The hormone was not only detected in these compartments, but also at the surface of a blood vessel epithelium (B). er: endoplasmic reticulum, m: mitochondrion, *: Blood vessel. Bar represents 100 nm.

Figure 4: Double immunodetection of caveolin-1 and GH on rat liver ultrathin frozen sections

GH (10 nm gold particles) and caveolin-1 (5 nm gold particles) were colocalized in the space of Disse (A), in the cytoplasmic compartment and within mitochondria (B). *: Disse's space, m: mitochondrion. Bar represents 100 nm.

Figure 5: Double immunodetection of caveolin-1 and GHR on rat liver ultrathin frozen sections

GHR (10 nm gold particles) was detected in caveolae structures (open arrow) at the surface of mitochondrial membrane (A) and in mitochondria (arrows) (B). m: mitochondrion. Bar represents 100 nm.

Figure 6: Double immunodetection of caveolin-1, GH and GHR on ultrathin sections of mitochondrial fraction embedded in LR-White resin

Rat liver mitochondrial fractions were obtained and prepared for electron microscopy as described in "Materials and Methods". Colocalizations of caveolin-1 (5 nm gold particles) with either GH (A) or GHR (B) (10 nm gold particles) were observed in mitochondria. GH (10 nm gold particles) and its receptor (5 nm gold particles) were also colocalized in mitochondria (arrows) (C). Bar represents 100 nm.

Figure 7: Polarographic analysis of CHO cells expressing the full lengh GHR (CHO-GHR_{1-638}) in response to 200 nM rGH stimulation

Oxygen consumption was analyzed as described in "Materials and Methods". Cells were underwent or not with 3 mM methyl-β-cyclodextrin incubation for 1 hour at 37 C and then were stimulated or not with 200 nM rGH. Control corresponds to polarographic analysis performed on CHO-GHR_{1-638} without GH incubation. The results are expressed as the mean of 5 experiments ± SEM. Results were considered significant at the 5% level.

TABLES

Table 1: Specific marker enzyme activities in subcellular fractions from rat liver

Cytochrome c reductase activity is expressed in nmol cyt. c oxidized/min/mg protein; monoamine oxidase in nmol/min/mg protein, galacosyl-transferase in nmol [^{3}H]-galactose incorporated/h/mg protein; NADPH cytochrome c reductase in nmol cyt. C reduced/min/mg protein.

DISCUSSION

Liver represents the major target tissue for GH. The hormone and its receptor were detected in liver, at the level of cytoplasm and endoplasmic reticulum, as other hormones like prolactin (32). GH uptake has been investigated in rat liver at the beginning of the 70s' by Groves, Maddaiah, and collaborators (9, 33, 34, 35). They reported that GH was implicated in the regulation of mitochondrial biogenesis in liver tissue by the direct interaction of the hormone with mitochondrial membranes (8, 9). Nevertheless, some studies were conflicting with these last data. Actually, Postel-Vinay and collaborators (36) studied subcellular distribution of [^{125}I]-hGH injected iv to female rats. They demonstrated that hGH was internalized in vivo in the hepatocyte but virtually no radioactivity was associated with mitochondria. This latter data was corroborated a few years later (37). They focused on T_3 and GH action on mitochondrial biogenesis and they concluded that only T_3 had an effect whereas no high affinity binding sites for GH were present in rat liver mitochondria. Moreover, specific binding sites for [^{125}I]-T_3 were revealed in rat liver mitochondria after injection, as well as T_3 receptor-like immunoreactivity (38). In the present study, we clearly show that GH induced an increase in oxygen consumption in CHO cells expressing the full length GHR. This data indicates a real effect of GH on mitochondrial function as it was proposed for thyroid hormones (39). Moreover, GH and GHR binding to mitochondria membranes were put in evidence, but even if electron microscopic micrographs present a quite good morphological preservation, we were unable to really distinguish the binding sites since the resolution of immunogold detection was restricted to 27 nm. The binding of GH to mitochondrion has already been shown by autoradiography (10). Actually, liver does not express GH mRNA, this is the reason why we find so much GHR immunoreactivity so that GH present in blood circulation could reach and bind its hepatic receptor and play its endocrine role on this central tissue. Now, GHR immunoreactivity was studied in GH-secreting and non GH-secreting cells (12, 40). In somatotrophs, cells which synthesize and secrete GH, they found out accumulation of the GHR in the secretory granules and heterochromatin (12), but also its presence in Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, nucleoplasm and cellular and nuclear membranes. They added that a similar distribution was observed in rat hepatocytes. This last data confirms the results we obtained.

We also co-detected caveolin-1 with either GH or GHR in the same compartments. These results are in accordance with literature. Really, caveolin-1 was detected in blood vessel endothelium (41) and caveolae could play their transcytosis role to allow GH enter in

the hepatic cell. It is now well established that the complex GH-GHR_2 is internalized in cells via the clathrin-coated-pits route (42, 43) but, a study demonstrated GH-GHR_2 internalization via the caveolae pathway in CHO transfected cells (14). For Interferon γ (IFNγ), member of the same cytokine superfamily as GH, two pathways were proposed: one directed by clathrin-coated-pits which was supposed to target GH-GHR_2 complex to lysosomal fraction and degradation, and one orchestrated by caveolae vesicles should drive GH to other intracellular compartments (14, 29, 44). Now, recent data (45) suggests that the clathrin coat is involved in lysosomal-targeted GHR, which could assume for caveolin-1 transport of GH the same role attributed to caveolae in IFNγ trafficking. Moreover, these two internalization pathways were shown to intervene in TGF-β signaling and turnover (46).

The most intriguing results we obtained were the presence of GH, GHR and caveolin-1 inward mitochondria and also co-immunodetection of the hormone or its receptor with the scaffolding protein within this complex organelle. Caveolin-1 distribution has been described in mouse tissues by Li and collaborators (22) and they reported that this protein was present not only in liver cytoplasmic matrix, but also within liver mitochondria. GHR immunoreactivity has already been detected in mitochondria of rat somatotrophs (11, 12) and rat hepatocytes (12). Presence of GHR in somatotroph refers to the autocrine role attributed to GH which akin the hormone to a cytokine equally in these cells. Moreover, somatotrophs showed caveolin-1 concentration in secretory vesicles (22). Thus, caveolae pathway could be one possibility for somatotrophs to secrete the GH-GHR_2 complex. Furthermore, IFNγ was described in mouse liver (47) and its internalization pathways were investigated in U937 cells (44). These studies clearly showed IFNγ and IFNγ receptor presence within mitochondria compartment. This last data focus on the idea that cytokines could be targeted to mitochondria.

The presence of these three proteins within mitochondria raises the problem of their targetting to this site without any targeting sequence identified, and their transclocation through the mitochondrial membrane. First, it was proposed by Calvo and Enrich (21) that caveolae may internalize generating a subpopulation of vesicles enriched in caveolin, which eventually may fuse with the early/sorting endosomes. This pathway seemed to be modulated by EGF in rat liver (48). Actually, EGF is responsible for the partial redistribution of caveolin-1 from the plasma membrane into the early/sorting endocytic compartment. This pattern had only been elucidated for the targeting from plasma membrane to the endocytic compartment but was shown to require an intact actin cytoskeleton (49; 50). More research in

this way could be forwarded in order to determine whether this pathway is also required to reach mitochondria. Furthermore, caveolin-1 can be organized in caveolae or can be found under its soluble form. Li and collaborators (22) suggested that the soluble form of caveolin-1 appears to be embedded in a lipid particle that may have critical functions in intracellular lipids transport. These functions may include the delivery of lipids to caveolae, lipid droplets, endoplasmic reticulum, mitochondria and other cellular compartments. As caveolin was shown to interact with molecules such as those implicated in signal transduction (51; for review, 52) and EGF-R (53), what about an interaction with GHR and thus with the GH-GHR_2 complex as we demonstrated a colocalization of these proteins?

Once they are near the mitochondrial outer membrane, as we found the proteins within mitochondria, they have to enter in the organelle via any process. The first possibility we could think about is the mitochondrial pore or porin. However, porin is an integral membrane protein which is permeable to solutes of molecular mass under 2 kDa (54, 55). Thus, it is an impossible way for these over-2 kDa proteins. Surprisingly, porin was identified as a caveolar component (56) and its binding to cholesterol was demonstrated (57, 58, 59). So it was put forward that porin could be relocated to subcellular compartments through the intracellular cholesterol transport routes (60), as caveolae are involved in cholesterol trafficking. Another alternative could be the fusion membrane between caveolae and mitochondrial membrane at the contact sites. By western blot, we detected caveolin-1 at the contact sites but also in the two mitochondrial membranes. Moreover, it was reported that the contact sites of liver mitochondria were implicated in some phospholipids translocation into the organelle (25, 61). This could be an indication for membrane fusion. GM1, a particular glycosphingolipid and also cellular receptor for cholera toxin, was enriched in non-coated invaginations and finally, was colocalized with caveolin-1 (62). Equally, this ganglioside was associated to mitochondria (63). These findings put forward a fusion membrane process between caveolae or the "lipid particle" associated to the GH-GHR_2 complex with mitochondrial membrane at the contact sites. As membranes are not frozen structures, all these elements could move and therefore be associated to either outer or inner mitochondrial membrane. Clearly, further work is needed in this way to really understand why and by which mechanism such proteins localize within mitochondria.

Moreover, when the caveolae pathway was disrupt, GH could no more exert its stimulatory effect on oxygen cellular consumption in CHO-GHR_{1-638} cells. This last data suggests an interaction between internalization and signal transduction since all GH

biological effects are initiated by its interaction with the GHR homodimer as we previously suggested (Vivancos et al., submitted).

As a conclusion, we could propose that the GH-GHR_2 complex is targeted to mitochondria via the caveolae pathway and that, if this one is blocked, the hormone becomes unable to mediate global mitochondrial metabolism. This suggests that even if signal transduction and internalization are independent events concerning their initiation, they are able to interact and modulate each other in order to induce GH effects.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from “La Région Rhône-Alpes (Emergence 2002)”

REFERENCES

1. **Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG, March CJ** 1990 A new cytokine receptor syperfamily. Trends Biochem Sci 15: 265-270

2. **Cunningham BC, Ultsch M, De Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR, Wells JA** 1991 Dimerisation of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. Science 254: 821-825

3. **Fuh G, Cunnigham 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

4. **Wells JA, Cunnigham BC, Fuh G, Lowman HB, Bass SH, Mulkerrin MG, Ultsch M, De Vos AM** 1993 The molecular basis for growth hormone-receptor interactions. Recent Prog Horm Res 48: 253-275

5. **Zhu T, Goh EL, Graichen R, Ling L, Lobie PE** 2001 Signal transduction via the growth hormone receptor. Cell Signal 13: 599-616

6. **Roupas P, Herington AC** 1988 Intracellular processing of growth hormone receptors by adipocytes in primary culture. Mol Cell Endocrinol 57: 93-99

7. **Roupas P, Herington AC** 1989 Cellular mechanisms in the processing of growth hormone and its receptor. Mol Cell Endocrinol 61: 1-12

8. **Maddaiah VT, Rezvani I, Chen SY, Collipp PJ** 1970 Distribution of 3 H-acetyl human growth hormone in subcellular fractions of rat liver. Biochem Med 4: 492-499

9. **Groves WE, Houts GE, Bayse GS** 1972 Subcellular distribution of 125 I-labeled bovine growth hormone in rat liver and kidney. Biochim Biophys Acta 264: 472-480

10. **Lobie PE, Wood TJ, Chen CM, Waters MJ, Norstedt G** 1994 Nuclear translocation and anchorage of the growth hormone receptor. J Biol Chem 269: 31735-31746

11. **Mertani HC, Waters MJ, Morel G** 1996 Cellular trafficking of exogenous growth hormone in dwarf rat pituitary. Neuroendocrinology 63: 257-268

12. **Fraser RA, Harvey S** 1992 Ubiquitous distribution of growth hormone receptors and/or binding proteins in adenohypophyseal tissue. Endocrinology 130: 3593-3600

13. **Eshet R, Peleg S, Laron Z** 1984 Direct visualization of binding, aggregation and internalization of human growth hormone in cultured human lymphocytes. Acta Endocrinol (Copenh) 107: 9-15

14. **Lobie PE, Sadir R, Graichen R, Mertani HC, Morel G** 1999 Caveolar internalization of growth hormone. Exp Cell Res 246: 47-55

15. **Simons K, Toomre D** 2000 Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 1: 31-39

16. **Simons K, Ikonen E** 1997 Functional rafts in cell membranes. Nature 387: 569-572

17. **Glenney JRJr** 1992 The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. FEBS Lett 314: 45-48

18. **Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG** 1992 Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell 68: 673-682

19. **Parton RG, Joggerst B, Simons K** 1994 Regulated internalization of caveolae. J Cell Biol 127: 1199-1215

20. **Pol A, Calvo M, Enrich C** 1998 Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. FEBS Lett 441: 34-38

21. **Calvo M, Enrich C** 2000 Biochemical analysis of a caveolae-enriched plasma membrane fraction from rat liver. Electrophoresis 21: 3386-3395

22. **Li WP, Liu P, Pilcher BK, Anderson RG** 2001 Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. J Cell Sci 114: 1397-1408

23. **Moller C, Hansson A, Enberg B, Lobie PE, Norstedt G** 1982 Growth hormone induction in tyrosine phosphorylation and activation of mitogen activated protein kinase in cells transfected with rat GH receptor cDNA. J Biol Chem 267: 23403-23408

24. **Mathews LS, Enberg B, Norstedt G** 1989 Regulation of rat growth hormone receptor gene expression. J Biol Chem 264: 9905-9910

25. **Ardail D, Gasnier F, Lerme F, Simonot C, Louisot P, Gateau-Roesch O** 1993a Involvement of mitochondrial contact sites in the subcellular compartmentalization of phospholipid biosynthetic enzymes. J Biol Chem 268: 25985-25992

26. **Vance JE** 1990 Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. J Biol Chem 265: 7248-7256

27. **Ardail D, Privat JP, Egret-Charlier M, Levrat C, Lerme F, Louisot P** 1990 Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. J Biol Chem 265: 18797-18802

28. **Morel G, Gourdji D, Grouselle D, Brunet N, Tixier-Vidal A, Dubois PM** 1985 Immunocytochemical evidence for in vivo internalization of thyroliberin into rat pituitary target cells. Neuroendocrinology 41: 312-320

29. **Sadir R, Lambert A, Lortat-Jacob H, Morel G** 2001 Caveolae and clathrin-coated vesicles: two possible internalization pathways for IFN-gamma and IFN-gamma receptor. Cytokine 14: 19-26

30. **Villani G, Attardi G** 1997 In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in wild-type and mitochondrial DNA mutation-carrying human cells. Proc Natl Acad Sci USA 94: 1166-1171

31. **Hizuka N, Gorden P, Lesniak MA, Van Obberghen E, Carpentier JL, Orci L** 1981 Polypeptide hormone degradation and receptor regulation are coupled to ligand internalization. A direct biochemical and morphologic demonstration. J Biol Chem 256: 4591-4597

32. **Ouhtit A, Ronsin B, Kelly PA, Morel G** 1994 Ultrastructural expression of prolactin receptor in rat liver. Biol Cell 82: 169-176

33. **Maddaiah VT, Sharma RK, Balachandar V, Rezvani I, Collipp PJ, Chen SY** 1973 Effect of growth hormone on mitochondrial protein synthesis. J Biol Chem 248: 4263-4268

34. **Maddaiah VT, Weston CL, Chen SY, Collipp PJ** 1976 Growth hormone and liver mitochondria. Effects on cytochromes and some enzymes. Arch Biochem Biophys 173: 225-230

35. **Katkocin DM, Gupta KM, Collipp PJ, Maddaiah VT** 1979 Effects of growth hormone on respiration and ATPase activity of rat liver and heart mitochondria. Biochem Med 22: 134-144

36. **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

37. **Mutvei A, Husman B, Andersson G, Nelson BD** 1989 Thyroid hormone and not growth hormone is the principle regulator of mammalian mitochondrial biogenesis. Acta Endocrinol (Copenh) 121: 223-228

38. **Ardail D, Lerme F, Puymirat J, Morel G** 1993b Evidence for the presence of α and β-related T3 receptors in rat liver mitochondria. Eur J Cell Biol 62: 105-113

39. **Goglia F, Silvestri E, Lanni A** 2002 Thyroid hormones and mitochondria. Biosci Rep 22:17-32

40. **Mertani HC, Waters MJ, Jambou R, Gossard F, Morel G** 1994 Growth hormone receptor binding protein in rat anterior pituitary. Neuroendocrinology 59: 483-494

41. **Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W** 1998 Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. J Cell Biol 140: 947-959

42. **Govers R, van Kerkhof P, Schwartz AL, Strous GJ** 1997 Linkage of the ubiquitin-conjugating system and the endocytic pathway in ligand-induced internalization of the growth hormone receptor. EMBO J 16: 4851-4858

43. **Van Kerkhof P, Sachse M, Klumperman J, Strous GJ** 2001 Growth hormone receptor ubiquitination coincides with recruitment to clathrin-coated membrane domains. J Biol Chem 276: 3778-3784

44. **Subramaniam PS, Johnson HM** 2002 Lipid microdomains are required sites for the selective endocytosis and nuclear translocation of IFN-gamma, its receptor chain IFN-gamma receptor-1, and the phosphorylation and nuclear translocation of STAT1alpha. J Immunol 169: 1959-1969

45. **Sachse M, Urbe S, Oorschot V, Strous GJ, Klumperman J** 2002 Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. Mol Biol Cell 13: 1313-1328

46. **Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL** 2003 Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. Nat Cell Biol 5: 410-421

47. **Lambert A, Sadir R, Brisson C, Morel G** 2000 In vivo subcellular target compartments of interferon-gamma and interferon-gamma receptor (alpha- and beta-chains) in mouse liver. Cytokine 12: 715-719

48. **Pol A, Calvo M, Lu A, Enrich C** 2000a EGF triggers caveolin redistribution from the plasma membrane to the early/sorting endocytic compartment of hepatocytes. Cell Signal 12: 537-540

49. **Pol A, Lu A, Pons M, Peiro S, Enrich C** 2000b Epidermal growth factor-mediated caveolin recruitment to early endosomes and MAPK activation. Role of cholesterol and actin cytoskeleton. J Biol Chem 275: 30566-30572

50. **Pelkmans L, Puntener D, Helenius A** 2002 Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. Science 296: 535-539

51. **Sargiacomo M, Sudol M, Tang Z, Lisanti MP** 1993 Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. J Cell Biol 122: 789-807

52. **Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP** 1999 Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. Mol Cell Biol 19: 7289-7304

53. **Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP** 1997 Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. J Biol Chem 272: 30429-30438

54. **Colombini M** 1989 Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC. J Membr Biol 111: 103-111

55. **Benz R** 1994 Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. Biochim Biophys Acta 1197: 167-196

56. **Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M** 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. J Cell Biol 126: 111-126

57. **Freitag H, Neupert W, Benz R** 1982 Purification and characterisation of a pore protein of the outer mitochondrial membrane from Neurospora crassa. Eur J Biochem 123: 629-636

58. **De Pinto V, Benz R, Palmieri F** 1989 Interaction of non-classical detergents with the mitochondrial porin. A new purification procedure and characterization of the pore-forming unit. Eur J Biochem 183: 179-187

59. **Popp B, Schmid A, Benz R** 1995 Role of sterols in the functional reconstitution of water-soluble mitochondrial porins from different organisms. Biochemistry 34: 3352-3361

60. **Bathori G, Parolini I, Tombola F, Szabo I, Messina A, Oliva M, De Pinto V, Lisanti M, Sargiacomo M, Zoratti M** 1999 Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains. J Biol Chem 274: 29607-29612

61. **Ardail D, Lerme F, Louisot P 1991** Involvement of contact sites in phosphatidylserine import into liver mitochondria. J Biol Chem 266: 7978-7981

62. **Parton RG** 1994 Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. J Histochem Cytochem 42: 155-166

63. **Matyas GR, Morre DJ** 1987 Subcellular distribution and biosynthesis of rat liver gangliosides. Biochim Biophys Acta 921: 599-614

III. Action directe de la GH sur la fonction mitochondriale

La GH est une molécule présentant de multiples effets et régule notamment le métabolisme au niveau cellulaire. Cet effet biologique est classiquement initié par la liaison de la GH à un récepteur spécifique, conduisant à l'activation de molécules de signalisation (Leung *et al*., 1987 ; Mathews *et al*., 1989 ; Moldrup *et al*., 1991 ; Moller *et al*., 1992 ; Francis *et al*., 1993) responsables des changements des processus cytosoliques et de l'expression des gènes (Thomson *et al*., 2000 ; Mertani *et al*., 2001). Parallèlement, l'internalisation du complexe hormone-récepteur (Roupas et Herrington, 1988, 1989) a probablement lieu par la voie des clathrines (Eshet *et al*., 1984) et des cavéoles (Lobie *et al*., 1999). Parmi les destinations intracellulaires de la GH internalisée, se trouvent le noyau (Rezvani *et al*., 1973 ; Bonifacino *et al*., 1983 ; Lobie *et al*., 1994) et la mitochondrie (Maddaiah *et al*., 1970 ; Groves *et al*., 1972 ; Rezvani *et al*., 1973 , Lobie *et al*., 1994). La GH a été spécifiquement détectée *in vivo* au niveau des mitochondries de foie (Lobie *et al*., 1994) et d'hypophyse (Mertani *et al*., 1996) de rat dès 2 minutes après l'injection. La détection de la GH dans la mitochondrie soulève le problème de son importance fonctionnelle. Les observations que nous avons faites nous ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle la mitochondrie constituerait une cible de l'action directe de la GH. Quelques études ont suggéré une régulation de la fonction oxydative induite par la GH au niveau d'hépatocytes issus de rats hypophysectomisés ayant subi une hormonothérapie de substitution par la GH (Katkocin *et al*., 1979 ; Clejean *et al*., 1981 ; Maddaiah et Clejean, 1986). L'action directe d'une hormone, la 3,5-diiodothyronine (T2), a déjà été mise en évidence sur la respiration de fractions mitochondriales (Goglia *et al*., 1994 ; Lanni *et al*., 1994 ; Leary *et al*., 1996). Cette action était obtenue à la suite de l'import de l'hormone dans les mitochondries mais le réel mécanisme de translocation reste encore à être défini (Arnold *et al*., 1998). L'import mitochondrial a également été indiqué pour deux autres protéines, une métallothionéine (Ye *et al*., 2001) et un facteur de transcription mitochondrial, la Mtf1 (Biswas et Getz, 2002), toutes deux dépourvues, comme la GH, de séquence de ciblage mitochondrial. Dans le but d'étudier l'import mitochondrial de la GH, nous avons travaillé directement sur des fractions mitochondriales, de façon à dissocier ce mécanisme de la signalisation intracellulaire provenant des récepteurs membranaires et de l'endocytose.

Nous avons dans un premier temps confirmé la capture mitochondriale de hGH *ex vivo* dès 10 minutes après l'injection de [^{125}I]-hGH à des rats. Puis, en travaillant directement sur des fractions mitochondriales que nous avons incubées pendant 10 minutes avec cette

même GH, nous avons pu mettre en évidence une accumulation spécifique, rapide et saturable de [^{125}I]-hGH. Les fractions mitochondriales ont ensuite subi un sous-fractionnement par ultracentrifugation afin de localiser plus précisément l'hormone. Par western blot, nous avons alors pu mettre en évidence la GH de 22 kDa au niveau de l'espace intermembranaire et de la membrane interne. Dans un même temps, nous avons étudié la localisation de GH par immunocytologie en microscopie électronique sur des fractions purifiées de mitochondries de foie de rat incubées ou non avec de la GH puis incluses en résine LR-White. L'analyse cytologique en microscopie électronique nous a permis d'identifier un signal à la surface mitochondriale et à l'intérieur de l'organite qui était augmenté après l'incubation.

Dans un deuxième temps, nous avons abordé le rôle que pourrait jouer la GH sur la fonction mitochondriale, plus particulièrement au niveau de quatre complexes de la chaîne respiratoire (I, II, II et IV), par spectrophotométrie et oxygraphie sur mitochondries isolées et par oxygraphie sur des cellules BRL exprimant le GHR entier. Par spectrophotométrie, nous avons observé une réduction de 30% des activités de la succinate-ubiquinone oxydoreductase (complexe II) et de la cytochrome c oxydase (complexe IV). Aucune modification significative de l'activité de la NADH-ubiquinone oxydoréductase (complexe I) ou de l'ubiquinol cytochrome c reductase (complexe III) n'a été détectée. La détermination de l'activité de la cytochrome c oxydase sur des mitochondries découplées a été réalisée par oxygraphie en utilisant le TMPD/ascorbate comme substrat. Cette approche complémentaire de l'analyse du complexe IV a révélé là encore une diminution de la consommation d'oxygène lorsque les mitochondries étaient incubées en présence de GH et d'ATP. Lorsque la consommation globale d'oxygène des mitochondries a été étudiée en utilisant le succinate comme substrat, la GH a induit une diminution de la consommation d'oxygène. Inversement, l'oxygraphie effectuée sur les cellules BRL a permis de montrer une stimulation de 50% de l'activité cytochrome c oxydase au bout de 10 minutes, puis l'activité enzymatique revenait à une valeur normale.

Ces résultats suggèrent une capture spécifique de la GH par les mitochondries, induisant un effet métabolique direct sur la respiration mitochondriale par inhibition des complexes II et IV. En revanche, sur cellule entière, présentant donc un récepteur fonctionnel au niveau de la membrane cellulaire, l'activité de la cytochrome c oxydase est activée, suggérant deux types de contrôle de la respiration par la GH. Le premier serait un effet activateur *via* la transduction du signal et le second serait un effet inhibiteur *via* la GH elle-même par interaction directe avec la mitochondrie.

DIRECT ACTION OF GROWTH HORMONE ON MITOCHONDRIAL ACTIVITY

[1]Abbate A., [1]Vivancos C., [2]Ardail D., [3]Godinot C., [4]Lobie P.E and [1]Morel G.

1- CNRS UMR 5123 – Université Claude Bernard - Lyon 1, Bâtiment Dubois, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France.

2- INSERM U189 Faculté de Médecine Lyon-Sud, 69921 Oullins cedex, France.

3- CNRS UMR 5534 – Université Claude Bernard – Lyon 1, Bâtiment Gregor Mendel, 16 rue Raphaël Dubois, 69622 Villeurbanne cedex, France.

4- Institute of Molecular and Cell Biology, National University of Singapore, Republic of Singapore.

Address for correspondance

Gérard Morel

CNRS UMR 5123 – Université Claude Bernard - Lyon 1,

Bâtiment Dubois, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex

France.

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

Tel: 33 472 43 29 27; Fax: 33 472 43 29 27.

Key-words: Respiration, cytochrome c oxidase, succinate deshydrogenase, intracrin.

ABSTRACT

Growth hormone (GH) is a multipotent molecule known to regulate cell proliferation and differentiation, as well as metabolism. Biological effects result from GH binding to its specific cell surface receptors which activates signal transduction. The resulting GH internalization induces a rapid accumulation of GH in several subcellular compartments, including mitochondria. In this study, having confirmed the mitochondrial uptake of hGH *ex vivo* as early as 10 min after a ^{125}I-hGH injection, we postulated that GH interaction with mitochondria would promote specific effects. By working directly on mitochondrial fractions, we demonstrated a specific, rapid, saturable accumulation of intact ^{125}I-hGH. At the electron-microscopic level, immunoreactive GH density within mitochondria increased after hormone incubation, without any modification of its localization. The presence of GH in the inter membrane space and the inner membrane put in evidence after mitochondrial fractionation suggested a specific regulation mechanism for mitochondrial respiration. Polarographic and spectrophotometric methods demonstrated a GH direct dose-dependent effect on mitochondrial fractions. We observed a 30% reduction in succinate dehydrogenase and cytochrome c oxidase activity. No significant modification of NADH dehydrogenase or ubiquinol cytochrome c reductase was detected. These data show that GH is specifically imported in mitochondria, and operates a direct metabolic effect on them, independently of cell surface receptors.

Acknowledgment. List dedications, acknowledgments, and funding sources (Emergence).
This study was supported by a grant from “La Région Rhône-Alpes (Emergence 2002)”.

INTRODUCTION

Growth hormone (GH) is a multipotent molecule which regulates metabolism at the cellular level (1). This biological effect is classically initiated by GH binding to a specific surface receptor (GHR), leading to the activation of signaling molecules (2-6) responsible for changes in cytosolic processes and gene expression (7, 8). Independently, the internalization of both GH and GHR (9, 10) presumably occurs by clathrin-coated pits (11) and/or caveolae (12). Among intracellular destinations for internalized GH, are nucleus (16-18) and mitochondria (16, 18-21). GH was specifically found within liver (18) and pituitary (21) mitochondria *in vivo* as early as 2 min. The detection of GH in mitochondria raises the question of its functional importance. Our observations led us to the hypothesis that mitochondria could be a direct target for GH actions. Some reports have suggested a GH-induced regulation in the mitochondrial oxidative function of liver cells from GH-treated hypophysectomized rats (22-25). It has already been demonstrated on mitochondrial fractions that 3,5-diiodothyronine (T2) exerted a direct action on respiration *in vitro* (26-28), resulting from T2 mitochondrial import, which mechanism remains unknown (29). Direct mitochondrial import was also shown for two others proteins, a metallothionein (30) and a mitochondrial transcription factor, Mtf1p (31), both devoid of mitochondrial targeting sequence. We investigated mitochondrial GH uptake by working directly on mitochondrial fraction, allowing the dissociation from cell-surface GHR effects, signal transduction pathways and endocytosis.

We firstly determined *in vivo* ^{125}I-hGH mitochondrial accumulation in rat liver. We have extended this observation by studying GH mitochondrial import and submitochondrial localization after a proteinase K treatment. Mitochondrial fractionation demonstrated that GH was associated to the inter membrane space and the inner membrane. This intramitochondrial distribution was confirmed by Immunoelectron microscopy performed on purified liver mitochondria. Using polarographic and spectrophotometric methods, we found that GH could directly affect enzymatic activities of the electron transport chain and mitochondrial respiration by impairing the II and IV complexes.

MATERIALS AND METHODS

Materials. hGH labeled with ^{125}I with a specific activity of 100-150 µCi/µg protein was obtained from N.E.N (Perkin-Elmer Life Sciences, Zavantem, Belgium).
Recombinant human GH (rGH) and primary antibody to human GH were obtained from the National Hormone and Pituitary Program (NHPP, Harbour-UCLA Medical Center, Torrance, CA, USA) and Dako (Trappes, France). Pre-stained molecular-weight markers were obtained from Bio-rad S.A. (Ivry sur Seine, France). Hybond-C nitrocellulose membrane, ECL plus Western Blotting Detection System, and goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase were purchased from Amersham Biosciences Europe GmbH (Orsay, France). All the products used for biochemical and polarographic analysis were obtained from Sigma-Aldrich, (St Quentin Fallavier, France).

Cellular transfection of GH receptor cDNA. Rat GH receptor cDNA was cloned into an expression plasmid containing an SV40 enhancer and a human metallothionein IIa promoter. The cDNA was transfected into BRL 3A cells with lipofectin together with the pIPB-1 plasmid, which contains a neomycin resistance gene fused to the thymidine kinase promoter (5). Stable transfected cells were selected using 1 mg/ml G418. The complete rat GH receptor cDNA (32) coding for amino acids 1-638 was expressed in BRL 3A, and will be referred to as BRL-GHR$_{1\text{-}638}$.

Animal treatment. For the tracer study, male Wistar rats (Iffa Credo, L'Arbresle, France), weighing 250-300 g, were anesthetized with halothane and injected intravenously with 0.5 ml of PBS containing 4.4x10^7 cpm of ^{125}I-hGH ± 100-fold excess of unlabeled rGH. The rats were sacrificed by decapitation 15 min after injection. The livers were excised and washed in isolation buffer.

Preparation of liver mitochondria from injected and non-injected rats. Rat liver mitochondria were prepared as previously described (33). Briefly, livers were immersed in an ice-cold isolation medium (250 mM sucrose, 10 mM Hepes buffer, pH 7.4, 1 mM EDTA). Crude mitochondria were given by differential centrifugations and purified by layering on 20 ml medium containing 25 mM Hepes buffer, pH 7.4, 225 mM mannitol, 1 mM EDTA, 1% BSA (Bovine Serum Albumin) and 30% Percoll. Gradients were centrifuged for 30 min at 95,000 *g*, as previously reported (34), after which the dense band containing purified

mitochondria was removed from the gradient and washed in the isolation medium. The concentration of mitochondrial protein was quantified by a Bio-rad DC protein assay (500-0113, with BSA as a standard).

In vitro import of ^{125}I-hGH into isolated rat mitochondria. Mitochondria were prepared as previously described (31). Intact coupled mitochondria were suspended in an import reaction buffer (0.6 M sorbitol, 10 mM MOPS, pH 7.2, 80 mM KCL, 2 mM ATP and 2 mM NADH) at a concentration of 50 mg/ml mitochondrial protein. Dose-dependent experiments using ^{125}I-labeled GH as a tracer were realized on mitochondria incubated in reaction import buffer with unlabeled increasing GH doses going from 100 to 500 nM, and reveled 200 and 300 nM as the optimum GH concentrations. The time course study performed during 30 min demonstrated that the import of GH was essentially complete by 5-10 min.

After GH incubation, a part of each sample was used to quantify the total amount of GH associated to mitochondria. Each bulk sample was treated with 20 µg of proteinase K on ice for 30 min to remove the non-imported ^{125}I-hGH and this reaction was stopped by adding a protease inhibitor PMSF (1 mM final).

Mitochondria were once washed in import buffer, without NADH. Then, the organelles were re-suspended in 50 µl import buffer plus 350 µl of 20 mM HEPES buffer, pH 7.4 and kept on ice for 30 min. This hypotonic solution swells mitochondria, and leads to specific disruption of the mitochondrial outer membrane space content into the medium. 12 000 x *g* centrifugation for 15 min allowed the extraction of the inner membrane space content which was released into the medium from the pellet constituted by mitoplasts (mitochondria without outer membrane). The mitoplast pellets were suspended in 50 µl sonication buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl) and kept on ice for 10 min. Samples underwent a treatment consisting in 3 cycles of rapid freezing in a dry ice/ethanol bath followed by a sonication water bath. Samples were then centrifuged for 30 min at 150 000 x *g* in a Beckman L-60 Ultracentrifuge (Air pressure, 50 Ti) to separate the mitochondrial matrix content from the inner membrane. The pellets composed of the inner mitochondrial membrane fraction were re-suspended in 40 µl sonication buffer and the supernatants containing the matrix material were conserved.

All these mitochondrial fractions were quantified with a γ counter (Perkin-Elmer, Cergy-Pontoise, France) and visualized by autoradiography.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for mitochondrial translocated ^{125}I-hGH. To determine the molecular weight of the mitochondrial translocated ^{125}I-hGH and its submitochondrial localization, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed on each sample prepared as above. Samples and iodinated hormone were diluted in loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.0, 2% SDS and 5% β-mercaptoethanol) and loaded onto a polyacrylamide gel with 4% acrylamide stacking gel and 15% resolving gel. Each gel was dried and autoradiographed with a Hyperfilm^{TM}-^{3}H from Amersham (Orsay, France).

Immunoelectron microscopy. Purified mitochondrial fractions were incubated in an import reaction buffer for 10 min at 37°C, with or without 200 nM GH. The mitochondrial suspension was spun at 8,500 *g*. The pellet was washed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, at 4°C and fixed in 4% paraformaldehyde-0.1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The samples were embedded in LR-White resin (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Polymerization was performed in gelatin capsules at 60°C for 24 h.
Ultrathin sections of 70 nm were obtained using an Ultracut S (Leica, Vienna, Austria). Immunocytological detection of GH was carried out using a guinea pig anti-rGH IgG (dilution 1/100 in 100 mM phosphate buffer, 300 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 0.5% BSA, pH 7.4) and revealed by an anti-guinea pig IgG conjugated with 10 nm gold particles. Immunogold reagents (British Biocell, Cardiff, U.K) were used at 1/50 in 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 0.5% BSA, pH 8.2. The contrast was performed by incubation in 4% uranyl acetate pH 7 for 30 min. Electron micrographs were taken with a Philips CM120 electron microscope, operating at 80 kV (Centre Technologique des Microstructures, Villeurbanne, France).

Cytochrome c oxydase activity in transfected cells. BRL cells were grown to confluence in Ham's F-12 medium supplemented with 10% fetal calf serum and then incubated for 12 h in serum-deprived medium before the addition of 50 nM rGH for the indicated times. Cells were harvested to a final concentration of 1,000,000 cells/ml, spun at 2,000 *g* and homogenized in 250 µl of 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. The concentration of cellular proteins was quantified by a Bio-rad DC protein assay, and was typically found to be around 10 mg/ml. The cellular homogenate was solubilized in Tris buffer containing 3% dodecyl maltoside then centrifuged at 3,000 *g*. The supernatant was collected and the cytochrome c oxidase (COX) activity (complex IV) was estimated by recording cytochrome c oxidation at 550 nm. The assay was performed at 37^{o}C in 1 ml of 100 mM phosphate buffer, pH 7.0, with

5-10 µl of supernatant fluid (50-100 µg proteins) and 0.24 mM reduced cytochrome c being added to start the reaction.

Marker enzyme activities. Enzyme activities of different respiratory chain complexes were determined spectrophotometrically at 37°C on mitochondrial fractions incubated for 5, 10 or 15 min with increasing rGH concentrations (10, 50 or 100 nM). NADH ubiquinone oxidoreductase activity (complex I) was monitored at 340 nm and determined using a potassium phosphate buffer (10 mM K-phosphate buffer, pH 8.0, 5 mM NADH, 20 mM phosphatidylcholine) and 20-40 µl homogenate (100-200 µg proteins), added of 10 mM ubiquinone. Succinate dehydrogenase activity (complex II) was measured at 600 nm by adding 20 mM succinate to a reaction medium (50 mM KH_2PO_4, pH 7.4, triton X-100 1‰, 3 mM KCN, 20 µg/ml rotenone) complemented with 10-20 µl homogenate (50-100 µg proteins) and 0.18 mM DCIP plus 1.3 mM PMS. Ubiquinol cytochrome c reductase (complex III) activity was measured at 550 nm by adding 20 µM decylubiquinol to a reaction medium containing 35 mM KH_2PO_4, pH 7.2, 5 mM $MgCl_2$, BSA (2.5 mg/ml), 0.2 mM KCN, 20 µM oxidized cytochrome c, rotenone (10 µg/ml) and 15-30 µg mitochondrial proteins. The decylubiquinol solution was prepared as described by Rieske (35). COX activity (complex IV) was estimated by recording cytochrome c oxidation at 550 nm. The assay was performed with 1 ml of reduced cytochrome c, to which 5-10 µl of homogenate (5-10 µg of proteins) were added to start the reaction.

Polarographic determination of mitochondrial oxygen consumption. Oxygen was measured with a Clark-type oxygen electrode, model DW1 (Hansatech Instruments Laboratories, Norfolk**,** UK), in a glass cell thermostatically controlled at 37 ± 2°C. The respiratory reaction medium contained 250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, with a final free fatty acid (FFA) BSA concentration of 1 mg/ml (1% w/v). The respiratory substrates were sodium-salts either succinate (5 mM) or glutamate (5 mM) and malate (2.5 mM). The electron transport chain was specifically inhibited so as to measure the oxidative phosphorylation parameters of the coupling sites. Sites 2 and 3 were studied in presence of 10 mM succinate plus 5 µM rotenone and site 1 and 3 in the presence of 2.5 mM malate/5 mM pyruvate plus 10 mM Malonate. Mitochondrial protein (750 µg) were added to incubation buffer (1.5 ml) and incubated for 0, 5 or 10 min with 10, 50 or 100 nM rGH. The control state of respiration (state 4) was initiated by the addition of 15 µl substrate and the active state of respiration (state 3) by the addition of 100 µM ADP. The electrode was

calibrated as described by Hizuka *et al.* (36). The rate of oxygen consumption was calculated as described by Postel-Vinay *et al.* (37).

COX activity was also determined polarographically on isolated mitochondria pre-incubated with or without rGH 100 nM for 0, 5 and 10 min at 37°C, and was recorded during 15 min. Liver mitochondria were diluted in a medium containing 1 mM ATP, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA and 50 mM Hepes/KOH, pH 7.4. Mitochondrial proteins (150 µg) were added to the reaction medium (1.5 ml) containing 30 µM cytochrome c, 4 µM rotenone, 0.5 mM 2,4-dinitrophenol, 10 mM sodium malonate and 75 mM Hepes/NaOH, pH 7.4. The reaction was started by addition of 15 µl of 8 mM ascorbate/0.6 mM TMPD (*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine).

Statistics. All data are expressed as mean ± SEM. Data were analyzed using the 2-tailed t-test or ANOVA. Results were considered significant at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Effects of rGH on Cox activity in BRL-GHR$_{1-638}$

The COX activity was measured as the first-order rate constant on BRL-GHR$_{1-638}$ cells after GH incubation over 60 min. The GH-stimulated time course of COX activity is presented in Fig 1. A significant stimulation of basal activity occurred within 5 min, and was maximal at 10 min (50% above control value) in response to GH ($P \leq 0.05$). Enzymatic activity decreased from 10 min until 60 min where no longer activation was detectable. The basal COX activity was assayed in control BRL-GHR$_{1-638}$ cells incubated at 37°C without rGH and did not fluctuate in the same conditions.

Mitochondrial GH import

In vivo, specific GH uptake by liver mitochondria was demonstrated by ^{125}I-hGH co-injected into rats with an excess of unlabeled rGH. Fifteen min after injection, the amount of radioactivity found in the mitochondrial fraction represented around 35% of total liver uptake (Fig 2A), confirming the liver as the main GH target tissue. The specific signal corresponded to the total radioactivity quantity subtracted from the radioactivity present in the rat-injected mitochondria with an excess of unlabeled GH. As it represented 91% of total radioactivity (Fig 2B), it was highly significant ($P \leq 0.01$). GH presence in mitochondria within 15 min revealed that the hormone accumulation occurred early on.

In vitro, we quantified ^{125}I-hGH amount imported in proteinase K-treated mitochondria. This enzyme digests mitochondrial-surface associated hormone without damaging the membrane integrity and allowed us to determine that GH was specifically imported into the organelles. The time-dependent uptake (Fig 3A) showed a saturation curve, which increased sharply up to 5 min (80%), and then leveled off from 10 min to 30 min, demonstrating that the import was complete by 10 min. This kinetic determined 10 min as the optimal time period for mitochondrial GH uptake. The dose-dependent analysis of specific mitochondrial GH import (Fig 3B) was performed in presence of proteinase K removing on non-specific GH binding and potential GH binding to GHR which has been recently immunodetected within mitochondria. The mitochondrial incubation with increasing concentration of rGH added of ^{125}I-hGH resulted in a sigmoid curve which seemed to level off from 300 nM rGH. The inflexion point appeared between 200 and 300 nM rGH, and 200 nM was extended as the optimal and the most physiological concentration to obtain the

greatest GH accumulation. The amount of radioactivity uptaken was statistically significant at between 200 to 500 nM rGH ($P \leq 0.05$). Submitochondrial fractionation performed after 10 min rGH incubation and proteinase K treatment allowed to determine accumulated-^{125}I-hGH in the intermembrane space, inner membrane and matrix. As observed in the whole organelle, the accumulation of labeled GH in the intermembrane space was dependent on GH concentration used. The curve reached a plateau from 300 nM rGH, characteristic of saturation mechanisms supporting the hypothesis that this phenomenon is physiologically significant. In return, radioactivity amount detected at the level of the inner membrane linearly increased according to the GH concentrations, still remaining lower than the GH quantity present in the intermembrane space. At the sight of these results, this last subcompartment could behave like a reservoir acting as a buffer zone for GH deliverance. The matrix-associated amount of ^{125}I-hGH was very low whatever the GH concentration used, suggesting that the GH action remains bordered on the inner membrane.

To confirm the presence of radiolabeled GH within submitochondrial fractions and whole mitochondria, the hormone was put in evidence by SDS-PAGE and autoradiography from the samples incubated with 200 and 300 nM rGH (Fig 4). As previously described, GH was localized in whole mitochondria, intermembrane space and inner membrane. No signal was associated to the matrix fraction. Moreover, tested samples presenting GH accumulation were found to have the same molecular weight as native iodinated hGH (22 kDa). These results suggest that the radioactivity detected in the submitochondrial fraction came from an intact 22 kDa ^{125}I-hGH, lending weight to a functional implication of the hormone in mitochondrial activities.

The GH distribution was also confirmed by immunogold electron microscopy on highly purified mitochondrial fractions (Fig 5). GH immunoreactivity was mainly localized in mitochondria (Fig 5A). However, the LR-White resin, known to promote antigenicity preservation at the expense of morphological integrity, made impossible the distinction between the submitochondrial compartments. The signal detected in control corresponded to endogenous GH which was significantly increased by incubation of mitochondrial fraction with exogenous GH (Fig 5B).

At the sight of all these results, the presence of accessible sites for rGH within mitochondria implies this organelle as a direct target for GH action.

Effects of GH on mitochondrial metabolism

The short-term effects of GH were analyzed *in vitro* through the activity of 4 respiratory chain complexes. Kinetics were performed after a 15- to 30-min incubation at 37°C that did not affect the controls carried out without GH treatment (Fig 6). Two of the 4 enzymatic activities tested (Fig 6), NADH ubiquinone oxidoreductase (complex I) and ubiquinol cytochrome c reductase (complex III) (Fig 6, A, C), did not show any significant variation, whatever the incubation period or the GH concentration. In contrast, the incubation of mitochondrial fractions with GH induced a marked but transient reduction in both SDH and COX activity (Fig 6, B, D). The GH effects were time- and concentration-dependent. The COX activity (Fig 6D) showed a maximal and significant inhibition of 30% ($P \leq 0.05$) as early as 5 min after incubation with 100 nM rGH when compared to the controls. A 22% reduction of COX activity was obtained with 10 nM rGH after 15 min of incubation ($P \leq 0.05$). For 50 and 100 nM rGH, GH was effective for 15 min, while 30 min were required to restore a normal level of COX activity with 10 nM rGH. The inhibitory periods and intensities induced by increasing rGH concentrations on SDH activity (Fig 6B) were similar to the variations of COX activity under the same experimental conditions. The maximal reduction was reached within 5 min with 100 nM rGH (30%), and within 15 min with 10 nM rGH (25%; $P \leq 0.05$). In other words, the amount of reduction and the duration of the activity were characteristic of the GH effect on COX and SDH activity.

COX activity was also determined in uncoupled mitochondria with TMPD/ascorbate as a substrate, using the polarographic technique (Fig 7). As for the spectrophotometric experiments, mitochondrial COX activity was preserved at 37°C in the controls. The time-dependent variations observed in the oxygen consumption of the mitochondrial fractions incubated with 100 nM rGH confirmed the aforementioned data. The processes were rapid and transient (up to 5 min), since after 10 min pre-incubation with rGH no further effect on COX activity was detected. The rate of oxygen consumption decreased with the pre-incubation time, and the hormone action was continued only during the first 15 min of GH incubation ($P \leq 0.05$). These data confirmed the GH-induced inhibition of COX activity.

The oxygen consumption of the mitochondrial fractions was also measured with succinate as a substrate using polarography to determine the metabolic effects of GH on the total oxidative capacity (Fig 8). Classically, mitochondria are stored in a FFA-BSA to remove endogenous FFA, which is likely to induce mitochondrial uncoupling. As shown in Fig 8, the state-3 respiration rate was reduced by rGH with succinate as a substrate. The

state-4 respiration rate remained unchanged (data not shown). It would appear that rGH significantly reduces the oxidative phosphorylation efficiency at concentrations of 50 and 100 nM, when compared to the control ($P \leq 0.05$) up to a maximum of around 40% after a 10-min incubation. A slight reduction was also observed with 10 nM rGH, although the difference was not statistically significant.

The demonstration of GH presence in inter membrane space and association to the inner membrane reinforces that GH is biologically active on mitochondria through direct control of the respiratory chain functioning.

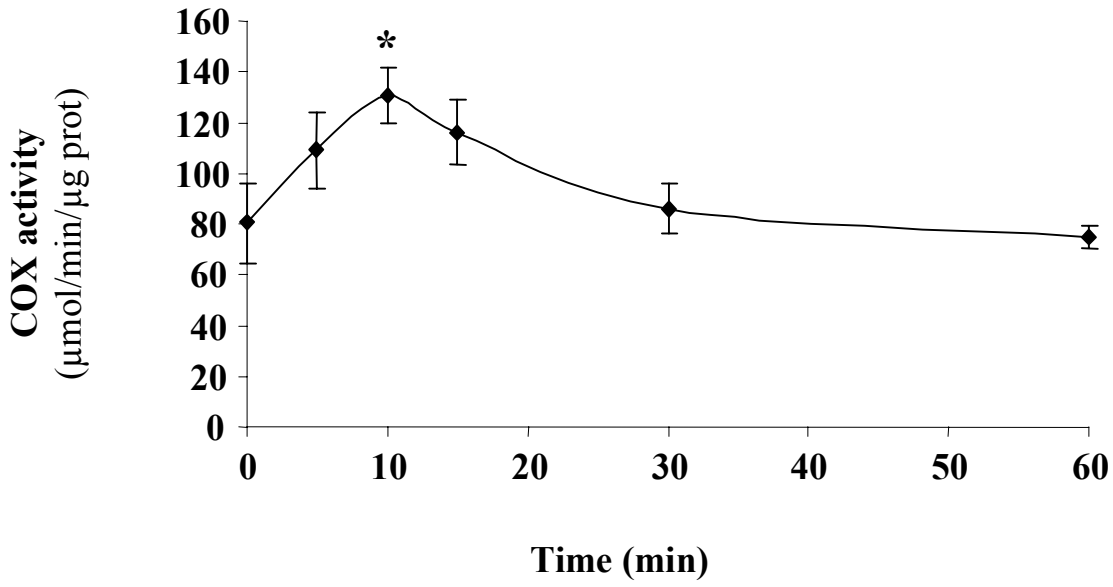
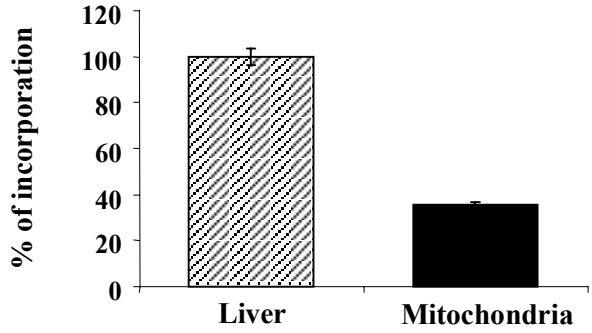

COX activity
(µmol/min/µg prot)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
0
10
20
30
40
50
60
Time (min)

Figure 1

A


% of incorporation
120
100
80
60
40
20
0
Liver
Mitochondria

B

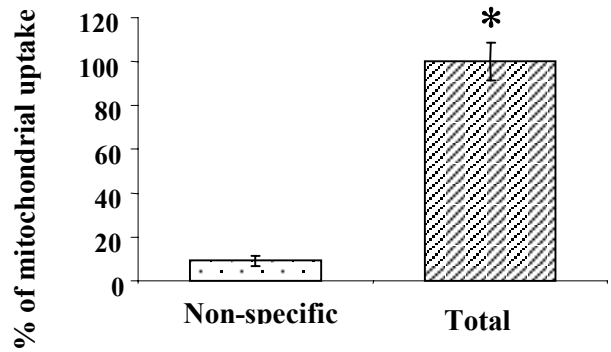
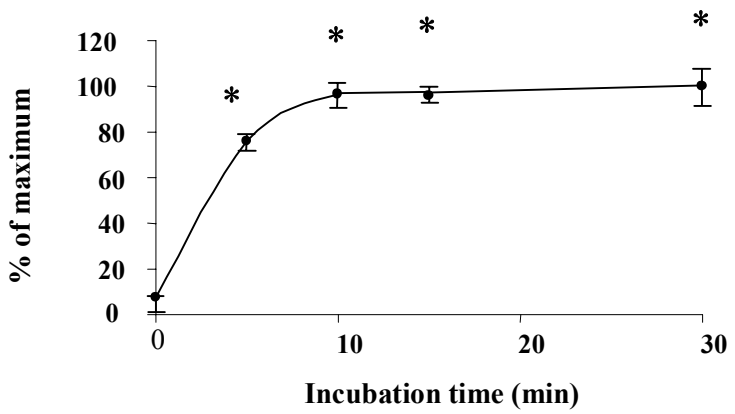

% of mitochondrial uptake
120
100
80
60
40
20
0
*
Non-specific
Total

Figure 2

A


120
100
80
60
40
20
0
% of maximum
0
10
20
30
Incubation time (min)
*
*
*
*

B

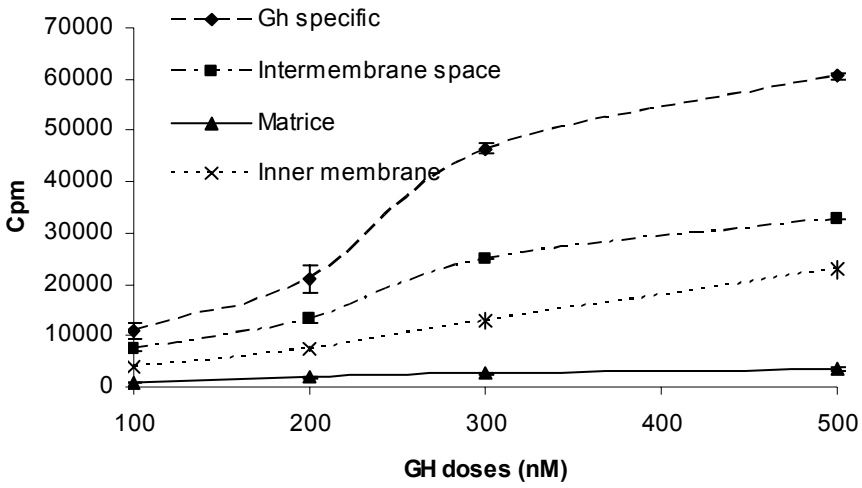
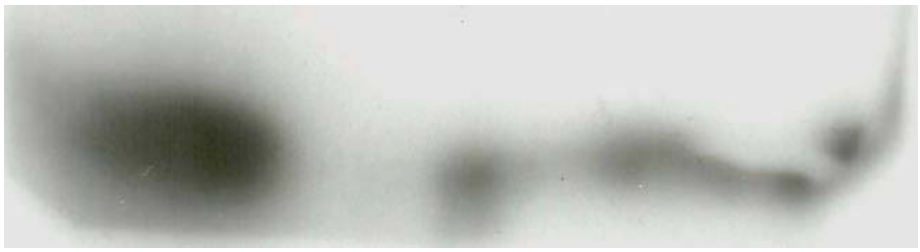

Gh specific
Intermembrane space
Matrice
Inner membrane
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Cpm
100
200
300
400
500
GH doses (nM)

Figure 3



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figure 4

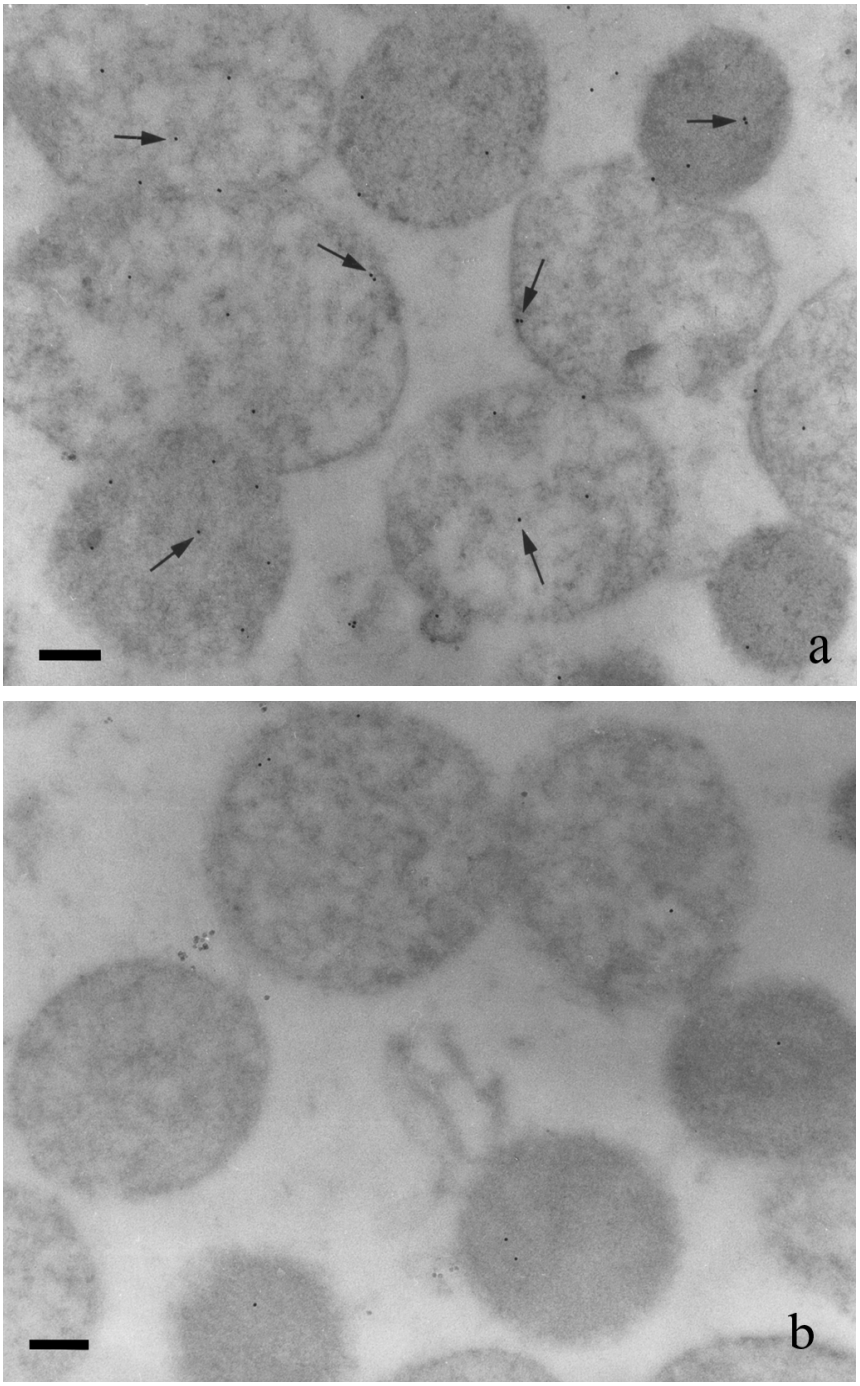


Figure 5

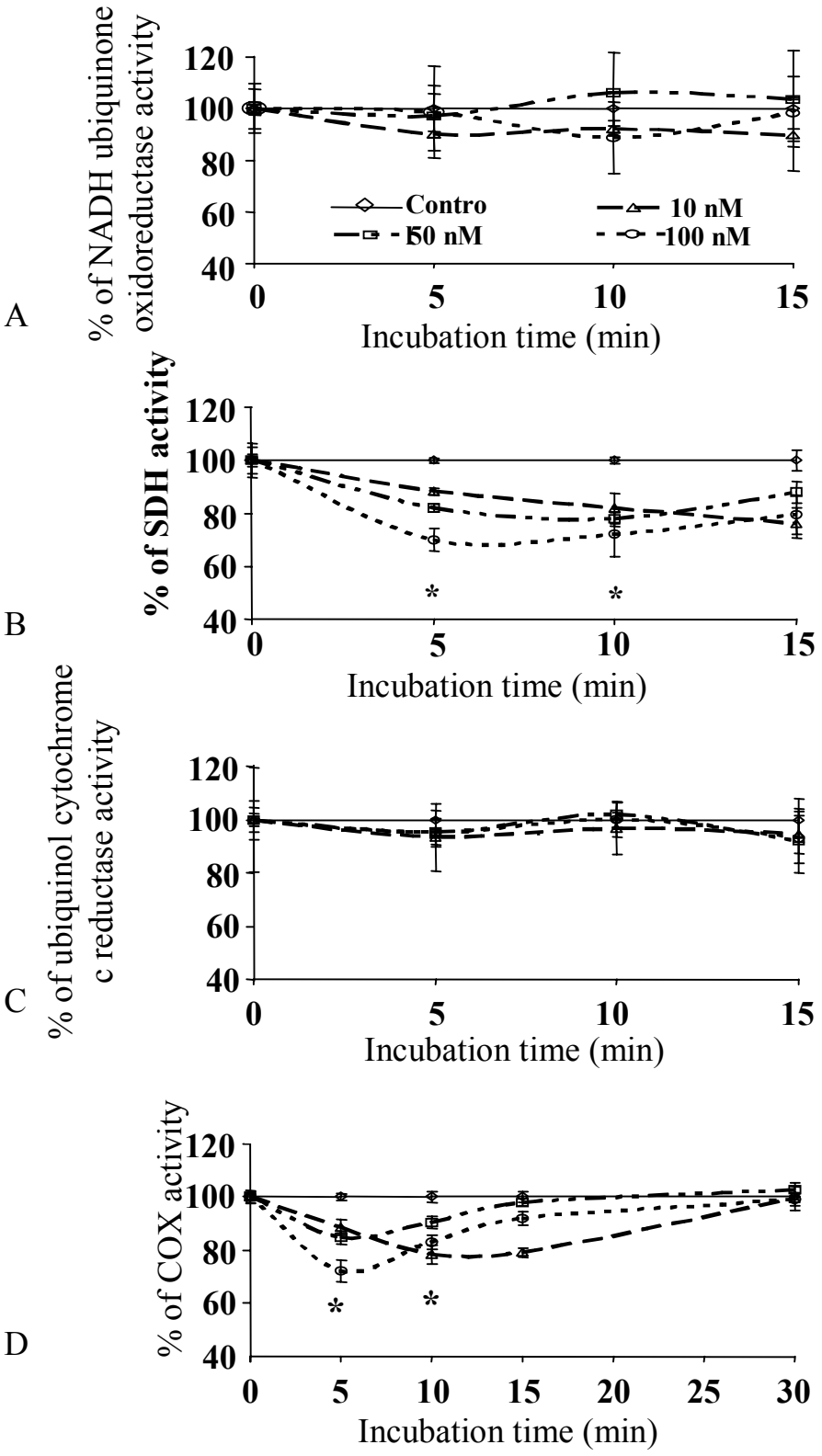

A
% of NADH ubiquinone oxidoreductase activity
120
100
80
60
40
Contro
10 nM
50 nM
100 nM
0
5
10
15
Incubation time (min)
B
% of SDH activity
120
100
80
60
40
*
*
0
5
10
15
Incubation time (min)
C
% of ubiquinol cytochrome c reductase activity
120
100
80
60
40
0
5
10
15
Incubation time (min)
D
% of COX activity
120
100
80
60
40
*
*
0
5
10
15
20
25
30
Incubation time (min)

Figure 6

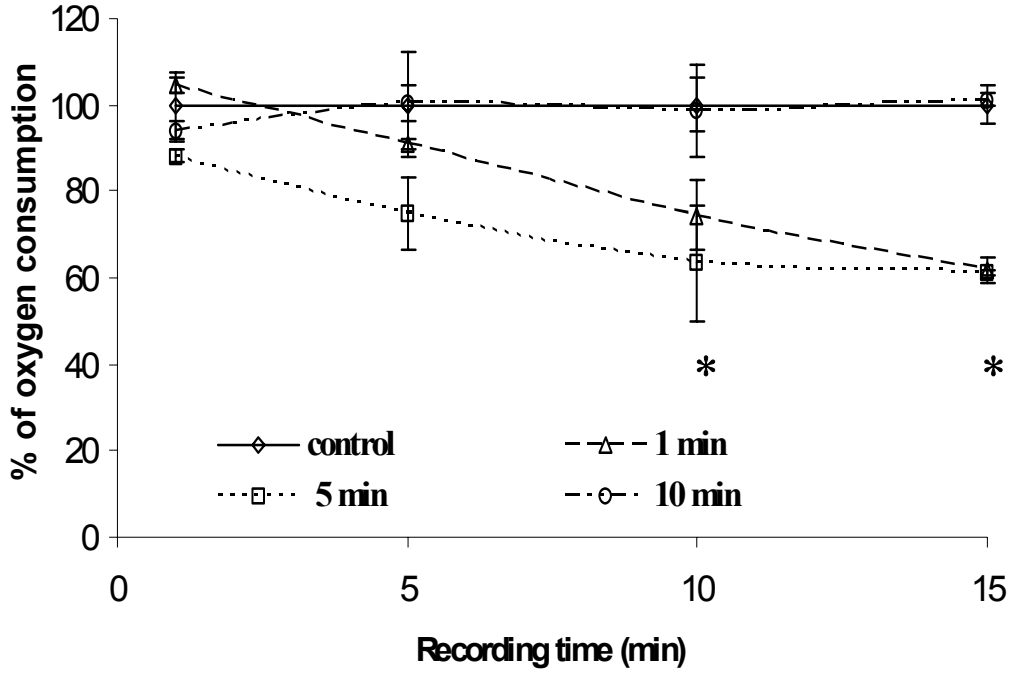

120
100
80
60
40
20
0
% of oxygen consumption
0
5
10
15
Recording time (min)
control
1 min
5 min
10 min
*
*

Figure 7

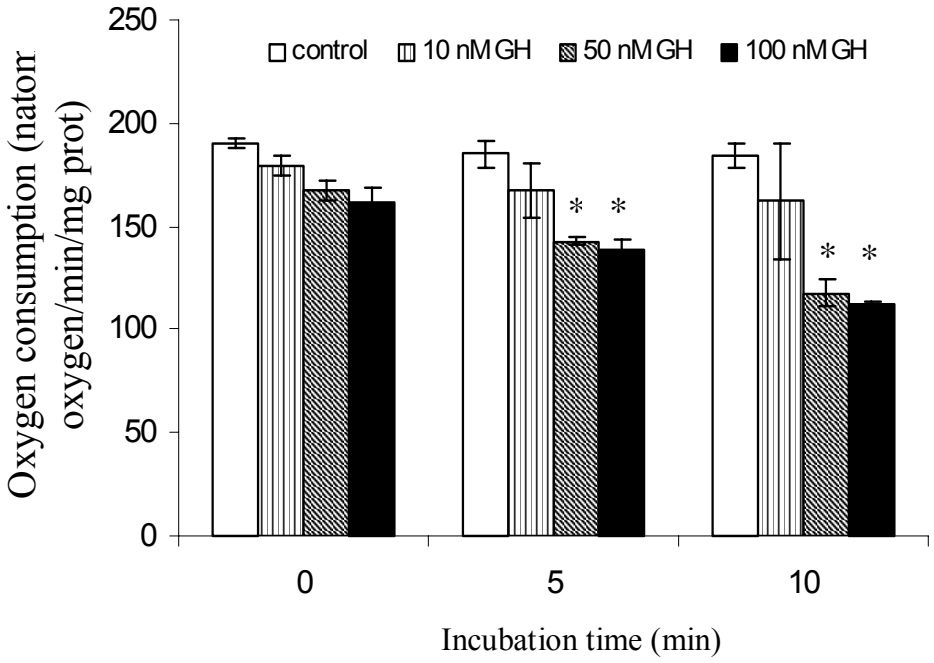

250
200
150
100
50
0
control
10 nM GH
50 nM GH
100 nM GH
Oxygen consumption (natom
oxygen/min/mg prot)
*
*
*
*
0
5
10
Incubation time (min)

Figure 8

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Time course of COX activation by rGH in BRL-GHR_{1-638}. Cells were incubated in the presence or absence of 50 nM rGH. Results are expressed as the mean ± SEM of 5 experiments. * Significant difference (P<0.05).

Figure 2: *In vivo* ^{125}I-hGH uptake in (A) whole liver and mitochondrial fraction, and (B) specific uptake by a mitochondrial fraction 15 min after *iv* injection. A: Percentage of GH incorporation *in vivo*. B: Specific GH uptake in mitochondria determined by hormone competition analysis. Each value represents the mean of 3 experiments ± SEM. The 100% value (0.5 nmoles of GH) corresponds to the amount of ^{125}I-hGH uptaken per mg of protein.

Figure 3: *In vitro* uptake of ^{125}I-hGH by mitochondrial fractions. A: time course of ^{125}I-hGH uptake. B: uptake of ^{125}I-hGH by submitochondrial fractions incubated for 10 min with increasing rGH concentrations of between 100 and 500 nM, with ^{125}I-hGH as a tracer. Data are expressed as the mean of 3 experiments ± SEM.

Figure 4: SDS-PAGE and autoradiography of total ^{125}I-hGH mitochondrial uptake after proteinase K treatment being performed with 200 nM (*lane 1*) and 300 nM rGH (*lane 2*); of ^{125}I-hGH matrix fraction being performed with 200 nM (*lane 3*) and 300 nM rGH (*lane 4*); of native iodinated GH (*lane 5*); of ^{125}I-hGH intermembrane space being performed with 200 nM (*lane 6*) and 300 nM rGH (*lane 7*); and of ^{125}I-hGH inner membrane being performed with 200 nM (*lane 8*) and 300 nM rGH (*lane 9*).

Figure 5: Electron micrograph of mitochondria purified from rat liver incubated for 10 min (A) with or (B) without 100 nM rGH, then embedded in LR White resin. Only mitochondria are to be observed. GH immunogold labeling (10 nm-gold particle) was observed in mitochondria, in the matrix, and on the inner membrane, both (A) after incubation with rGH and (B) in the control. The labeling density increased after GH incubation. Bar represents 200 nm.

Figure 6: Direct effects of rGH on: (A) NADH ubiquinone oxidoreductase, (B) SDH, (C) ubiquinol cytochrome c reductase and (D) COX activity. The mitochondria were incubated at

37°C with increasing GH concentrations. The results represent the mean of 3 experiments ± SEM. They are expressed as a percentage of those obtained with the controls, which were taken to represent 100% activity and whose values were 970, 1060, 1080 and 910 nmoles/min/mg protein for NADH ubiquinone oxidoreductase, SDH, ubiquinol cytochrome c reductase and COX, respectively.

Figure 7: The effects of rGH on the inhibition of COX activity measured by polarography. Mitochondria were pre-incubated with or without 100 nM rGH for 1, 5 and 10 min. The Figure shows oxygraph recordings of COX activity for 15 min after addition of ascorbate plus TMPD. The data represent the mean ± SEM of 3 experiments.

Figure 8: The effects of GH on the inhibition of succinate oxidation by mitochondria (state 3). Mitochondria were pre-incubated for 0, 5 or 10 min at 37°C at the indicated rGH concentrations. Succinate and ADP were then added to final concentrations of 5 mM and 100 μM ADP, respectively.

DISCUSSION

This study takes place in resurgent reports that focused on knowing the physiological role played by mitochondria at the cellular level. An endocrine regulation of mitochondrial activity is emerging from recent observations, particularly with T2 and T3. T3 is considered as a major regulator of mitochondrial activity which probably induces a direct influence on the organelle through a mediator: T2. Reports from the seventies had also demonstrated that GH partially restored (38) disruptions caused by hypophysectomy on protein synthesis (39), cytochrome concentration, enzymatic activity and the rate of protein turnover (40) in liver mitochondria. Some studies have also suggested an improvement in mitochondrial respiration (22-25) that has never been confirmed by Mutvei *et al*. (41).

We investigated GH action on mitochondrial metabolism to determine whether the hormone was directly able to regulate respiratory activity in mitochondria.

The demonstration for the first time of an increase of COX activity in BRL-GHR_{1-638} cells incubated with the hormone confirms the role played by GH on mitochondrial metabolism. The way by which GH could promote cellular respiration is partly revealed by the existence of a hormonal influence on the IV complex. On whole cells, GH effect likely resulted from GHR-dependent signal transduction pathways. Most of them are well described but the mechanisms' complexity impairs an obvious understanding of downstream events, including the endocrine regulation targets of cellular metabolism.

The demonstration of GH localization into mitochondria led us to the assumption that the hormone could directly control mitochondrial activity. Radiolabeled GH is specifically accumulated *in vivo* in several subcellular compartments including lysosomal bodies, the Golgi apparatus, the nucleus and mitochondria in pituitary (21) and in liver (18) where specific imported GH represented up to 28% of total liver uptake. Our results were closely related to those obtained in the last study (18) since the specific radioactivity represents 35% of total liver uptake. The present study investigates the mitochondrial GH import *in vitro* on mitochondrial fractions independently of the cytosolic environment. Ten min exposure of isolated mitochondria to the hormone was sufficient to obtain the maximal GH accumulation in an intact and immunologically reactive form as shown by SDS-PAGE and autoradiography. The treatment of mitochondria with increasing GH concentrations revealed a saturable processing according to results obtained by Rezvani on liver sections incubated *in vitro* with ^{3}H-hGH (16). This suggests that GH, under these *in vitro* conditions, probably follows an import pathway similar to that for the endogenous protein of living cells.

By using fractionation, GH could be for the first time precisely localized at the submitochondrial level. The hormone was mainly distributed within mitochondria as shown by the electron microscopic study and most particularly at the level of the inter membrane space and inner membrane as revealed SDS-PAGE and autoradiography analysis. From the dose-dependent experiments, we postulated that the inter membrane space could behave as a reservoir for GH accumulation, regulating the GH likely to interact with the inner membrane. GH is a protein of 22 kDa without any known mitochondrial targeting presequence and did not seem to be modified by mitochondria interaction. The protein translocation in mitochondrial fractions independently of cytosolic environment suggests a non conventional entry mechanism for the hormone, particularly because of the absence of clathrin-coated pits and caveolae pathways. Several proteins have been demonstrated to accumulate at different mitochondrial levels including the inter membrane space, the inner membrane and the matrix. The first report (30) concerns a metallothionein (a 14 kDa protein) implicated in cellular zinc distribution which was imported into the inter membrane space of liver mitochondria when they were incubated *in vitro* with the protein. The uptake mechanism was not described but this study showed for the first time a possible mean of entry for a peptide at least through the outer mitochondrial membrane. A second study (31) characterized a new way of entry through the outer and inner mitochondrial membranes for the mitochondrial transcription factor (Mtf1p). This protein was found *in vivo* as well as *in vitro* in the matrix and associated to the inner membrane. The translocation of Mtf1p into the matrix, unlike most mitochondrial matrix proteins hitherto studied, did not require membrane potential, ATP hydrolysis and membrane receptors. The authors proposed that Mtf1p could adopt an import-competent conformation favoring the translocation. However, the possibility that GH could specifically interact with its receptor at the mitochondrial level is a hypothesis that we could put forward owing to the GHR detection into mitochondria by electronic microscopy analysis (Vivancos *et al.*, in preparation).

At the sight of these previous results, we attempted to demonstrate the physiological consistency of *in vitro* GH targeting towards liver mitochondria. We estimated liver mitochondrial oxidative capacity by measuring oxygen consumption of *in vitro* GH-stimulated mitochondrial fractions with succinate (state 4) and ADP (state 3). Liver mitochondrial oxidative capacity was reduced by GH after 5 min incubation when ADP was present (state 3), without any change in the state-4 substrate oxidation rate. At the same time, enzymatic activities of respiratory chain complexes were analyzed in attempt to identify a specific site for GH action. The GH-induced inhibition of COX activity observed by

spectrophotometry was effective as early as 5 min after GH addition, and was confirmed by polarography. Similarly, GH had an effect on succinate dehydrogenase activity within 5 min, whereas no such effect was detected on NADH ubiquinone oxidoreductase or ubiquinol cytochrome c reductase activity. These observations are reinforced by the submitochondrial GH localization including the inter membrane space and the inner membrane. We speculated that the II and IV complexes could be a direct target for GH involved in the short-term influence of the hormone on the organelle, according to what was demonstrated for 3',5-di-iodothyronin (T2). In addition to the detection of T2-binding sites in the organelle (27, 28), Goglia *et al.* (26) found that T2 binds to a subunit of COX, leading to a conformational change of the enzyme. The consequence was a hormonal activation of the respiratory chain which occurred on a level with proton motive force and intramitochondrial ATP/ADP ratio control of oxidation/phosphorylation.

As a conclusion, we could confirm that GH acts on mitochondrial metabolism by two mechanisms. Firstly, on whole cell, GH stimulates respiration by signal transduction pathways, and secondly, GH exerts directly a down-regulation on respiration at the mitochondrial level.

REFERENCES

1. Harvey, S., Scanes, C. G. & Daughaday, W. H. (1995) in *Growth Hormone*, eds. CRC Press, Inc., pp 351-389.

2. Leung, D. W., Spencer, S. A., Cachianes, G., Hammonds, R. G., Collins, C., Henzel, W. J., Barnard, R., Waters, M. J. & Wood, W. I. (1987) *Nature* 330, 537-543.

3. Mathews, L. S., Enberg, B. & Norstedt, G. (1989) *J. Biol. Chem*. 264, 9905-9910.

4. Moldrup, A., Allevato, G., Dyrberg, T., Nielsen, J. H. & Billestrup, N. (1991) *J. Biol. Chem*. 266, 17441-17445.

5. Möller, C., Hansson, A., Enberg, B., Lobie, P. E. & Norstedt, G. (1992) *J. Biol. Chem*. 267, 23403-23408.

6. Francis, S. M., Enerbäck, S., Möller, C., Enberg, B. & Norstedt, G. (1993) *Mol. Endocrinol*. 7, 972-978.

7. Thompson, B. J., Shang, C. A. & Waters, M. J. (2000) *Endocrinology* 141, 4321-4324.

8. Mertani, H. C., Zhu, T., Goh, E. L., Lee, K. O., Morel, G. & Lobie, P. E., (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 21464-21475.

9. Roupas, P. & Herington, A. C. (1988) *Mol. Cell. Endocrinol*. 57, 93-99.

10. Roupas, P. & Herington, A. C. (1989) *Mol. Cell. Endocrinol*. 61, 1-12.

11. Eshet, R., Peleg, S., & Laron, Z. (1984) *Acta. Endocrinol*. 107, 9-15.

12. Lobie, P. E., Sadir, R., Graichen, R., Mertani, H. C. & Morel, G. (1999) *Exp. Cell. Res*. 246, 47-55.

13. Barrazone, P., Lesniak, M. A., Gorden, P., Van Obberghen, E., Carpentier, J. L. & Orci, L. (1980) *J. Cell. Biol*. 87, 360-369.

14. Ilondo M. M., Vanderschueren-Lodeweyckx, M., Courtoy, P. J. & De Meyts, P. (1992) *Endocrinology* 130, 2037-2044.

15. Bick, T., Youdim, M. B. H. & Hochberg, Z. (1989) *Endocrinology* 125, 1718-1722.

16. Rezvani, I., Maddaiah, V. T., Collipp, P. J., Thomas, J. & Chen, S. Y. (1973) *Biochem. Med*. 7, 432-440.

17. Bonifacino, J. S., Roguin, L. P. & Paladini, A. C. (1983) *Biochem J.* 214, 121-134.

18. Lobie, P. E., Mertani, H., Morel, G., Morales-Bustos, O., Norstedt, G. & Waters, M. J. (1994) *J. Biol. Chem*. 269, 21330-21339.

19. Maddaiah, V. T., Rezvani, I., Chen, S. Y. & Collipp, P. J. (1970) *Biochem. Med*. 4, 492-499.

20. Groves, W. E., Houts, G. E. & Bayse, G. S. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 264, 472-480.

21. Mertani, H. C., Waters, M. J. & Morel, G. (1996) *Neuroendocrinology* 63, 257-268.

22. Katkocin, D. M., Gupata, K. M., Collipp, P. J. & Maddaiah, V. T. (1979) *Biochem. Med.* 22, 134-144.

23. Clejan, S., Collipp, P. J. & Maddaiah, V. T. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 203, 744-752

24. Maddaiah, V. T., Clejan, S., Palekar, A. G. & Collipp, P. J. (1981) *Arch. Biochem. Biophys*. 210, 666-677.

25. Maddaiah, V. T. & Clejan, S. (1986) *Endocrinology* 119, 250-252.

26. Goglia, F., Lanni, A., Horst, C., Moreno, M. & Thoma, R. (1994) *J. Mol. Endocrinol.* 13, 275-282.

27. Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A. & Goglia, F. (1994) *Moll. Cell. Endocrinol*. 99, 89-94.

28. Leary, S. C., Barton, K. N. & Ballantyne, J. S. (1996) *Gen. Comp. Endocrinol*. 104, 61-66.

29. Arnold, S., Goglia, F. & Kadenbach, B. (1998) *Eur. J. Biochem.* 252, 325-330.

30. Ye, B., Maret, W. & Vallee, B. L. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2317-2322.

31. Biswas, T.K. & Getz, G.S. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 45704-45714.

32. Mathews, L. S., Enberg, B. & Norstedt, G. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 9905-9910.

33. Ardail, D., Gasnier, F., Lermé, F., Simonot, C., Louisot, P. & Gateau-Roesch, O.(1993) *J. Biol. Chem.* 268, 25985-25992.

34. Vance, J. E. (1990) *J. Biol. Chem*. 265, 7248-7256.

35. Rieske, J. S. (1967) *Methods Enzymol.* 10, 239-245.

36. Hizuka, N., Gorden, P., Lesniak, M. A., Van Obberghen, E., Carpentier, J. L. & Orci, L. (1981) *J. Biol. Chem*. 256, 4591-4597.

37. Postel-Vinay, M. C., Kayser, C. & Desbuquois, B. (1982) *Endocrinology* 111, 244-251.

38. Maddaiah, V. T., Collipp, P. J., Lin, J. H., Duffy, J. L. (1976) *Biochem. Med*. 16, 47-54.

39. Maddaiah, V. T., Sharma, R. K., Balachander, V., Rezvani, I., Collipp, P. J. & Chen, S. Y. (1973) *J. Biol. Chem.* 218, 4263-4268.

40. Maddaiah, V. T., Weston, G. L., Chen, S. Y. & Collipp, P. J. (1976) *Arch. Biochem. Biophys*. 173, 225-230.

41. Mutvei A., Husman B., Andersson G. and Nelson B.D. (1989) *Acta. Endocrinol. (Copenh.)* 121: 23-228

DISCUSSION GENERALE

La GH est une hormone polypeptidique sécrétée par les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure. Elle est libérée d'une manière pulsatile par l'action concertée de plusieurs hormones dont les plus importantes sont la GHRH, la somatostatine, la ghréline et la leptine (Epelbaum *et al*., 1977 ; Bloch *et al*., 1983, 1984 ; Barinaga *et al*., 1985 ; Morel *et al*., 1989 ; Giustina et Veldhui, 1998 ; Kopchick et Andry, 2000). Une fois libérée dans le sang, la GH va agir au niveau de son principal site d'action, le foie, où elle va stimuler la production d'IGF-1 (Roberts *et al*., 1987 ; Daughaday et Rotwein, 1989). Ce dernier facteur représente le régulateur métabolique majeur de l'organisme. Il exerce des effets anaboliques au niveau du muscle et des effets cataboliques sur les graisses. Il joue également un rôle important dans la médiation de la croissance osseuse. L'IGF-1 circulant va compléter une boucle de rétrocontrôle afin de réguler la sécrétion de GH au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse. Cependant, la GH est également capable d'agir directement sur ces cellules-cibles en interagissant avec son récepteur spécifique, le GHR (Gritching *et al*., 1983). Elle induit alors directement des effets, elle peut notamment réguler le métabolisme énergétique cellulaire. Les effets pléiotropes exercés par cette hormone en font une molécule d'intérêt dont les mécanismes d'actions ne sont pas encore totalement élucidés.

La liaison de la GH à son récepteur permet d'induire plusieurs voies de transduction du signal (pour revue, Zhu *et al*., 2001). Le GHR appartient à la superfamille des récepteurs des cytokines dont les caractéristiques principales sont la présence d'un seul domaine transmembranaire et l'absence d'activité tyrosine kinase intrinsèque (Bazan, 1989 ; Cosman *et al*., 1990 ; Ilhe *et al*., 1995). L'événement initiateur de la signalisation intracellulaire faisant suite à la liaison de l'hormone sur son dimère de récepteur est l'activation de la protéine tyrosine kinase Jak2 (Frank *et al*., 1994 ; Thirone *et al*., 1999) qui joue le rôle d'un véritable chef d'orchestre dans l'organisation de la signalisation intracellulaire (Argetsinger *et al*., 1993 ; Silva *et al*., 1993 ; Foster *et al*., 1998). La protéine Jak2 s'associe au GHR au niveau d'une région particulière du récepteur riche en résidus proline appelée la boîte 1 (Sotiropoulos *et al*., 1994 ; Vanderkuur *et al*., 1994). Hormis la voie dépendante du calcium extracellulaire, cette protéine initie toutes les voies de transduction du signal responsables des actions biologiques déclenchées par la GH. Ce sont les cascades de phosphorylations allant du GHR aux molécules de signalisation qui véhiculent le signal. Ces différentes voies

sont : 1) la voie des MAPK, 2) la voie des Jak/STAT, 3) la voie de la PI-3 kinase et, 4) la voie de la PKC. L'aboutissement de ces voies se traduit par des effets physiologiques et métaboliques (pour revue, Herrington et Carter-Su, 2001 ; Zhu *et al*., 2001).

L'action de la GH sur l'activité respiratoire mitochondriale a été étudiée dans les années 70. Les expérimentations étaient réalisées sur des rats hypophysectomisés qui subissaient une hormonothérapie de substitution par la GH qui restaurait la fonction mitochondriale (Katkocin *et al*., 1979 ; Clejean *et al*., 1981 ; Maddaiah et Clejean, 1986). Cependant, cette fonction accordée à la GH n'a pas toujours été démontrée (Postel-vinay *et al*., 1982 ; Mutvei *et al*., 1989). Plus récemment, une étude réalisée sur des mitochondries isolées de muscle squelettique de rat ayant subi des injections chroniques de GH n'ont montré aucun effet de l'hormone sur la fonction oxydative mitochondriale (Peyreigne *et al*., 2002). Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'implication du domaine intracellulaire du GHR dans la stimulation de la respiration mitochondriale en réponse à une stimulation par la GH (*Article I*). Pour cela, nous avons étudié les variations d'autofluorescence du NADH et des flavoprotéines (FP) dans des cellules CHO exprimant différentes constructions du GHR en utilisant dans un premier temps la technique de microscopie biphotonique. Cette méthode permet de réaliser des études directement sur cellules vivantes et constitue un outil pour observer les variations d'oxydation du NADH et de réduction des FP permettant de corréler l'état du métabolisme énergétique cellulaire au fonctionnement mitochondrial (Saks *et al*., 1998). Une diminution de l'autofluorescence associée au NADH et une augmentation de l'autofluorescence liée aux FP sont corrélées à une stimulation de la respiration mitochondriale. Ainsi, la stimulation par la GH de cellules surexprimant le GHR entier (CHO-GHR_{1-638}) montre une diminution de l'autofluorescence du NADH et une augmentation de celle des FP indiquant une stimulation de la respiration. Lorsque le GHR est délété de la totalité de son domaine extracellulaire, aucune variation des autofluorescences du NADH ou des FP n'a été induite en réponse à une stimulation par la GH, indiquant l'importance du domaine intracellulaire dans la réponse mitochondriale à l'hormone. Les résultats que nous avons obtenus dans un second temps par oxygraphie sur ces deux mêmes types de cellules ont confirmé ceux observés en microscopie biphotonique. Les cellules CHO exprimant le GHR dépourvu de domaine intracellulaire consomment autant d'oxygène lors d'une stimulation par la GH que des cellules qui expriment le GHR intégral sans stimulation par la GH. Lorsque les cellules CHO-GHR_{1-638} sont incubées en présence de GH, leur consommation d'oxygène peut être augmentée de 20% dès 2 minutes, jusqu'à plus de 60% au bout de 10 minutes (*Articles I et II*). Des cellules BRL exprimant

également le GHR entier ont montré une augmentation maximale de 50% par rapport à la valeur contrôle de l'activité cytochrome c oxydase (complexe IV) 10 minutes après une incubation avec la GH (*Article III*). A ce stade, il est alors possible d'impliquer le domaine intracellulaire du GHR dans la stimulation de l'activité respiratoire par l'intermédiaire du complexe IV (Figure 37). L'observation la plus étonnante est l'absence de variation de l'autofluorescence du NADH et une augmentation de celle des FP dans les cellules exprimant un GHR délété de la boîte 1, soulignant l'implication de cette région dans la stimulation de l'activité respiratoire. De plus, le profil de la consommation d'oxygène de ces cellules lors d'une stimulation par la GH est identique à celui de cellules CHO-GHR_{1-638} non stimulées par l'hormone. Puisque ce type cellulaire est incapable d'induire l'oxydation du NADH et une augmentation de la consommation d'oxygène, un véritable rôle de stimulateur de l'activité respiratoire mitochondriale peut être attribué à la boîte 1. La seule augmentation de l'autofluorescence des FP observée dans ce dernier cas suggère que l'intervention de la boîte 1 se limite à l'oxydation du NADH (Figure 37). Ces résultats nous permettent de proposer une régulation différente pour le NADH et les FP. Il est depuis longtemps admis que l'efficacité des phosphorylations oxydatives dépend de la nature des substrats utilisée par la chaîne respiratoire (Leverve et Fontaine, 2001). En fonction de certaines conditions physiologiques ou pathologiques, les hépatocytes sont capables de supporter des capacités respiratoires très différentes, suggérant l'adaptation des fonctions mitochondriales selon la demande cellulaire (Nogueira *et al.*, 2001). Ceci supposerait l'existence de 2 sous-populations mitochondriales comme cela a été illustré par l'absence quasi-totale de superposition des signaux d'autofluorescences liées au NADH et aux FP au moment de l'observation simultanée des deux excitations (*Article I*). En revanche, la région C-terminale du domaine intracellulaire du GHR ne semble pas être impliquée dans cette réponse à la GH puisque les cellules exprimant le GHR dépourvu du domaine 455-638 présentent des intensités d'autofluorescence du NADH et des FP ainsi qu'un profil de consommation d'oxygène similaires à ceux de cellules exprimant le GHR entier suite à une stimulation par la GH. Cependant, il est à noter que la consommation d'oxygène des cellules CHO-GHR_{1-454} reste inférieure à celle des cellules CHO-GHR_{1-638}. Ce domaine est plus particulièrement impliqué dans la signalisation de la PKC qui permet d'activer l'entrée de calcium dans la cellule (Billestrup *et al.*, 1995). Lorsque la concentration cytosolique en ions Ca^{2+} est trop élevée, il a été montré que la mitochondrie participait à l'homéostasie caclique (pour revue, Carafoli, 2002 ; Ganitkevich, 2003). Aussi, il est de plus en plus admis qu'une surcharge mitochondriale en ions Ca^{2+} participe au processus de mort cellulaire par apoptose (pour

revue, Sayer, 2002). Par l'activation de la voie de la PKC, la GH pourrait ainsi influer sur le contrôle de l'entrée du calcium dans la mitochondrie et exercer un contrôle sur le processus d'apoptose. D'une manière plus générale, le calcium pourrait être impliqué dans l'activité respiratoire lorsque sa concentration intramitochondriale est physiologique.

En parallèle à la transduction du signal, le complexe GH-GHR_2 est internalisé selon un processus classique d'endocytose par la voie des vésicules à clathrine (Eshet *et al*., 1989) ou comme cela a été montré dans le laboratoire, par la voie des cavéoles (Lobie *et al*., 1999). La signalisation intracellulaire et l'internalisation semblent avoir lieu d'une façon totalement indépendante. Récemment, une étude d'internalisation menée en microscopie confocale sur différentes constructions du GHR exprimées par des cellules CHO (Mertani *et al*., 2003) a permis de mettre en évidence que l'activité tyrosine kinase de la protéine Jak2 et/ou les phosphorylations des résidus tyrosine du GHR n'étaient pas nécessaires à l'internalisation du complexe GH-GHR_2. Ces résultats ont confirmé l'étude de Alves dos Santos *et al*. (2001a) qui démontrait l'indépendance de la transduction de signal *via* la protéine Jak2 vis-à-vis de la conjugaison de l'ubiquitine au GHR, de l'endocytose par la voie des vésicules à clathrine et de la dégradation lysosomale. Cependant, la signalisation intracellulaire peut perdurer au niveau des compartiments endosomaux (Alves dos Santos *et al*., 2001b). L'internalisation du complexe par la voie des vésicules à clathrines est dépendante d'un motif présent dans le domaine intracellulaire du GHR appelé motif UbE. Il se situe entre les résidus 322 et 331 chez le lapin et le résidu 327 (346 chez le rat) joue un rôle majeur dans la conjugaison de l'ubiquitine au récepteur. Suite à cette conjugaison, le processus de dégradation protéasomale est déclenché et se poursuit dans les compartiments lysosomaux où le complexe GH-GHR_2 a été guidé par les vésicules recouvertes de clathrine (van Kerkhof et Strous, 2001). L'étude réalisée en microscopie confocale de l'internalisation de la GH et du GHR dans les cellules CHO exprimant un GHR dont le résidu phénylalanine est muté en alanine (CHO-GHR_{F346A}) (*Article I*) a permis de mettre en évidence un processus d'internalisation sérieusement perturbé comme l'ont décrit Allevato *et al.* (1995). Bien que l'immunoréactivité apparentée à la GH était détectable dès 1 minute, l'intensité du signal demeurait limitée à un faible signal jusqu'à 30 minutes. Simultanément, l'immunoréactivité liée au GHR restait confinée à la région périnucléaire. Puis, entre 30 et 60 minutes après une stimulation par la GH, les signaux fluorescents correspondant à la GH et au GHR ont subi une forte augmentation dans les compartiments cytoplasmique et nucléaire. La mutation du résidu F346 retarde considérablement l'internalisation du complexe GH-GHR_2. Mais ceci n'explique pas le faible

signal observé jusqu'à 30 minutes. Ce faible taux d'internalisation pourrait être attribué à la voie des cavéoles comme cela a déjà été montré au niveau de cellules CHO-GHR_{1-638} exprimant le GHR entier (Lobie *et al*., 1999) ou un autre récepteur des cytokines, l'IFNγ-R (Sadir *et al*., 2001). Le résidu F346 semble également jouer un rôle important dans la respiration mitochondriale. Bien que les processus d'internalisation et de transduction du signal soient cloisonnés au moment de leur initiation, leur interaction est envisageable une fois les processus engagés. En effet, la GH induit une augmentation de l'autofluorescence liée au NADH dans les cellules CHO-GHR_{F346A} et une diminution de leur consommation d'oxygène se traduisant par une diminution de l'activité respiratoire mitochondriale. Comme le GHR exprimé par ces cellules possède la boîte 1, une activation par la protéine Jak2 est possible, mais la mutation ponctuelle du résidu F346 en alanine inhibe l'activation de la respiration. L'internalisation par la voie des vésicules à clathrine régulerait alors positivement la respiration cellulaire, mais le mécanisme précis de ce contrôle n'est pas encore avéré (Figure 37). Une régulation de la transduction du signal par les molécules impliquées dans le processus d'internalisation a déjà été mise en évidence (Alves dos Santos *et al*., 2001b). L'utilisation de l'inhibiteur MG132 du protéasome a prolongé l'activité du GHR et de la protéine Jak2 suite à une stimulation par la GH probablement par stabilisation des phopshorylations de leurs résidus tyrosine (Alves dos Santos *et al*., 2001b). Aussi, le contrôle de la disponibilité des GHR au niveau de la surface cellulaire a été démontrée par les activités du protéasome et de la protéine Jak2 lors d'une exposition à la GH (Moulin *et al*., 2003).

La voie des cavéoles constitue une alternative à l'endocytose dépendante des vésicules à clathrine, mais ce rôle a longtemps été controversé. Les cavéoles sont des invaginations vésiculaires localisées au niveau de la membrane plasmique. Elles sont formées suite à l'accumulation en une même région de la membrane plasmique de cholestérol, de glycosphingolipides et de cavéoline-1 (Glenney et Soppet, 1992 ; Murata *et al*., 1995 ; Li *et al*., 1996b). La cavéoline-1 est une protéine membranaire de 21-24 kDa et représente le marqueur principal des cavéoles *in vivo* (Kurzchalia *et al*., 1992 ; Rothberg *et al*., 1992 ; Scherer *et al*., 1997). Bien que le rôle premier attribué aux cavéoles fut le trafic trans-cellulaire de protéines sériques dans les cellules endothéliales (Palade, 1953 ; Yamada, 1955), leur fonction s'est étendue entre autres au processus d'endocytose (Parton, 1996 ; Anderson, 1998) ainsi qu'à l'homéostasie et au transport du cholestérol (Fielding et Fielding, 2001). Elle a été plus particulièrement étudiée dans le cadre de l'infection cellulaire par le virus SV-

40 (Pelkmans *et al*., 2001). L'étude que nous avons menée en microscopie électronique sur le foie de rat (*Article II*) nous a permis de confirmer les résultats obtenus sur des cellules CHO exprimant le GHR entier par Lobie *et al*. (1999). Dans cette dernière étude, les auteurs ont mis en évidence deux voies d'internalisation du complexe GH-GHR_2 : celle des vésicules à clathrine et celle des cavéoles. Plus tard, l'implication de la voie des cavéoles a été mise en évidence pour d'autres cytokines telles que l'IFN-γ (Sadir *et al*., 2001 ; Subramaniam *et al*., 2002) et le TGF-β (Razani *et al*., 2001a ; Di Guglielmo *et al*., 2003 ; Felberbaum-Corti *et al*., 2003). Le foie constituant le principal tissu-cible de la GH, nous nous sommes intéressés à l'internalisation de l'hormone par la voie des cavéoles dans le foie de rat. Nous avons mis en évidence par immunocytologie des colocalisations de la GH et/ou du GHR avec la cavéoline-1 au niveau de l'espace de Disse, du cytoplasme, de la périphérie et à l'intérieur du compartiment mitochondrial (*Article II*). La GH a été retrouvée auparavant dans des compartiments non hydrolysants tels que l'appareil de Golgi, le noyau (Lobie *et al*., 1994 ; Mertani *et al*., 1996, 2003) et les mitochondries (Maddaiah *et al*., 1970 ; Groves *et al*., 1972 ; Lobie *et al*., 1994 ; Mertani *et al*., 1996). Nous privilégions l'utilisation de cavéoles pour une redistribution de l'hormone dans les compartiments non endosomaux, mais une étude récente montre que, dans la cadre de l'internalisation du TGF-β, cette voie avantagerait plutôt le ciblage vers la dégradation lysosomale (Di Guglielmo *et al*., 2003), ce qui est en désaccord avec notre hypothèse. La découverte du nouveau compartiment cavéolaire constitué par le cavéosome (Pelkmans *et al*., 2001) pourrait réconcilier nos deux points de vue. Ce compartiment représente, comme l'endosome précoce, une station de tri protéique. Au fur et à mesure de son enrichissement en solutés et molécules internalisés, cette grosse vésicule subit un étirement de ses extensions qui deviennent petit à petit dépourvues de cavéoline-1 (Mundy *et al*., 2002). De nouvelles vésicules sont alors formées et peuvent se diriger vers les différents compartiments intracellulaires hydrolysants ou non. Nous pourrions alors émettre l'hypothèse de l'existence d'un compartiment jouant le rôle de point de convergence entre la voie des cavéoles et celle des vésicules à clathrine qui serait enrichi en certains endroits de sa membrane en cavéoline-1 (Figure 37). Ce concept a été abordé très récemment (Nichols et Lippincott-Schwartz, 2001 ; Johannes et Lamaze, 2002 ; Nichols, 2002). L'existence d'un endosome de tri, renfermant la cavéoline-1 comme principal marqueur mais qui n'exprime pas les marqueurs endosomaux habituels, a été proposé. De plus, l'implication de ce compartiment a été démontrée dans le transport des molécules internalisées indépendamment de la voie des vésicules à clathrine depuis la membrane plasmique vers l'appareil de Golgi (Nichols, 2002).

La présence de la GH au niveau de la mitochondrie soulève une question d'importance. Comment une protéine de 22 kDa, ne présentant pas de séquence d'adressage mitochondrial connue à ce jour, peut-elle être présente dans l'organite ? La colocalisation de la cavéoline-1 avec la GH au niveau des mitochondries isolées (*Article II*) suggère l'implication de la voie des cavéoles dans cette capture *in vivo*. Nous avons également privilégié la voie des cavéoles parce que la présence de la cavéoline-1 avait déjà été indiquée dans l'organite (Li *et al*., 2001). Cependant, l'étude *in vitro* réalisée sur les mitochondries isolées permet d'éliminer toute participation de la transduction du signal *via* le domaine intracellulaire du GHR présent au niveau de la membrane plasmique (*Articles II et III*). La GH serait alors capturée directement par les mitochondries par l'intermédiaire de la cavéoline-1. Celle-ci serait acheminée au niveau de la mitochondrie sous sa forme soluble (Liu *et al*., 2002) (Figure 37). La cavéoline-1 soluble est enrobée dans une particule lipidique comportant un cœur hydrophobe enrichi en corps lipidiques limité par une monocouche lipidique (Figure 29) (Brown, 2001). L'entrée d'une telle structure dans la mitochondrie pourrait être réalisée au niveau des points de contact mitochondriaux par fusion des membranes puisque nous avons détecté la cavéoline-1 par western blot au niveau d'échantillons de membranes mitochondriales externe, interne et des points de contact (*Article II*). En effet, ce mode d'entrée mitochondriale semble être adopté lorsque les protéines à importer ne présentent pas de séquence d'adressage mitochondrial. Ce phénomène a notamment été montré pour l'import mitochondrial du cholestérol (Thomson, 2003). Ainsi, lors de l'incubation des mitochondries isolées avec la GH, celle-ci serait reconnue par la cavéoline-1 déjà présente dans la membrane mitochondriale par fusion de la membrane de la structure lipidique au niveau des points de contact (Figure 37). Cependant, l'analyse morphologique effectuée en microscopie électronique ne nous a pas fourni d'indications précises quant à la localisation de la GH à l'intérieur de la mitochondrie, la résolution de cette approche expérimentale se limitant à 27 nm. L'étude consistant à incuber des mitochondries isolées de foie de rat avec un mélange de GH et de GH marquée à l'iode 125 nous a permis de localiser plus précisément la GH dans la mitochondrie (*Article III*). L'expérience consistait à incuber les mitochondries avec un mélange de GH native et de GH marquée à l'iode 125 qui servait de traceur. Cette étape a été suivie par un traitement à la protéinase K de façon à éliminer tout accrochage non spécifique de l'hormone. Par comptage des rayonnements γ et par autoradiographie après migration sur gel de poly-acrylamide des fractions submitochondriales obtenues par ultracentrifugations, nous avons pu détecter la GH

intacte de 22 kDa associée à la mitochondrie entière, puis plus précisément au niveau de l'espace intermembranaire et de la membrane interne. De plus, la capture de la GH est dose dépendante et présente une saturation après 30 minutes. L'import mitochondrial d'autres protéines dépourvues de séquence d'adressage mitochondrial a également été rapporté, une métallothionéine de 14 kDa (Ye *et al.*, 2001) et la Mtf1, un facteur de transcription mitochondrial (Biswas et Getz, 2002). Cependant, l'import mitochondrial de GH n'explique pas la présence du GHR à la surface et à l'intérieur de l'organite *in vitro* et *in vivo* (*Article II*). Il pourrait alors exister une autre voie d'import mitochondrial : le complexe hormone-récepteur pourrait tout simplement être acheminé à la mitochondrie par les « cavicles » (Figure 37). De la même façon que la cavéoline soluble, la fusion de la membrane des « cavicles » avec la mitochondrie au niveau des points de contact mitochondriaux permettrait à la GH, au GHR et à la cavéoline-1 de s'ancrer dans les membranes mitochondriales. Cette dernière alternative serait également envisageable pour l'import de la porine dans la membrane externe mitochondriale. Les porines ne nécessitent pas l'expression de préséquence mitochondriale pour s'insérer dans la membrane de l'organite (Kleene *et al.*, 1987) et s'accumulent dans des cavéoles présentent au niveau de la membrane plasmique (Bathori *et al.*, 1999). La présence du GHR au niveau de la mitochondrie pourrait être le résultat d'un adressage direct, dès sa synthèse parallèlement à son acheminement vers la membrane plasmique pour lier la GH. L'existence d'une fraction membranaire apparentée à celle du réticulum endoplasmique, la fraction MAM («Mitochondrial-Associated Membrane »), serait impliquée dans ce phénomène (Vance, 1990 ; Rusinol *et al.*, 1994). Ce compartiment particulier joue le rôle d'un pont membranaire reliant le réticulum endoplasmique à la mitochondrie de façon à autoriser le transfert de phospholipides et glycosphingolipides (Ardail *et al.*, 2003) entre les deux organites (Vance, 1990). L'implication de la fraction MAM a été proposée dans le cadre du trafic des glycoprotéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique ayant pour destination la membrane interne mitochondriale (Chandra *et al.*, 1998). Le GHR, qui est une glycoprotéine (Cosman *et al.*, 1990 ; Ilhe *et al.*, 1995), traduit au niveau du réticulum endoplasmique qui n'est pas destiné à la membrane plasmique et qui ne présente pas de malformation le destinant à la dégradation lysosomale, pourrait selon un mécanisme et un contrôle encore inconnus, être pris en charge par la fraction MAM et atteindre la mitochondrie de façon à lier éventuellement la GH.

La localisation intramitochondriale de la GH (*Articles II et III*) n'explique pas son rôle dans la fonction de l'organite puisque nous avons démontré l'implication du domaine

intracellulaire du GHR dans la stimulation de l'activité cytochrome c oxydase (*Article III*) et de la boîte 1 du GHR dans l'activation de l'activité respiratoire *via* l'oxydation du NADH (*Article I*). Sa présence au niveau de l'espace intermembranaire et de la membrane interne mitochondriale nous a donc poussés à étudier son impact sur les différentes activités enzymatiques de la chaîne respiratoire (*Article III*). Sur les 4 premiers complexes de la chaîne étudiés (Complexes I, II, III et IV), seulement deux d'entre eux ont présenté des variations en réponse à la GH. L'activité des complexes II et IV a été inhibée de 30% dès 5 minutes après la stimulation et avait tendance à revenir vers une activité normale au bout de 15 minutes après une stimulation par la GH. Cette inhibition était dépendante de la dose de GH utilisée pour l'incubation. Par polarographie réalisée sur mitochondries isolées, l'analyse spécifique du complexe IV a également montré une inhibition de l'activité cytochrome c oxydase. Ces résultats montrent une régulation directe de la GH au niveau de la chaîne respiratoire en inhibant spécifiquement les complexes II et IV d'une manière indépendante du GHR, servant à l'internalisation de la GH, et de la transduction du signal. La GH est localisée spécifiquement au niveau de l'espace intermembranaire (*Article III*). Cette localisation permettrait à l'espace intermembranaire d'agir en tant que réservoir hormonal en fonction des besoins mitochondriaux et cellulaires (Figure 37).

L'action directe d'autres hormones a également été observée au niveau de la fonction mitochondriale. Les hormones thyroïdiennes T2 (3,5-diiodothyronine) et T3 (triiodothyronine) ont été identifiées comme des molécules effectrices du métabolisme énergétique. La T2 découplerait l'oxydation de substrats et la synthèse d'ATP en agissant directement sur le complexe de la cytochrome c oxydase (Goglia *et al*., 2002) tout comme nous avons pu le démontrer pour la GH (*Article III*). La T3 est considérée comme un régulateur majeur de l'activité mitochondriale. Wrutniak-Cabello *et al*. (2001) ont mis en évidence la présence d'un site de liaison mitochondrial pour la T3 au niveau de la membrane interne : une protéine de 28 kDa, c-Erb Aα1. La T3 agirait alors de façon directe sur la fonction mitochondriale en se liant à cette protéine. Plus récemment, l'interaction physique du récepteur de la T3 avec une protéine matricielle, mt-RXR, a été rapportée. La formation d'un complexe dans la matrice afin d'augmenter le taux de transcription mitochondrial a été suggéré (Casa *et al*., 2003). En revanche, la T3 peut également opérer par l'intermédiaire d'une protéine découplante, la protéine UCP3 (« UnCoupling Protein »). Les protéines découplantes, notamment UCP3 (Boss *et al*., 1997), sont des protéines mitochondriales dont la fonction supposée est d'augmenter la dépense énergétique en découplant la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP de façon à générer de la chaleur. Dans le cas de la pathologie

de déficience humaine en GH, une forte augmentation de l'expression de la protéine UCP3 a été observée au niveau du muscle squelettique suite à un traitement par la GH (Pedersen *et al*., 1999). Ces résultats indiquent l'implication des protéines UCP dans les effets de la GH sur la régulation de la dépense énergétique chez les patients souffrant de cette maladie. Chez des individus sains (Wolthers *et al*., 1996), cette même administration de GH conduisait également à une augmentation de la dépense énergétique.

Si l'on reconsidère les résultats obtenus en microscopie biphotonique et en oxygraphie sur les cellules CHO exprimant le GHR dont le résidu phénylalanine 346 est muté en alanine (CHO-GHR_{F346A}) (*Article I*), la voie des cavéoles et/ou la cavéoline-1 peuvent jouer un rôle primordial dans l'action directe de la GH sur la fonction mitochondriale (*Article II*). En effet, ces cellules présentaient une diminution de l'activité respiratoire ainsi qu'une diminution de la consommation d'oxygène en réponse à la GH. En admettant que la GH est acheminée à la mitochondrie par les cavéoles ou accueillie au niveau de l'organite par la cavéoline-1 soluble, elle irait directement inhiber les complexes II et IV (Figure 37).

Les cavéoles sont également impliquées dans la régulation de la transduction du signal (Lisanti *et al*., 1994 ; Couet *et al*., 1997 ; Okamoto *et al*., 1998). Des expériences morphologiques et biochimiques ont révélé la présence d'une grande variété de molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire telles que la PKC (Oka *et al*., 1997), les protéines tyrosine kinases de la famille Src, Ras, eNOS et des protéines G hétérotrimériques (pour revue, van Deurs *et al*., 2003). La cavéoline-1 agirait comme un régulateur négatif de la signalisation intracellulaire en inhibant par interaction directe les molécules des voies de la transduction du signal. Ainsi, en addition à son rôle d'accompagnement de la GH au niveau de la membrane interne mitochondriale, la cavéoline-1 pourrait, au niveau des cavéoles de la membrane plasmique interagir avec les molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire de la GH en les inhibant et en régulant de ce fait négativement l'activité respiratoire mitochondriale. Cependant, les résultats obtenus en oxygraphie sur des cellules CHO-GHR_{1-638} nous ont montré que lorsque la voie des cavéoles est bloquée, la GH est incapable d'induire une stimulation de la consommation d'oxygène (Article II). Ceci indique que contrairement à ce qui a été démontré pour la régulation de la transduction du signal par la cavéole et/ou la cavéoline-1, cette entité régule positivement la voie conduisant à la stimulation respiratoire cellulaire (Figure 37). L'étude menée par Lobie *et al*. (1999) sur les

cellules CHO transfectées transitoirement avec l'ADNc codant pour la cavéoline-1 montre une activation de la transcription induite par les protéines STAT-1, -3 et -5 impliquées dans la transduction du signal. La GH pourrait alors influer sur le mécanisme d'apoptose *via* la voie des cavéoles par l'intermédiaire des molécules de signalisation telles que STAT-5. Les protéines STAT, par leur position centrale qu'elles occupent dans la voie de transduction du signal, jouent un rôle important dans l'activation du cycle cellulaire et dans l'inhibition de l'apoptose conduisant à la progression tumorale (Calo *et al.*, 2003). L'implication des cavéoles dans la progression tumorale est de plus en plus admise, mais étant donnée la grande variété de fonctions cellulaires affectées par les cavéoles, l'effet exercé dans la progression tumorale serait sous l'influence du contexte cellulaire (pour revue, Carver et Schnitzer, 2003). L'origine des cancers étant souvent mal connue, et la production de cavéoline dans les cellules saines mal caractérisée, il est difficile de définir précisément la régulation positive ou négative de la cavéoline ou des cavéoles dans le processus de cancérogenèse. Les relations entre la GH ou le GHR et la cavéoline-1 pourront peut-être nous éclairer davantage sur les mécanismes qui sous-tendent la progression tumorale. Récemment, une équipe (Biedi *et al.*, 2003) a mis en évidence dans des fibroblastes de type R l'induction de la phoshorylation de la protéine SHC, du recrutement de Grb2 et de l'activation de la voie des MAPK par l'IGF-1 au niveau des cavéoles. En effet, la présence du récepteur de l'IGF-1 a été démontrée au niveau des cavéoles membranaires (Maggi *et al.*, 2002). Il induit notamment la phosphorylation de la cavéoline-1 au niveau de son résidu Y14. Les effets mitogéniques de la GH pourraient être induits selon cette voie intermédiaire, l'hormone stimulant la synthèse d'IGF-1 au niveau de ses tissus-cibles.

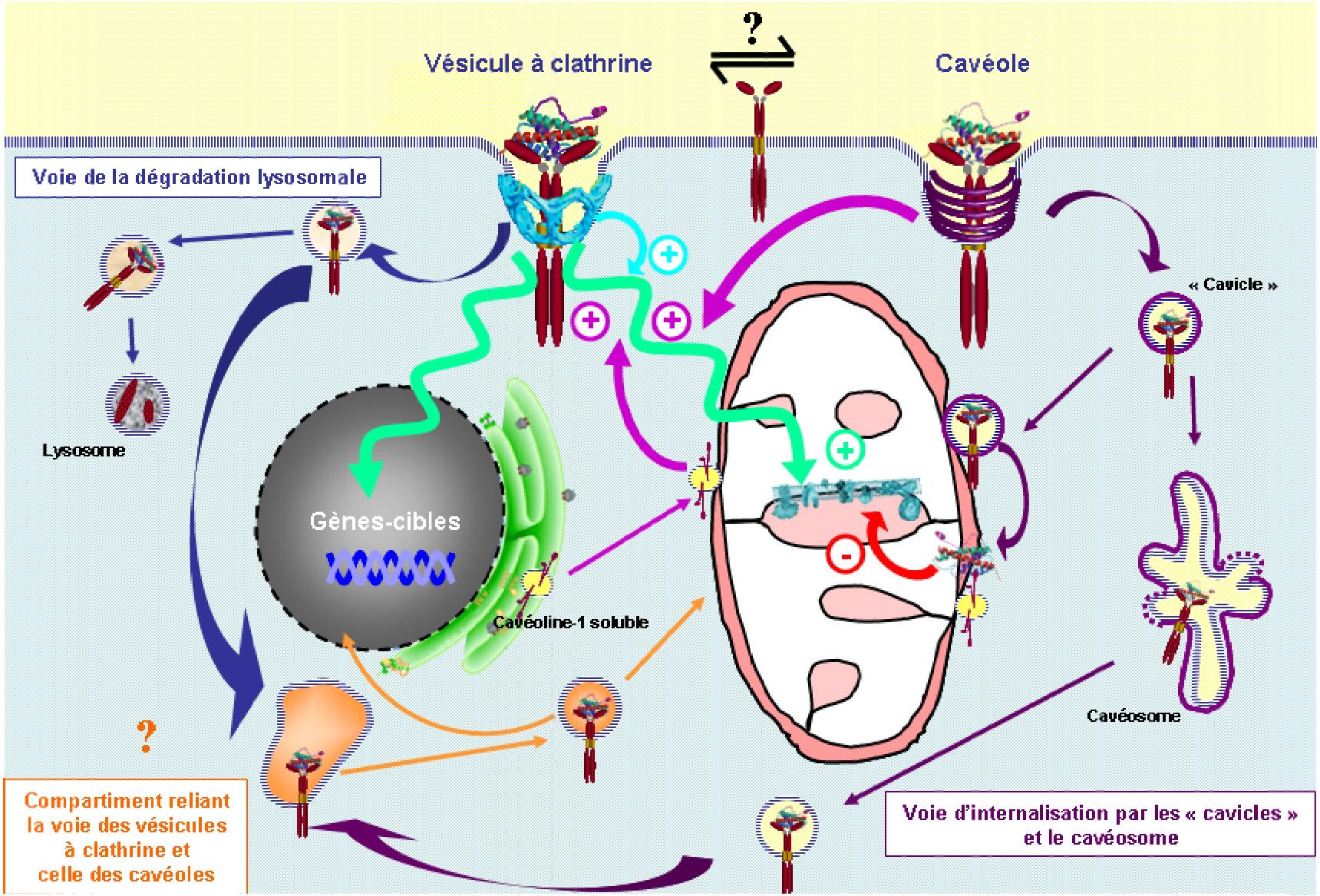


Figure 37 : Mécanisme et conséquences métaboliques de l'internalisation de l'hormone de croissance

CONCLUSION

La liaison de la GH à un homodimère de GHR présent au niveau de la surface de ses cellules-cibles induit deux phénomènes : la transduction du signal et l'internalisation du complexe GH-GHR_2 au niveau des compartiments intracellulaires tels que le lysosome, l'appareil de Golgi, le noyau et la mitochondrie. Ces deux mécanismes sont indépendants l'un de l'autre au moment de leur initiation, en revanche, une fois leur mise en place effectuée, ils peuvent interagir de façon à se réguler l'un l'autre. Les travaux que nous avons réalisés sur le modèle animal, les cellules entières ou encore sur les mitochondries isolées nous ont permis d'ajouter quelques arguments nécessaires à la compréhension du mécanisme d'action de la GH par l'internalisation sur la fonction mitochondriale.

Si sur cellules entières le domaine intracellulaire du GHR et plus particulièrement la boîte 1 est responsable de la stimulation de la respiration *via* une augmentation de l'oxydation du NADH au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire, cette action semble être régulée positivement par l'internalisation du complexe hormone-récepteur selon la voie des vésicules recouvertes de clathrine ou la voie des cavéoles. Au niveau du foie et de mitochondries isolées, nous avons indiqué l'adressage de la GH et du GHR à la mitochondrie par la voie des cavéoles et/ou par la cavéoline-1 sous sa forme soluble. Chez le rat et sur mitochondries isolées, nous avons démontré une capture spécifique de la GH par la mitochondrie. Sa localisation au niveau de la membrane interne mitochondriale lui permettrait d'inhiber directement les complexes II et IV de la chaîne respiratoire.

Ces résultats nous autorisent à émettre l'hypothèse selon laquelle, suite à l'initiation de la signalisation intracellulaire et à l'internalisation du complexe hormone-récepteur des interactions constantes entre ces deux événements sont mises en place de façon à intégrer le rôle de la GH dans la fonction cellulaire par une action stimulatrice directe et une régulation négative, ou positive comme nous l'avons montré pour les effets respiratoires à la suite de l'internalisation par la voie des cavéoles.

PERSPECTIVES

L'internalisation du complexe GH-GHR_2 par les vésicules recouvertes de clathrine a été étudiée ces dernières années d'une manière très approfondie, ce qui a permis de mettre en évidence la dépendance du processus vis-à-vis du système ubiquitine-protéasome et de différentes régions du domaine intracellulaire du GHR. En revanche, l'internalisation de ce même complexe par la voie des cavéoles n'a été que peu abordée depuis la découverte de ces structures dans les années 50.

Une des questions laissées en suspend par notre étude est la raison réelle du transport de la GH par les cavéoles :

- les cellules CHO-GHR_{F346A} présentent une internalisation perturbée. Nous pourrions affiner nos investigations en travaillant sur ce type cellulaire en bloquant la voie des cavéoles afin de déterminer si le faible taux d'internalisation observé jusqu'à 60 minutes correspond à l'internalisation par la voie des cavéoles ;
- il serait également intéressant d'induire la surexpression de la cavéoline-1 par des cellules exprimant le GHR et d'analyser l'internalisation de la GH et de son récepteur.

Aussi, nous supposons cette voie responsable de l'acheminement de la GH et du GHR au noyau. Pour cela des doubles marquages de la GH et du GHR avec la cavéoline-1 et des sous-unités constituant le pore nucléaire pourraient nous éclairer davantage sur la prise en charge du complexe GH-GHR_2 par les cavéoles.

Les cavéoles sont de plus en plus considérées non pas pour leur habilité à internaliser des molécules et solutés, mais davantage pour leur rôle joué en tant que plate-forme de la mise en place de la transduction du signal. La cavéoline-1, qui représente le pilier architectural des cavéoles, interagit par l'intermédiaire de son domaine CSD avec plusieurs molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire telles que la PKC, Ras, eNOS. Ceci nous propose l'intervention de la cavéoline-1 dans la signalisation de la GH. Nous pourrions étudier :

- les interactions possibles entre la cavéoline-1 et les molécules impliquées dans les différentes voies de la transduction du signal induite par la GH telles que la protéine Jak2, les protéines STAT, la protéine SHC ou encore par les composants des complexes multiprotéiques (*e. g.* c-cbl, CrkII, ou p130Cas). L'implication de la protéine SHC a déjà été démontrée dans le cadre d'une stimulation par l'IGF-1. Il serait intéressant d'étudier

l'impact de l'inhibition spécifique de l'expression de la cavéoline-1 au niveau de cultures cellulaires sur les gènes-cibles de la GH ;

- le rôle joué par la cavéoline-1 dans la régulation des phosphorylations dans la signalisation si cette protéine est réellement impliquée.

Nous avons pu mettre en évidence dans cette étude des interactions entre le mécanisme d'internalisation et la transduction de signal contrôlant l'activité respiratoire globale induite par la GH. En effet, cette action de la GH semble être induite par la boîte 1 du GHR et serait régulée positivement par l'internalisation selon les vésicules à clathrine. Cependant, nous n'avons pas identifié la ou les voies impliquées dans cette régulation. La caractérisation de cette signalisation pourrait être possible en inhibant la protéine Jak2 puis les molécules impliquées dans les voies des STAT, des MAPK et de la PI-3 kinase. De cette façon, il serait possible d'identifier la voie responsable de la stimulation de l'activité respiratoire.

En collaboration avec l'équipe du Pr C. Godinot (UMR-CNRS 5534, Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire. Université Claude Bernard-Lyon 1) dans le cadre du projet Emergence élaboré en 2002, une étude sera réalisée *ex vivo* en testant l'effet de la GH sur le taux d'ADN mitochondrial des cellules BRL transfectées avec l'ADNc du GHR, afin de déterminer le rôle de la GH sur la transcription du génome mitochondrial. Une autre voie d'étude est l'identification des gènes mitochondriaux régulés par la GH permettant de mieux comprendre la régulation de la biogenèse des mitochondries. Les résultats obtenus au cours de ces études complémentaires permettront de déterminer le rôle de l'adressage mitochondrial en tant que facteur de spécificité d'activation cellulaire, clarifiant ainsi la voie de transduction du signal de la GH.

Nous venons de montrer pour la première fois l'association physique d'un ligand peptidique, en l'occurrence une hormone peptidique, à la mitochondrie qui permet de moduler directement l'activité métabolique mitochondriale. En effet, les mécanismes qui gouvernent l'assemblage et la régulation de l'expression des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire sont encore mal connus. Une dérégulation de ces mécanismes peut être associée chez l'homme à l'apparition de pathologies mitochondriales de type neuromusculaire, au développement de certains types de cancer ou au vieillissement. Ces maladies peuvent provenir de mutations de protéines codées par l'ADN mitochondrial qui engendrent un défaut

d'assemblage des complexes contenant ces protéines. Nous pourrions utiliser les capacités de cette hormone à cibler ce compartiment dans une optique thérapeutique.

L'action directe de la GH sur la fonction mitochondriale soulève la question de la fonction intracrine de l'hormone. La présence du GHR au niveau de la membrane plasmique des cellules somatotropes (Mertani *et al*., 1995 ; Mertani et Morel, 1995) suggère une action autocrine de la GH. L'hormone étant captée par les cellules qui la synthétisent agirait de façon à induire ses effets pléiotropes, mais également au niveau de la mitochondrie afin de réguler la fonction de cet organite.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. Adam A, Endres M, Sirrenberg C, Lottspeich F, Neupert W, Brunner M. Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. EMBO J. 1999, 18(2):313-9.

2. Adams TE, Baker L, Fiddes RJ, Brandon MR. The sheep growth hormone receptor: molecular cloning and ontogeny of mRNA expression in the liver. Mol Cell Endocrinol. 1990, 73(2-3):135-45.

3. Adams TE, Hansen JA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Billestrup N. Growth hormone preferentially induces the rapid, transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signaling. J Biol Chem. 1998, 273(3):1285-7.

4. Adams V, Bosch W, Schlegel J, Wallimann T, Brdiczka D. Further characterization of contact sites from mitochondria of different tissues: topology of peripheral kinases. Biochim Biophys Acta. 1989, 981(2):213-25.

5. Advis JP, White SS, Ojeda SR. Activation of growth hormone short loop negative feedback delays puberty in the female rat. Endocrinology. 1981, 108:1343-52.

6. Ahmed SN, Brown DA, London E. On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. Biochemistry. 1997, 36(36):10944-53.

7. Aittomaki S, Pesu M, Groner B, Janne OA, Palvimo JJ, Silvennoinen O. Cooperation among Stat1, glucocorticoid receptor, and PU.1 in transcriptional activation of the high-affinity Fc gamma receptor I in monocytes. J Immunol. 2000, 164(11):5689-97.

8. Alele J, Jiang J, Goldsmith JF, Yang X, Maheshwari HG, Black RA, Baumann G, Frank SJ. Blockade of growth hormone receptor shedding by a metalloprotease inhibitor. Endocrinology. 1998, 139(4):1927-35.

9. Allevato G, Billestrup N, Goujon L, Galsgaard ED, Norstedt G, Postel-Vinay MC, Kelly PA, Nielsen JH. Identification of phenylalanine 346 in the rat growth hormone receptor as being critical for ligand-mediated internalization and down-regulation.J Biol Chem. 1995, 270(29):17210-4.

10. Alves dos Santos CM, ten Broeke T, Strous GJ. Growth hormone receptor ubiquitination, endocytosis, and degradation are independent of signal transduction via Janus kinase 2. J Biol Chem. 2001a, 276(35):32635-41.

11. Alves dos Santos CM, van Kerkhof P, Strous GJ. The signal transduction of the growth hormone receptor is regulated by the ubiquitin/proteasome system and continues after endocytosis. J Biol Chem. 2001b, 276(14):10839-46.

12. Anderson RG. The caveolae membrane system. Annu Rev Biochem. 1998, 67:199-225.

13. Andres R, Cader G, Zierler KL. The quantitatively minor role of carbohydrate in oxidative metabolism by skeletal muscle in intact man in the basal state; measurements of oxygen and glucose uptake and carbon dioxide and lactate production in the forearm. J Clin Invest. 1956, 35(6):671-82.

14. Aoki T, Nomura R, Fujimoto T. Tyrosine phosphorylation of caveolin-1 in the endothelium. Exp Cell Res. 1999, 253(2):629-36.

15. Ardail D, Lerme F, Louisot P. Further characterization of mitochondrial contact sites: effect of short-chain alcohols on membrane fluidity and activity. Biochem Biophys Res Commun. 1990a, 173(3):878-85.

16. Ardail D, Lerme F, Louisot P. Involvement of contact sites in phosphatidylserine import into liver mitochondria. J Biol Chem. 1991, 266(13):7978-81.

17. Ardail D, Popa I, Bodennec J, Louisot P, Schmitt D, Portoukalian J. The mitochondria-associated endoplasmic-reticulum subcompartment (MAM fraction) of rat liver contains highly active sphingolipid-specific glycosyltransferases. Biochem J. 2003, 371(Pt 3):1013-9.

18. Ardail D, Privat JP, Egret-Charlier M, Levrat C, Lerme F, Louisot P. Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. J Biol Chem. 1990b, 265(31):18797-802.

19. Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. Cell. 1993, 74(2):237-44.

20. Argetsinger LS, Carter-Su C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. Physiol Rev. 1996a, 76(4):1089-107.

21. Argetsinger LS, Hsu GW, Myers MG Jr, Billestrup N, White MF, Carter-Su C. Growth hormone, interferon-gamma, and leukemia inhibitory factor promoted tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1. J Biol Chem. 1995, 270(24):14685-92.

22. Argetsinger LS, Norstedt G, Billestrup N, White MF, Carter-Su C. Growth hormone, interferon-gamma, and leukemia inhibitory factor utilize insulin receptor substrate-2 in intracellular signaling. J Biol Chem. 1996b, 271(46):29415-21.

B

23. Bak JF, Moller N, Schmitz O, Richter EA, Pedersen O. Effects of hyperinsulinemia and hyperglycemia on insulin receptor function and glycogen synthase activation in skeletal muscle of normal man. Metabolism. 1991, 40(8):830-5.

24. Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale WW, Rosenfeld MG, Evans RM. Hormonal regulation of gene expression: regulation of growth hormone gene transcription by growth hormone releasing factor. Oxf Surv Eukaryot Genes. 1985, 2:49-73.

25. Barinaga M, Yamonoto G, Rivier C, Vale W, Evans R, Rosenfeld MG. Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by growth hormone-releasing factor. Nature. 1983, 306(5938):84-5.

26. Bartke A. Relationship to endocrine function and body size. In : The molecular genetics of aging. Results and problems in cell differentiation. 2000 (Hekimi, Z., ed) pp. 181-202. Springer.

27. Bathori G, Parolini I, Tombola F, Szabo I, Messina A, Oliva M, De Pinto V, Lisanti M, Sargiacomo M, Zoratti M. Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains. J Biol Chem. 1999, 274(42):29607-12.

28. Bauer MF, Sirrenberg C, Neupert W, Brunner M. Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. Cell. 1996, 87(1):33-41.

29. Baumann G, Frank SJ. Metalloproteinases and the modulation of GH signaling. J Endocrinol. 2002, 174(3):361-8.

30. Baumann G, Shaw MA, Amburn K. A rapid and simple assay for growth hormone-binding protein activity in human plasma. Acta Endocrinol (Copenh). 1988, 119(4):529-34.

31. Baumbach WR, Horner DL, Logan JS. The growth hormone-binding protein in rat serum is an alternatively spliced form of the rat growth hormone receptor. Genes Dev. 1989, 3(8):1199-205.

32. Bazan JF. A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. Biochem Biophys Res Commun. 1989, 164(2):788-95.

33. Benmerah A, Poupon V, Cerf-Bensussan N, Dautry-Varsat A. Mapping of Eps15 domains involved in its targeting to clathrin-coated pits. J Biol Chem. 2000, 275(5):3288-95.

34. Bergad PL, Shih HM, Towle HC, Schwarzenberg SJ, Berry SA.Growth hormone induction of hepatic serine protease inhibitor 2.1 transcription is mediated by a Stat5-related factor binding synergistically to two gamma-activated sites. J Biol Chem. 1995, 270(42):24903-10.

35. Berthold J, Bauer MF, Schneider HC, Klaus C, Dietmeier K, Neupert W, Brunner M. The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. Cell. 1995, 81(7):1085-93.

36. Berti L, Gammeltoft S. Leptin stimulates glucose uptake in C2C12 muscle cells by activation of ERK2. Mol Cell Endocrinol. 1999, 157(1-2):121-30.

37. Beutner G, Ruck A, Riede B, Welte W, Brdiczka D. Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. FEBS Lett. 1996, 396(2-3):189-95.

38. Beuvink I, Hess D, Flotow H, Hofsteenge J, Groner B, Hynes NE. Stat5a serine phosphorylation. Serine 779 is constitutively phosphorylated in the mammary gland, and serine 725 phosphorylation influences prolactin-stimulated in vitro DNA binding activity. J Biol Chem. 2000, 275(14):10247-55.

39. Bhattacharya S, Eckner R, Grossman S, Oldread E, Arany Z, D'Andrea A, Livingston DM. Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha. Nature. 1996, 383(6598):344-7.

40. Biedi C, Panetta D, Segat D, Cordera R, Maggi D. Specificity of IGF-I and Insulin on Shc phosphorylation and Grb2 recruitment in caveolae. Endocrinology. 2003, 10.1210/en.2003-0417.

41. Billestrup N, Bouchelouche P, Allevato G, Ilondo M, Nielsen JH. Growth hormone receptor C-terminal domains required for growth hormone-induced intracellular free Ca2+ oscillations and gene transcription. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995, 92(7):2725-9.

42. Binder G, Revskoy S, Gupta D. In vivo growth hormone gene expression in neonatal rat thymus and bone marrow. J Endocrinol. 1994, 140:137-43.

43. Bingham B, Oldham ER, Baumbach WR. Regulation of growth hormone receptor and binding protein expression in domestic species. Proc Soc Exp Biol Med. 1994, 206(3):195-9.

44. Birnbaum RS, Goodman HM. Comparison of several insulin-like effects of growth hormone. Horm Metab Res. 1979, 11(2):136-42.

45. Biswas TK, Getz GS. Import of yeast mitochondrial transcription factor (Mtf1p) via a nonconventional pathway. J Biol Chem. 2002, 22;277(47):45704-14.

46. Bjorgell P, Rosberg S, Isaksson O, Belfrage P. The antilipolytic, insulin-like effect of growth hormone is caused by a net decrease of hormone-sensitive lipase phosphorylation. Endocrinology. 1984, 115(3):1151-6.

47. Bloch B, Brazeau P, Ling N, Bohlen P, Esch F, Wehrenberg WB, Benoit R, Bloom F, Guillemin R. Immunohistochemical detection of growth hormone-releasing factor in brain. Nature. 1983, 301:607-8.

48. Bloch B, Gaillard RC, Brazeau P, Lin HD, Ling N. Topographical and ontogenetic study of the neurons producing growth hormone-releasing factor in human hypothalamus. Regul Pept. 1984, 8:21-31.

49. Bluet-Pajot MT, Bertherat J, Epelbaum J, Kordon C. Neural and pituitary mechanisms involved in growth hormone regulation. J Pediatr Endocrinol. 1993, 6:357-69.

50. Bohlke K, Cramer DW, Trichopoulos D, Mantzoros CS. Insulin-like growth factor-I in relation to premenopausal ductal carcinoma in situ of the breast. Epidemiology. 1998, 9(5):570-3.

51. Bomer U, Maarse AC, Martin F, Geissler A, Merlin A, Schonfisch B, Meijer M, Pfanner N, Rassow J. Separation of structural and dynamic functions of the mitochondrial translocase: Tim44 is crucial for the inner membrane import sites in translocation of tightly folded domains, but not of loosely folded preproteins. EMBO J. 1998, 17(15):4226-37.

52. Bonifacino JS, Weissman AM. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. Annu Rev Cell Dev Biol. 1998, 14:19-57.

53. Bonnet F, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Eeckels R, Malvaux P. Subcutaneous adipose tissue and lipids in blood in growth hormone deficiency before and after treatment with human growth hormone. Pediatr Res. 1974, 8(9):800-5.

54. Borelli E, Heyman RA, Arias C, Sawchenko PE, Evans RM. Transgenic mice with inducible dwarfism. Nature, 1989, 339 :538-541.

55. Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. FEBS Lett. 1997, 408(1):39-42.

56. Boyle PJ, Avogaro A, Smith L, Bier DM, Pappu AS, Illingworth DR, Cryer PE. Role of GH in regulating nocturnal rates of lipolysis and plasma mevalonate levels in normal and diabetic humans. Am J Physiol. 1992, 263(1 Pt 1):E168-72.

57. Brameld JM, Atkinson JL, Saunders JC, Pell JM, Buttery PJ, Gilmour RS. Effects of growth hormone administration and dietary protein intake on insulin-like growth factor I and growth hormone receptor mRNA Expression in porcine liver, skeletal muscle, and adipose tissue. J Anim Sci. 1996, 74(8):1832-41.

58. Brandsch R, Bichler V. Covalent cofactor binding to flavoenzymes requires specific effectors. Eur J Biochem. 1989, 182(1):125-8.

59. Brandt U, Trumpower B. The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1994, 29(3):165-97.

60. Bratusch-Marrain PR, Smith D, DeFronzo RA. The effect of growth hormone on glucose metabolism and insulin secretion in man. J Clin Endocrinol Metab. 1982, 55(5):973-82.

61. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. Science. 1973, 179:77-9.

62. Brdiczka D, Beutner G, Ruck A, Dolder M, Wallimann T. The molecular structure of mitochondrial contact sites. Their role in regulation of energy metabolism and permeability transition. Biofactors. 1998, 8(3-4):235-42.

63. Brdiczka D, Kaldis P, Wallimann T. In vitro complex formation between the octamer of mitochondrial creatine kinase and porin. J Biol Chem. 1994, 269(44):27640-4.

64. Brodin L, Low P, Shupliakov O.Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis.Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. Curr Opin Neurobiol. 2000, 10(3):312-20.

65. Brown DA. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. Curr Biol. 2001, 11(11):R446-9.

66. Brook CG. Effect of human growth hormone treatment on adipose tissue in children. Arch Dis Child. 1973, 48(9):725-8.

67. Brummer RJ. Effects of growth hormone treatment on visceral adipose tissue. Growth Horm IGF Res. 1998, 8 Suppl B:19-23.

68. Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. Nat Med. 2000, 6(12):1362-7.

69. Bucheler K, Adams V, Brdiczka D. Localization of the ATP/ADP translocator in the inner membrane and regulation of contact sites between mitochondrial envelope membranes by ADP. A study on freeze-fractured isolated liver mitochondria. Biochim Biophys Acta. 1991, 1056(3):233-42.

70. Burnside J, Liou SS, Cogburn LA. Molecular cloning of the chicken growth hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid: mutation of the gene in sex-linked dwarf chickens. Endocrinology. 1991, 128(6):3183-92.

C

71. Cabello G, Wrutniak C. Thyroid hormone and growth: relationships with growth hormone effects and regulation. Reprod Nutr Dev. 1989, 29(4):387-402.

72. Caldenhoven E, van Dijk TB, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, de Groot RP. STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. J Biol Chem. 1996, 271(22):13221-7.

73. Callus BA, Mathey-Prevot B. Hydrophobic residues Phe751 and Leu753 are essential for STAT5 transcriptional activity. J Biol Chem. 2000, 275(22):16954-62.

74. Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. J Cell Physiol. 2003, 197(2):157-68.

75. Calvo, M. and Enrich, C. Biochemical analysis of a caveolae-enriched plasma membrane fraction from rat liver. Electrophoresis. 2000, 21: 3386-3395.

76. Campbell GS, Meyer DJ, Raz R, Levy DE, Schwartz J, Carter-Su C. Activation of acute phase response factor (APRF)/Stat3 transcription factor by growth hormone. J Biol Chem. 1995, 270(8):3974-9.

77. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. Science. 1995, 269(5223):546-9.

78. Cantwell CA, Sterneck E, Johnson PF. Interleukin-6-specific activation of the C/EBPdelta gene in hepatocytes is mediated by Stat3 and Sp1. Mol Cell Biol. 1998, 18(4):2108-17.

79. Capaldi RA. Structure and assembly of cytochrome c oxidase. Arch Biochem Biophys. 1990, 280(2):252-62.

80. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99(3):1115-22.

81. Cardell RR Jr. Subcellular alterations in rat liver following hypophysectomy. Biochim Biophys Acta. 1967, 148(2):539-52.

82. Carozzi AJ, Ikonen E, Lindsay MR, Parton RG. Role of cholesterol in developing T-tubules: analogous mechanisms for T-tubule and caveolae biogenesis. Traffic. 2000, 1(4):326-41.

83. Carro E, Senaris R, Considine RV, Casanueva FF, Dieguez C. Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. Endocrinology. 1997, 138(5):2203-6.

84. Carter-Su C, Rui L, Herrington J. Role of the tyrosine kinase JAK2 in signal transduction by growth hormone. Pediatr Nephrol. 2000a, 14(7):550-7.

85. Carter-Su C, Rui L, Stofega MR. SH2-B and SIRP: JAK2 binding proteins that modulate the actions of growth hormone. Recent Prog Horm Res. 2000b, 55:293-311.

86. Carter-Su C, Schwartz J, Kikuchi G. Identification of a high affinity growth hormone receptor in rat adipocyte membranes. J Biol Chem. 1984, 259(2):1099-104.

87. Carter-Su C, Schwartz J, Smit LS. Molecular mechanism of growth hormone action. Annu Rev Physiol. 1996, 58:187-207.

88. Carter-Su C, Smit LS Signaling via JAK tyrosine kinases: growth hormone receptor as a model system. Recent Prog Horm Res. 1998, 53: 61-83.

89. Carver LA, Schnitzer JE. Caveolae: mining little caves for new cancer targets. Nat Rev Cancer. 2003, 3(8):571-81.

90. Cary LA, Guan JL. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. Front Biosci. 1999, 4:D102-13.

91. Casanueva FF. Physiology of growth hormone secretion and action. Endocrinol Metab Clin North Am. 1992, 21(3):483-517.

92. Casanueva FF, Dieguez C. Interaction between body composition, leptin and growth hormone status. Baillieres Clin Endocrinol Metab. 1998, 12(2):297-314.

93. Casas F, Daury L, Grandemange S, Busson M, Seyer P, Hatier R, Carazo A, Cabello G, Wrutniak-Cabello C. Endocrine regulation of mitochondrial activity: involvement of truncated RXRalpha and c-Erb Aalpha1 proteins. FASEB J. 2003, 17(3):426-36.

94. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, Hennekens CH, Pollak M. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. Science. 1998, 279(5350):563-6.

95. Chandra NC, Spiro MJ, Spiro RG. Identification of a glycoprotein from rat liver mitochondrial inner membrane and demonstration of its origin in the endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 1998, 273(31):19715-21.

96. Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, Varshavsky A. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. Science. 1989, 243(4898):1576-83.

97. Cheek DB, Hill DE. Effect of growth hormone on cell and somatic growth. (Knobil and Sawyer, Editors). Handbook of physiology, American Physiological Society. Washington DC. 1974 pp. 159-185.

98. Chen C, Brinkworth R, Waters MJ. The role of receptor dimerization domain residues in growth hormone signaling. J Biol Chem. 1997, 272(8):5133-40.

99. Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinas RE, Seeburg PH. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. Genomics. 1989, 4:479-97.

100. Chen H, Fre S, Slepnev VI, Capua MR, Takei K, Butler MH, Di Fiore PP, De Camilli P. Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. Nature. 1998, 394(6695):793-7.

101. Chen HC, Guan JL. Stimulation of phosphatidylinositol 3'-kinase association with focal adhesion kinase by platelet-derived growth factor. J Biol Chem. 1994, 269(49):31229-33.

102. Chen WY, Wight DC, Wagner TE, Kopchick JJ. Expression of a mutated bovine growth hormone gene suppresses growth of transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990, 87(13):5061-5.

103. Chen WY, Wight DC, Mehta BV, Wagner TE, Kopchick JJ. Glycine 119 of bovine growth hormone is critical for growth-promoting activity. Mol Endocrinol. 1991, 5(12):1845-52.

104. Chen X, Zhang B, Fischer JA. A specific protein substrate for a deubiquitinating enzyme: Liquid facets is the substrate of Fat facets. Genes Dev. 2002, 16(3):289-94.

105. Chen XP, Losman JA, Rothman P. SOCS proteins, regulators of intracellular signaling. Immunity. 2000, 13(3):287-90.

106. Childs GV, Unabia G, Miller BT. Cytochemical detection of gonadotropin-releasing hormone-binding sites on rat pituitary cells with luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and growth hormone antigens during diestrous up-regulation. Endocrinology. 1994a, 134:1943-1951.

107. Childs GV, Unabia G, Rougeau D. Cells that express luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) β-subunit messenger ribonucleic acids during the estrous cycle: the major contributors contain LHβ, FSHβ, and/or growth hormone. Endocrinology. 1994b, 134:990-997.

108. Choi HK, Waxman DJ. Pulsatility of growth hormone (GH) signalling in liver cells: role of the JAK-STAT5b pathway in GH action. Growth Horm IGF Res. 2000, 10 Suppl B:S1-8.

109. Chou PY, Fasman GD. Empirical predictions of protein conformation. Annu Rev Biochem. 1978, 47:251-76.

110. Cioffi JA, Wang X, Kopchick JJ. Porcine growth hormone receptor cDNA sequence. Nucleic Acids Res. 1990, 18(21):6451.

111. Clark RG, Mortensen DL, Carlsson LM, Spencer SA, McKay P, Mulkerrin M, Moore J, Cunningham BC. Recombinant human growth hormone (GH)-binding protein enhances the growth-promoting activity of human GH in the rat. Endocrinology. 1996, 137(10):4308-15.

112. Clarkson RW, Shang CA, Levitt LK, Howard T, Waters MJ. Ternary complex factors Elk-1 and Sap-1a mediate growth hormone-induced transcription of egr-1 (early growth response factor-1) in 3T3-F442A preadipocytes. Mol Endocrinol. 1999, 13(4):619-31.

113. Clejan S, Collipp PJ, Maddaiah VT. Hormones and liver mitochondria: influence of growth hormone, thyroxine, testosterone, and insulin on thermotropic effects of respiration and fatty acid composition of membranes. Arch Biochem Biophys. 1980, 203(2):744-52.

114. Cobb MH. MAP kinase pathways. Prog Biophys Mol Biol. 1999, 71(3-4):479-500.

115. Cobb MH, Robbins DJ, Boulton TG. ERKs, extracellular signal-regulated MAP-2 kinases. Curr Opin Cell Biol. 1991 Dec;3(6):1025-32.

116. Collum RG, Brutsaert S, Lee G, Schindler C. A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000, 97(18):10120-5.

117. Conner SD, Schmid SL. Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. J Cell Biol. 2003a, 1;162(5):773-9.

118. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. Nature. 2003b, 422(6927):37-44.

119. Constantinescu SN, Keren T, Socolovsky M, Nam H, Henis YI, Lodish HF. Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001, 98(8):4379-84.

120. Corpas E, Harman SM, Blackman MR. Human growth hormone and human aging. Endocr Rev. 1993, 14:20-39.

121. Coschigano KT, Clemmons D, Bellush LL, Kopchick JJ. Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP gene-disrupted mice. Endocrinology. 2000, 141(7):2608-13.

122. Coschigano KT, Holland AN, Riders ME, List EO, Flyvbjerg A, Kopchick JJ. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. Endocrinology. 2003, 144(9):3799-810.

123. Cosman D. The hematopoietin receptor superfamily. Cytokine. 1993, 5(2):95-106.

124. Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG, March CJ. A new cytokine receptor superfamily. Trends Biochem Sci. 1990, 15(7):265-70.

125. Cosson P, Bonifacino JS. Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules. Science. 1992, 258(5082):659-62.

126. Costoya JA, Finidori J, Moutoussamy S, Searis R, Devesa J, Arce VM. Activation of growth hormone receptor delivers an antiapoptotic signal: evidence for a role of Akt in this pathway. Endocrinology. 1999, 140(12):5937-43.

127. Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. J Biol Chem. 1997, 272(10):6525-33.

128. Cruzalegui FH, Bading H. Calcium-regulated protein kinase cascades and their transcription factor targets. Cell Mol Life Sci. 2000, 57(3):402-10.

129. Cunningham BC, Ultsch M, De Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR, Wells JA. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. Science. 1991, 254(5033):821-5.

130. Cunningham BC, Wells JA. Comparison of a structural and a functional epitope. J Mol Biol. 1993, 234(3):554-63.

131. Cushing H. The hypophysis cerebri. J Am Med Assoc. 1909, 53:250-255.

D

132. Dada MO, Campbell GT, Blake CA. Pars distalis cell quantification in normal adult male and female rats. J Endocrinol. 1984, 101(1):87-94.

133. Daems WT, Wisse E. Shape and attachment of the cristae mitochondriales in mouse hepatic cell mitochondria. J Ultrastruct Res. 1966, 16(1):123-40.

134. Danilovich NA, Bartke A, Winters TA. Ovarian follicle apoptosis in bovine growth hormone transgenic mice. Biol Reprod. 2000, 62(1):103-7.
135. Dantuma NP, Masucci MG. Stabilization signals: a novel regulatory mechanism in the ubiquitin/proteasome system. FEBS Lett. 2002, 529(1):22-6.

136. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. Endocr Rev. 1989, 10(1):68-91.

137. Davey HW, McLachlan MJ, Wilkins RJ, Hilton DJ, Adams TE. STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in the liver. Mol Cell Endocrinol. 1999b, 158(1-2):111-6.

138. Davey HW, Wilkins RJ, Waxman DJ. STAT5 signaling in sexually dimorphic gene expression and growth patterns. Am J Hum Genet. 1999a, 65(4):959-65.

139. Davidson MB. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. Endocr Rev. 1987, 8(2):115-31.

140. Davidson MB, Bernstein JM. The effect of nicotinic acid on growth hormone-induced lipolysis and glucose intolerance. J Lab Clin Med. 1973, 81(4):568-76.

141. Davis AJ, Ryan KR, Jensen RE. Tim23p contains separate and distinct signals for targeting to mitochondria and insertion into the inner membrane. Mol Biol Cell. 1998, 9(9):2577-93.

142. D'Costa AP, Ingram RL, Lenham JE, Sonntag WE. The regulation and mechanisms of action of growth hormone and insulin-like growth factor 1 during normal ageing. J Reprod Fertil. 1993, 46:87-98.

143. De Camilli P et al, 2001. in Synapses (Cowan, MW et al, eds) pp217-274 , The Johns Hopkins University Press.

144. De Camilli P, Takei K, McPherson PS. The function of dynamin in endocytosis. Curr Opin Neurobiol. 1995, 5(5):559-65.

145. De Craene JO, Soetens O, Andre B. The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease. J Biol Chem. 2001, 276(47):43939-48.

146. Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. Oncogene. 2000, 19(21):2628-37.

147. de Favelukes SS, de Tarlovsky MS, Bedetti CD, Stoppani AO. Influence of the hypophysis on mitochondrial protein synthesis. Acta Physiol Lat Am. 1975, 25(2):107-11.

148. Dekker PJ, Ryan MT, Brix J, Muller H, Honlinger A, Pfanner N. Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. Mol Cell Biol. 1998, 18(11):6515-24.

149. Delesque-Touchard N, Park SH, Waxman DJ. Synergistic action of hepatocyte nuclear factors 3 and 6 on CYP2C12 gene expression and suppression by growth hormone-activated STAT5b. Proposed model for female specific expression of CYP2C12 in adult rat liver. J Biol Chem. 2000, 275(44):34173-82.

150. Dembowski M, Kunkele KP, Nargang FE, Neupert W, Rapaport D. Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM core complex of Neurospora crassa. J Biol Chem. 2001, 276(21):17679-85.

151. Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, Schekman R. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. Nature. 1988, 332(6167):800-5.

152. de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. Science. 1992 Jan 17;255(5042):306-12.

153. de Wit H, Lichtenstein Y, Geuze HJ, Kelly RB, van der Sluijs P, Klumperman J. Synaptic vesicles form by budding from tubular extensions of sorting endosomes in PC12 cells. Mol Biol Cell. 1999, 10(12):4163-76.

154. Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL.Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. Nat Cell Biol. 2003, 5(5):410-21. Erratum in: Nat Cell Biol. 2003 Jul;5(7):680.

155. Dieguez C, Casanueva FF. Influence of metabolic substrates and obesity on growth hormone secretion. Trends Endocrinol Metab. 1995, 6:55-59.

156. Dietmeier K, Honlinger A, Bomer U, Dekker PJ, Eckerskorn C, Lottspeich F, Kubrich M, Pfanner N. Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. Nature. 1997, 388(6638):195-200.

157. Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. J Biol Chem. 1995, 270(12):6838-42.

158. Dinerstein-Cali H, Ferrag F, Kayser C, Kelly PA, Postel-Vinay M. Growth hormone (GH) induces the formation of protein complexes involving Stat5, Erk2, Shc and serine phosphorylated proteins. Mol Cell Endocrinol. 2000, 166(2):89-99.

159. Doglio A, Dani C, Grimaldi P, Ailhaud G. Growth hormone stimulates c-fos gene expression by means of protein kinase C without increasing inositol lipid turnover. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989, 86(4):1148-52.

160. Dolder M, Wendt S, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. Biol Signals Recept. 2001, 10(1-2):93-111.

161. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. Science. 2001, 293(5539):2449-52.

162. Dudley GA, Portanova R. Histochemical characteristics of soleus muscle in hGH transgenic mice. Proc Soc Exp Biol Med. 1987,185: 403-408

163. Dunphy JT, Linder ME. Signalling functions of protein palmitoylation. Biochim Biophys Acta. 1998, 1436(1-2):245-61.

164. Dupre S, Haguenauer-Tsapis R. Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase. Mol Cell Biol. 2001, 21(14):4482-94.

165. Dupree P, Parton RG, Raposo G, Kurzchalia TV, Simons K. Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. EMBO J. 1993, 12(4):1597-605.

E

166. Eisenhauer KM, Chun SY, Billig H, Hsueh AJ. Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein. Biol Reprod. 1995, 53(1):13-20.

167. Eisenhauer EA, Gore M, Neijt JP. Ovarian cancer: should we be managing patients with good and bad prognostic factors in the same manner? Ann Oncol. 1999, 10 Suppl 1:9-15.

168. Endo T, Kohda D. Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import. Biochim Biophys Acta. 2002, 1592(1):3-14.

169. Epelbaum J, Martin JB, Brazeau P, Willoughby J, Hoyte K. Distribution of somatostatin in rat brain. Trans Am Neurol Assoc. 1977, 102:87-90.

170. Eriksson H, Tornqvist H. Specific inhibition of the cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase blocks the insulin-like antilipolytic effect of growth hormone in rat adipocytes. Mol Cell Biochem. 1997, 169(1-2):37-42.

171. Eshet R, Peleg S, Laron Z. Direct visualization of binding, aggregation and internalization of human growth hormone in cultured human lymphocytes. Acta Endocrinol (Copenh). 1984, 107(1):9-15.

172. Evans HM, Long JA. The effect of the anterior lobe administred intraperitoneally on growth, maturity and oestrus cycle of the rat. Anat Rec. 1921, 21:62-74.

F

173. Fagin KD, Lackey SL, Reagan CR, DiGirolamo M. Specific binding of growth hormone by rat adipocytes. Endocrinology. 1980, 107(2):608-15.

174. Fain JN, Ihle JH, Bahouth SW. 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. 1999, 263(1):201-5.

175. Farsad K, Ringstad N, Takei K, Floyd SR, Rose K, De Camilli P. Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. J Cell Biol. 2001, 155(2):193-200.

176. Fearnley IM, Carroll J, Shannon RJ, Runswick MJ, Walker JE, Hirst J. GRIM-19, a cell death regulatory gene product, is a subunit of bovine mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). J Biol Chem. 2001, 276(42):38345-8.

177. Felberbaum-Corti M, Van Der Goot FG, Gruenberg J. Sliding doors: clathrin-coated pits or caveolae? Nat Cell Biol. 2003, 5(5):382-4.

178. Fernandez I, Ying Y, Albanesi J, Anderson RG.Mechanism of caveolin filament assembly. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99(17):11193-8.

179. Fielding CJ, Fielding PE. Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. Biochim Biophys Acta. 2000, 1529(1-3):210-22.

180. Fielding CJ, Fielding PE. Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. Adv Drug Deliv Rev. 2001, 49(3):251-64.

181. Fielding CJ, Fielding PE. Relationship between cholesterol trafficking and signaling in rafts and caveolae. Biochim Biophys Acta. 2003, 1610(2):219-28.

182. Fielding PE, Russel JS, Spencer TA, Hakamata H, Nagao K, Fielding CJ. Sterol efflux to apolipoprotein A-I originates from caveolin-rich microdomains and potentiates PDGF-dependent protein kinase activity. Biochemistry. 2002, 41(15):4929-37.

183. Finidori J. Regulators of growth hormone signaling. Vitam Horm. 2000, 59:71-97.

184. Finidori J, Kelly PA. Cytokine receptor signalling through two novel families of transducer molecules: Janus kinases, and signal transducers and activators of transcription. J Endocrinol. 1995, 147: 11-23.

185. Florkowski CM, Collier GR, Zimmet PZ, Livesey JH, Espiner EA, Donald RA. Low-dose growth hormone replacement lowers plasma leptin and fat stores without affecting body mass index in adults with growth hormone deficiency. Clin Endocrinol (Oxf). 1996, 45(6):769-73.

186. Folsch H, Guiard B, Neupert W, Stuart RA. Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. EMBO J. 1996, 15(3):479-87.

187. Foster CM, Shafer JA, Rozsa FW, Wang XY, Lewis SD, Renken DA, Natale JE, Schwartz J, Carter-Su C. Growth hormone promoted tyrosyl phosphorylation of growth hormone receptors in murine 3T3-F442A fibroblasts and adipocytes. Biochemistry. 1988, 27(1):326-34.

188. Fra AM, Masserini M, Palestini P, Sonnino S, Simons K. A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21-caveolin on the cell surface. FEBS Lett. 1995, 375(1-2):11-4.

189. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. J Biol Chem. 1994, 269(49):30745-8.

190. Francis SM, Enerback S, Moller C, Enberg B, Norstedt G. A novel in vitro model for studying signal transduction and gene regulation via the growth hormone receptor. Mol Endocrinol. 1993, 7(8):972-8.

191. Frank SJ. Minireview: Receptor dimerization in GH and Erythropoïétin action- It takes two to tango, but how ? Endocrinilogy. 2002, 143(1):2-10.

192. Frank SJ, Gilliland G, Kraft AS, Arnold CS. Interaction of the growth hormone receptor cytoplasmic domain with the JAK2 tyrosine kinase. Endocrinology. 1994b, 135(5):2228-39.

193. Frank SJ, Gilliland G, Van Epps C. Treatment of IM-9 cells with human growth hormone (GH) promotes rapid disulfide linkage of the GH receptor. Endocrinology. 1994a, 135(1):148-56.

194. Frank SJ, Yi W, Zhao Y, Goldsmith JF, Gilliland G, Jiang J, Sakai I, Kraft AS. Regions of the JAK2 tyrosine kinase required for coupling to the growth hormone receptor. J Biol Chem. 1995, 270(24):14776-85.

195. Frankenne F, Rentier-Delrue F, Scippo ML, Martial J, Hennen G. Expression of the growth hormone variant gene in human placenta. J Clin Endocrinol Metab. 1987, 64:635-7.

196. Frawley LS, Boockfor FR, Hoeffler JP. Identification by plaque assays of a pituitary cell type that secretes both growth hormone and prolactin. Endocrinology. 1985, 116(2):734-7.

197. Frawley LS, Boockfor FR. Mammosomatotropes: presence and functions in normal and neoplastic pituitary tissue. Endocr Rev. 1991, 12(4):337-55.

198. Frick GP, Leonard JL, Goodman HM. Effect of hypophysectomy on growth hormone receptor gene expression in rat tissues. Endocrinology. 1990, 126(6):3076-82.

199. Frohman LA, Downs TR, Chomczynski P. Regulation of growth hormone secretion. Front Neuroendocrinol. 1992, 13:344-405.

200. Fryburg DA, Gelfand RA, Barrett EJ. Growth hormone acutely stimulates forearm muscle protein synthesis in normal humans. Am J Physiol. 1991, 260(3 Pt 1):E499-504.

201. Fryburg DA, Louard RJ, Gerow KE, Gelfand RA, Barrett EJ. Growth hormone stimulates skeletal muscle protein synthesis and antagonizes insulin's antiproteolytic action in humans. Diabetes. 1992, 41(4):424-9.

202. Fuh G, Cunningham BC, Fukunaga R, Nagata S, Goeddel DV, Wells JA. Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. Science. 1992, 256(5064):1677-80.

203. Fujimoto T. GPI-anchored proteins, glycosphingolipids, and sphingomyelin are sequestered to caveolae only after crosslinking. J Histochem Cytochem. 1996, 44(8):929-41.

204. Fujimoto T, Hayashi M, Iwamoto M, Ohno-Iwashita Y. Crosslinked plasmalemmal cholesterol is sequestered to caveolae: analysis with a new cytochemical probe. J Histochem Cytochem. 1997, 45(9):1197-205.

205. Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T. Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. J Cell Sci. 2000, 113 Pt 19:3509-17.

206. Furuchi T, Anderson RG. Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). J Biol Chem. 1998, 273(33):21099-104.

207. Futter CE, Pearse A, Hewlett LJ, Hopkins CR. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. J Cell Biol. 1996, 132(6):1011-23.

G

208. Ganitkevich VY. The role of mitochondria in cytoplasmic Ca2+ cycling. Exp Physiol. 2003, 88(1):91-7.

209. Galsgaard ED, Gouilleux F, Groner B, Serup P, Nielsen JH, Billestrup N. Identification of a growth hormone-responsive STAT5-binding element in the rat insulin 1 gene. Mol Endocrinol. 1996, 10(6):652-60.

210. Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. J Biol Chem. 1997, 272(41):25437-40.

211. Garcia-Horsman JA, Barquera B, Rumbley J, Ma J, Gennis RB. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. J Bacteriol. 1994, 176(18):5587-600.

212. Gaur S, Yamaguchi H, Goodman HM. Growth hormone increases calcium uptake in rat fat cells by a mechanism dependent on protein kinase C. Am J Physiol. 1996, 270(5 Pt 1):C1485-92.

213. Gavin JR 3rd, Saltman RJ, Tollefsen SE. Growth hormone receptors in isolated rat adipocytes. Endocrinology. 1982, 110(2):637-43.

214. Gebert CA, Park SH, Waxman DJ. Down-regulation of liver JAK2-STAT5b signaling by the female plasma pattern of continuous growth hormone stimulation. Mol Endocrinol. 1999a, 13(2):213-27.

215. Gebert CA, Park SH, Waxman DJ. Termination of growth hormone pulse-induced STAT5b signaling. Mol Endocrinol. 1999 b, 13(1):38-56.

216. Gent J, Van Den Eijnden M, Van Kerkhof P, Strous GJ. Dimerization and signal transduction of the growth hormone receptor. Mol Endocrinol. 2003, 17(5):967-75.

217. Gent J, van Kerkhof P, Roza M, Bu G, Strous GJ. Ligand-independent growth hormone receptor dimerization occurs in the endoplasmic reticulum and is required for ubiquitin system-dependent endocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99(15):9858-63.

218. Gill MS, Toogood AA, Jones J, Clayton PE, Shalet SM. Serum leptin response to the acute and chronic administration of growth hormone (GH) to elderly subjects with GH deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 1999, 84(4):1288-95.

219. Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. Endocr Rev. 1998, 19 : 717-97.

220. Glenney JR Jr. The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. FEBS Lett. 1992, 314(1):45-8.

221. Glenney JR Jr, Soppet D. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992, 89(21):10517-21.

222. Gluckman PD, Grumbach MM, Kaplan SL. The neuroendocrine regulation and function of growth hormone and prolactin in the mammalian fetus. Endocr Rev. 1981, 2(4):363-95.

223. Godowski PJ, Leung DW, Meacham LR, Galgani JP, Hellmiss R, Keret R, Rotwein PS, Parks JS, Laron Z, Wood WI. 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 U S A. 1989, 86(20):8083-7.

224. Goffin V, Kelly PA. The prolactin/growth hormone receptor family: structure/function relationships. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 1997, 2(1):7-17.

225. Goglia F, Lanni A, Horst C, Moreno M, Thoma R. In vitro binding of 3,5-di-iodo-L-thyronine to rat liver mitochondria. J Mol Endocrinol. 1994, 13(3):275-82.

226. Goglia F, Silvestri E, Lanni A. Thyroid hormones and mitochondria. Biosci Rep. 2002, 22(1):17-32.

227. Goh EL, Pircher TJ, Lobie PE. Growth hormone promotion of tubulin polymerization stabilizes the microtubule network and protects against colchicine-induced apoptosis. Endocrinology. 1998, 139(10):4364-72.

228. Goh EL, Pircher TJ, Wood TJ, Norstedt G, Graichen R, Lobie PE. Growth hormone-induced reorganization of the actin cytoskeleton is not required for STAT5 (signal transducer and activator of transcription-5)-mediated transcription. Endocrinology. 1997, 138(8):3207-15.

229. Goh EL, Zhu T, Yakar S, LeRoith D, Lobie PE. 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. 2000, 275(23):17683-92.

230. Goldsmith JF, Lee SJ, Jiang J, Frank SJ. Growth hormone induces detergent insolubility of GH receptors in IM-9 cells. Am J Physiol. 1997, 273(5 Pt 1):E932-41.

231. Goligorsky MS, Li H, Brodsky S, Chen J. Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. Am J Physiol Renal Physiol. 2002, 283(1):F1-10.

232. Gonzalez FA, Raden DL, Davis RJ. Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. J Biol Chem. 1991, 266(33):22159-63.

233. Goodman HM, Frick GP. Effects of growth hormone on the oxidation of [1-14C]-pyruvate in adipose tissue of hypophysectomized rats. Horm Metab Res. 1981, 13(6):351-5.

234. Gossard F, Dihl F, Pelletier G, Dubois PM, Morel G. In situ hybridization to rat brain and pituitary gland of growth hormone cDNA. Neurosci Lett. 1987, 79(3):251-6.

235. Goujon L, Allevato G, Simonin G, Paquereau L, Le Cam A, Clark J, Nielsen JH, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M, Kelly PA. Cytoplasmic sequences of the growth hormone receptor necessary for signal transduction. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994, 91(3):957-61.

236. Govers R, ten Broeke T, van Kerkhof P, Schwartz AL, Strous GJ. Identification of a novel ubiquitin conjugation motif, required for ligand-induced internalization of the growth hormone receptor. EMBO J. 1999, 18(1):28-36.

237. Govers R, van Kerkhof P, Schwartz AL, Strous GJ. Di-leucine-mediated internalization of ligand by a truncated growth hormone receptor is independent of the ubiquitin conjugation system. J Biol Chem. 1998, 273(26):16426-33.

238. Govers R, van Kerkhof P, Schwartz AL, Strous GJ. Linkage of the ubiquitin-conjugating system and the endocytic pathway in ligand-induced internalization of the growth hormone receptor. EMBO J. 1997, 16(16):4851-8.

239. Graf GA, Matveev SV, Smart EJ. Class B scavenger receptors, caveolae and cholesterol homeostasis. Trends Cardiovasc Med. 1999, 9(8):221-5.

240. Gravholt CH, Schmitz O, Simonsen L, Bulow J, Christiansen JS, Moller N. Effects of a physiological GH pulse on interstitial glycerol in abdominal and femoral adipose tissue. Am J Physiol. 1999, 277(5 Pt 1):E848-54.

241. Graichen R, Sandstedt J, Goh EL, Isaksson OG, Tornell J, Lobie PE. The growth hormone-binding protein is a location-dependent cytokine receptor transcriptional enhancer. J Biol Chem. 2003, 278(8):6346-54.

242. Green H, Morikawa M, Nixon T. A dual effector theory of growth-hormone action. Differentiation. 1985, 29(3):195-8.

243. Grichting G, Levy LK, Goodman HM. Relationship between binding and biological effects of human growth hormone in rat adipocytes. Endocrinology. 1983, 113:1111-20.

244. Groves WE, Houts GE, Bayse GS. Subcellular distribution of 125 I-labeled bovine growth hormone in rat liver and kidney. Biochim Biophys Acta. 1972, 264(3):472-80.

245. Guan JL, Chen HC. Signal transduction in cell-matrix interactions. Int Rev Cytol. 1996, 168:81-121.

246. Guichet A, Wucherpfennig T, Dudu V, Etter S, Wilsch-Brauniger M, Hellwig A, Gonzalez-Gaitan M, Huttner WB, Schmidt AA. Essential role of endophilin A in synaptic vesicle budding at the Drosophila neuromuscular junction. EMBO J. 2002, 21(7):1661-72.

247. Gurland G, Ashcom G, Cochran BH, Schwartz J. Rapid events in growth hormone action. Induction of c-fos and c-jun transcription in 3T3-F442A preadipocytes. Endocrinology. 1990, 127(6):3187-95.

248. Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, Ramsing C, Thorn H, Borg M, Lindroth M, Peterson KH, Magnusson KE, Stralfors P. Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. FASEB J. 1999, 13(14):1961-71.

H

249. Hachiya N, Mihara K, Suda K, Horst M, Schatz G, Lithgow T. Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. Nature. 1995, 376(6542):705-9.

250. Hackenbrock CR. Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. Proc Natl Acad Sci U S A. 1968, 61(2):598-605.

251. Hackett RH, Wang YD, Sweitzer S, Feldman G, Wood WI, Larner AC. Mapping of a cytoplasmic domain of the human growth hormone receptor that regulates rates of inactivation of Jak2 and Stat proteins. J Biol Chem. 1997, 272(17):11128-32.

252. Haeffner A, Deas O, Mollereau B, Estaquier J, Mignon A, Haeffner-Cavaillon N, Charpentier B, Senik A, Hirsch F. Growth hormone prevents human monocytic cells from Fas-mediated apoptosis by up-regulating Bcl-2 expression. Eur J Immunol. 1999, 29(1):334-44.

253. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. Science. 1995, 269(5223):543-6.

254. Han Y, Leaman DW, Watling D, Rogers NC, Groner B, Kerr IM, Wood WI, Stark GR. Participation of JAK and STAT proteins in growth hormone-induced signaling. J Biol Chem. 1996, 271(10):5947-52.

255. Hannan LA, Newmyer SL, Schmid SL. ATP- and cytosol-dependent release of adaptor proteins from clathrin-coated vesicles: A dual role for Hsc70. Mol Biol Cell. 1998, 9(8):2217-29.

256. Hansen JA, Lindberg K, Hilton DJ, Nielsen JH, Billestrup N. Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressor of cytokine signaling proteins. Mol Endocrinol. 1999, 13(11):1832-43.

257. Hansen LH, Wang X, Kopchick JJ, Bouchelouche P, Nielsen JH, Galsgaard ED, Billestrup N. Identification of tyrosine residues in the intracellular domain of the growth hormone receptor required for transcriptional signaling and Stat5 activation. J Biol Chem. 1996, 271(21):12669-73.

258. Hara K, Hsu Chen CJ, Sonenberg M. Recombination of the biologically active peptides from a tryptic digest of bovine growth hormone. Biochemistry. 1978, 17(3):550-6.

259. Harding PA, Wang X, Okada S, Chen WY, Wan W, Kopchick JJGrowth hormone (GH) and a GH antagonist promote GH receptor dimerization and internalization. J Biol Chem. 1996, 271(12):6708-12.

260. Hartl FU, Pfanner N, Nicholson DW, Neupert W. Mitochondrial protein import. Biochim Biophys Acta. 1989, 988(1):1-45.

261. Hartl FU, Schmidt B, Wachter E, Weiss H, Neupert W. Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase. Cell. 1986, 47(6):939-51.

262. Hartman ML, Veldhuis JD, Thorner MO. Normal control of growth hormone secretion. Horm Res. 1993, 40:37-47.

263. Haspel RL, Darnell JE Jr. A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999, 96(18):10188-93.

264. Hauser SD, McGrath MF, Collier RJ, Krivi GG. Cloning and in vivo expression of bovine growth hormone receptor mRNA. Mol Cell Endocrinol. 1990, 72(3):187-200.

265. Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. Dynamin-mediated internalization of caveolae. J Cell Biol. 1998, 141(1):85-99.

266. Herdegen T, Skene P, Bahr M. The c-Jun transcription factor--bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. Trends Neurosci. 1997, 20(5):227-31.

267. Herrington J, Carter-Su C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. Trends Endocrinol Metab. 2001, 12(6):252-7.

268. Herrington J, Smit LS, Schwartz J, Carter-Su C. The role of STAT proteins in growth hormone signaling. Oncogene. 2000, 19(21):2585-97.

269. Hershko A, Ciechanover A, Varshavsky A. Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. Nat Med. 2000, 6(10):1073-81.

270. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. Annu Rev Biochem. 1998, 67:425-79.

271. Hicke L, Zanolari B, Riezman H. Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. J Cell Biol. 1998, 141(2):349-58.

272. Higgins MK, McMahon HT.Snap-shots of clathrin-mediated endocytosis. Trends Biochem Sci. 2002, 27(5):257-63.

273. Hilton DJ. Negative regulators of cytokine signal transduction. Cell Mol Life Sci. 1999, 55(12):1568-77.

274. Hinshaw JE. Dynamin and its role in membrane fission. Annu Rev Cell Dev Biol. 2000, 16:483-519.

275. Hinshaw JE, Schmid SL. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. Nature. 1995, 374(6518):190-2.

276. Hirst J, Robinson MS. Clathrin and adaptors. Biochim Biophys Acta. 1998, 1404(1-2):173-93.

277. Ho KY, Veldhuis JD, Johnson ML, Furlanetto R, Evans WS, Alberti KG, Thorner MO. Fasting enhances growth hormone secretion and amplifies the complex rhythms of growth hormone secretion in man. J Clin Invest. 1988, 81(4):968-75.

278. Hodge C, Liao J, Stofega M, Guan K, Carter-Su C, Schwartz J. Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. J Biol Chem. 1998, 273(47):31327-36.

279. Hoppe T, Rape M, Jentsch S. Membrane-bound transcription factors: regulated release by RIP or RUP. Curr Opin Cell Biol. 2001, 13(3):344-8.

280. Horber FF, Haymond MW. Human growth hormone prevents the protein catabolic side effects of prednisone in humans. J Clin Invest. 1990, 86(1):265-72.

281. Horvath CM, Darnell JE. The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. Curr Opin Cell Biol. 1997, 9(2):233-9.

282. Horvath E, Kovacs K. Fine structural cytology of the adenohypophysis in rat and man. J Electron Microsc Tech. 1988, 8(4):401-32.

283. Huang CS, Zhou J, Feng AK, Lynch CC, Klumperman J, DeArmond SJ, Mobley WC. Nerve growth factor signaling in caveolae-like domains at the plasma membrane. J Biol Chem. 1999, 274(51):36707-14.

284. Hurt EC, Muller U, Schatz G.The first twelve amino acids of a yeast mitochondrial outer membrane protein can direct a nuclear-coded cytochrome oxidase subunit to the mitochondrial inner membrane. EMBO J. 1985, 4(13A):3509-18.

285. Hurxthal LM, Musulin N, Clinical Endocrinol., J.B. Lippincott Comp, Philadelphia, 1953, p 56.

286. Hussain MA, Schmitz O, Mengel A, Keller A, Christiansen JS, Zapf J, Froesch ER. Insulin-like growth factor I stimulates lipid oxidation, reduces protein oxidation, and enhances insulin sensitivity in humans. J Clin Invest. 1993, 92(5):2249-56.

287. Huttner WB, Schmidt A. Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission--insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. Curr Opin Neurobiol. 2000, 10(5):543-51.

I

288. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. Annu Rev Immunol. 1995, 13:369-98.

289. Ikonen E, Parton RG. Caveolins and cellular cholesterol balance. Traffic. 2000, 1(3):212-7.

290. Isaksson OG, Eden S, Jansson JO. Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. Annu Rev Physiol. 1985, 47:483-99.

291. Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. Science. 1982, 216(4551):1237-9.

292. Isshiki M, Anderson RG. Calcium signal transduction from caveolae. Cell Calcium. 1999, 26(5):201-8.

293. Ito J, Nagayasu Y, Kato K, Sato R, Yokoyama S.Apolipoprotein A-I induces translocation of cholesterol, phospholipid, and caveolin-1 to cytosol in rat astrocytes. J Biol Chem. 2002, 277(10):7929-35.

J

294. Jans DA, Hassan G. Nuclear targeting by growth factors, cytokines, and their receptors: a role in signaling? Bioessays. 1998, 20(5):400-11.

295. Jansson JO, Eden S, Isaksson O. Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr Rev.* 1985 6:128-50.

296. Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC, Baixeras E. Growth hormone prevents apoptosis through activation of nuclear factor-kappaB in interleukin-3-dependent Ba/F3 cell line. Mol Endocrinol. 2000, 14(5):650-61.

297. Jeay S, Sonenshein GE, Kelly PA, Postel-Vinay MC, Baixeras E. Growth hormone exerts antiapoptotic and proliferative effects through two different pathways involving nuclear factor-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase. Endocrinology. 2001, 142(1):147-56.

298. Jentsch S, Pyrowolakis G. Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? Trends Cell Biol. 2000, 10(8):335-42.

299. Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Leverson JD, Hunter T, Liu YC. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. Science. 1999, 286(5438):309-12.

300. Johannes L, Lamaze C. Clathrin-dependent or not: is it still the question? Traffic. 2002, 3(7):443-51.

301. Johannsson G, Rosen T, Lonn L, Bengtsson BA. Effects of recombinant human growth hormone on adipose tissue in adults with growth hormone deficiency. Acta Paediatr Suppl. 1994, 406:60-3; discussion 64.

302. Johnson RM, Napier MA, Cronin MJ, King KL. Growth hormone stimulates the formation of sn-1,2-diacylglycerol in rat hepatocytes. Endocrinology. 1990, 127(5):2099-103.

303. Johnston DG, Davies RR, Prescott RW. Regulation of growth hormone secretion in man: a review. J R Soc Med. 1985, 78(4):319-27.

304. Johnston JA, Kawamura M, Kirken RA, Chen YQ, Blake TB, Shibuya K, Ortaldo JR, McVicar DW, O'Shea JJ. Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. Nature. 1994, 370(6485):151-3.

305. Jorgensen JO, Vahl N, Fisker S, Norrelund H, Nielsen S, Dall R, Christiansen JS. Somatopause and adiposity. Horm Res. 1997, 48 Suppl 5:101-4.

K

306. Kamel A, Margery V, Norstedt G, Thoren M, Lindgren AC, Bronnegard M, Marcus C. Growth hormone (GH) treatment up-regulates GH receptor mRNA levels in adipocytes from patients with GH deficiency and Prader-Willi syndrome. Pediatr Res. 1995, 38(3):418-21.

307. Kanaji S, Iwahashi J, Kida Y, Sakaguchi M, Mihara K. Characterization of the signal that directs Tom20 to the mitochondrial outer membrane. J Cell Biol. 2000, 151(2):277-88.

308. Kannt A, Pfitzner U, Ruitenberg M, Hellwig P, Ludwig B, Mantele W, Fendler K, Michel H. Mutation of Arg-54 strongly influences heme composition and rate and directionality of electron transfer in Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase. J Biol Chem. 1999, 274(53):37974-81.

309. Kanzaki M, Pessin JE. Caveolin-associated filamentous actin (Cav-actin) defines a novel F-actin structure in adipocytes. J Biol Chem. 2002, 277(29):25867-9.

310. Kaput J, Goltz S, Blobel G. Nucleotide sequence of the yeast nuclear gene for cytochrome c peroxidase precursor. Functional implications of the pre sequence for protein transport into mitochondria. J Biol Chem. 1982, 257(24):15054-8.

311. Katkocin DM, Gupta KM, Collipp PJ, Maddaiah VT. Effects of growth hormone on respiration and ATPase activity of rat liver and heart mitochondria. Biochem Med. 1979, 22(1):134-44.

312. Kaulsay KK, Zhu T, Bennett W, Lee K, Lobie PE. The effects of autocrine human growth hormone (hGH) on human mammary carcinoma cell behavior are mediated via the hGH receptor. Endocrinology. 2001, 142(2):767-77.

313. Kellems RE, Allison VF, Butow RA. Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. J Cell Biol. 1975, 65(1):1-14.

314. Kelly PA, Ali S, Rozakis M, Goujon M, Nagano M, Pellegrini l. Gould D, Djiane J, Edery M, Finidori J, Postel-Vinay MC. The growth hormone/prolactin receptor family. Recent Prog Horm Res. 1993, 48: 123-164.

315. Kiebler M, Keil P, Schneider H, van der Klei IJ, Pfanner N, Neupert W. The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore. Cell. 1993, 4(3):483-92.

316. Kieslinger M, Woldman I, Moriggl R, Hofmann J, Marine JC, Ihle JN, Beug H, Decker T. Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation. Genes Dev. 2000, 14(2):232-44.

317. Kilgour E, Gout I, Anderson NG. Requirement for phosphoinositide 3-OH kinase in growth hormone signalling to the mitogen-activated protein kinase and p70s6k pathways. Biochem J. 1996, 315 (Pt 2):517-22.

318. Kim HP, Kelly J, Leonard WJ. The basis for IL-2-induced IL-2 receptor alpha chain gene regulation: importance of two widely separated IL-2 response elements. Immunity. 2001, 15(1):159-72.

319. Kim SO, Houtman JC, Jiang J, Ruppert JM, Bertics PJ, Frank SJ. Growth hormone-induced alteration in ErbB-2 phosphorylation status in 3T3-F442A fibroblasts. J Biol Chem. 1999, 274(50):36015-24.

320. Kim SO, Jiang J, Yi W, Feng GS, Frank SJ. Involvement of the Src homology 2-containing tyrosine phosphatase SHP-2 in growth hormone signaling. J Biol Chem. 1998, 273(4):2344-54.

321. Kim TK, Maniatis T. Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. Science. 1996, 273(5282):1717-9.

322. King AP, Tseng MJ, Logsdon CD, Billestrup N, Carter-Su C. Distinct cytoplasmic domains of the growth hormone receptor are required for glucocorticoid- and phorbol ester-induced decreases in growth hormone (GH) binding. These domains are different from that reported for GH-induced receptor internalization. J Biol Chem. 1996, 271(30):18088-94.

323. Kirchhausen T, Bonifacino JS, Riezman H. Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. Curr Opin Cell Biol. 1997, 9(4):488-95.

324. Kirchhausen T, Harrison SC. Protein organization in clathrin trimers. Cell. 1981 Mar;23(3):755-61.

325. Kirchhausen T. Clathrin. Annu Rev Biochem. 2000a, 69:699-727.

326. Kirchhausen T. Three ways to make a vesicle. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000b, 1(3):187-98.

327. Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. Cell. 1994, 76(2):253-62.

328. Kishi F, Suminami Y, Monaco JJ. Genomic organization of the mouse Lmp-2 gene and characteristic structure of its promoter. Gene. 1993, 133(2):243-8.

329. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. Gene. 2002, 285(1-2):1-24.

330. Kitamura T, Ogorochi T, Miyajima A. Multimeric cytokine receptors. TEM. 1994, 5 : 8-13.

331. Kleene R, Pfanner N, Pfaller R, Link TA, Sebald W, Neupert W, Tropschug M. Mitochondrial porin of Neurospora crassa: cDNA cloning, in vitro expression and import into mitochondria. EMBO J. 1987, 6(9):2627-33.

332. Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001, 2(3):179-87.

333. Koehler CM. Protein translocation pathways of the mitochondrion. FEBS Lett. 2000, 476(1-2):27-31.

334. Koehler CM, Jarosch E, Tokatlidis K, Schmid K, Schweyen RJ, Schatz G. Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. Science. 1998a, 279(5349):369-73.

335. Koehler CM, Merchant S, Oppliger W, Schmid K, Jarosch E, Dolfini L, Junne T, Schatz G, Tokatlidis K. Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. EMBO J. 1998, 17(22):6477-86.

336. Kofoed EM, Hwa V, Little B, Woods KA, Buckway CK, Tsubaki J, Pratt KL, Bezrodnik L, Jasper H, Tepper A, Heinrich JJ, Rosenfeld RG. Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. N Engl J Med. 2003, 349(12):1139-47.

337. Kogo H, Fujimoto T. Caveolin-1 isoforms are encoded by distinct mRNAs. Identification Of mouse caveolin-1 mRNA variants caused by alternative transcription initiation and splicing. FEBS Lett. 2000, 465(2-3):119-23.

338. Komiya T, Rospert S, Koehler C, Looser R, Schatz G, Mihara K. Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis. EMBO J. 1998, 17(14):3886-98.

339. Kopchick JJ, Andry JM. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. Mol Genet Metab. 2000, 71(1-2):293-314.

340. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. J Cell Sci. 2000, 113 (Pt 16):2813-9.

341. Kuhn ER, Vleurick L, Edery M, Decuypere E, Darras VM. Internalization of the chicken growth hormone receptor complex and its effect on biological functions. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2002, 132(1):299-308.

342. Kurzchalia TV, Dupree P, Monier S. VIP21-Caveolin, a protein of the trans-Golgi network and caveolae. FEBS Lett. 1994, 346(1):88-91.

343. Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, Simons K. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. J Cell Biol. 1992, 118(5):1003-14.

344. Kurzchalia TV, Parton RG. Membrane microdomains and caveolae. Curr Opin Cell Biol. 1999, 11(4):424-31.

345. Kuyznierewicz I, Thomson M. GTP-binding proteins G(salpha), G(ialpha), and Ran identified in mitochondria of human placenta. Cell Biol Int. 2002, 26(1):99-108.

L

346. Lahuna O, Rastegar M, Maiter D, Thissen JP, Lemaigre FP, Rousseau GG. Involvement of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) and HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) in the transcriptional control of the hnf6 gene by growth hormone. Mol Endocrinol. 2000, 14(2):285-94.

347. Lange Y. Cholesterol movement from plasma membrane to rough endoplasmic reticulum. Inhibition by progesterone. J Biol Chem. 1994, 269(5):3411-4.

348. Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F. Rapid stimulation in vitro of rat liver cytochrome oxidase activity by 3,5-diiodo-L-thyronine and by 3,3'-diiodo-L-thyronine. Mol Cell Endocrinol. 1994, 99(1):89-94.

349. Laron Z. An update on Laron syndrome. Arch Dis Child. 1993, 68(3):345-6.

350. Le PU, Guay G, Altschuler Y, Nabi IR. Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 2002, 277(5):3371-9.

351. Leaman DW, Pisharody S, Flickinger TW, Commane MA, Schlessinger J, Kerr IM, Levy DE, Stark GR. Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor. Mol Cell Biol. 1996, 16(1):369-75.

352. Leary SC, Barton KN, Ballantyne JS. Direct effects of 3,5,3'-triiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on mitochondrial metabolism in the goldfish Carassius auratus. Gen Comp Endocrinol. 1996, 104(1):61-6.

353. Lee C, Piazza F, Brutsaert S, Valens J, Strehlow I, Jarosinski M, Saris C, Schindler C. Characterization of the Stat5 protease. J Biol Chem. 1999, 274(38):26767-75.

354. Lee CK, Bluyssen HA, Levy DE. Regulation of interferon-alpha responsiveness by the duration of Janus kinase activity. J Biol Chem. 1997, 272(35):21872-7.

355. Lemmon MA, Flanagan JM, Hunt JF, Adair BD, Bormann BJ, Dempsey CE, Engelman DM. Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices. J Biol Chem. 1992, 267(11):7683-9.

356. Lemmon SK, Traub LM. Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. Curr Opin Cell Biol. 2000, 12(4):457-66.

357. Le Roith D, Scavo L, Butler A.What is the role of circulating IGF-I? Trends Endocrinol Metab. 2001, 12(2):48-52.

358. Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds RG, Collins C, Henzel WJ, Barnard R, Waters MJ, Wood WI. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. Nature. 1987, 330(6148):537-43.

359. Leverve XM, Fontaine E. Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ. IUBMB Life. 2001, 52(3-5):221-9.

360. Levkowitz G, Oved S, Klapper LN, Harari D, Lavi S, Sela M, Yarden Y. c-Cbl is a suppressor of the neu oncogene. J Biol Chem. 2000, 275(45):35532-9.

361. Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, Beguinot L, Geiger B, Yarden Y. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. Genes Dev. 1998, 12(23):3663-74.

362. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv Cancer Res. 1998, 74:49-139.

363. Lewis, UJ. Growth hormone. What is it and what does it do ? Trend Endocrinol. Metab, 1992, 3 :117-121.

364. Li CH, Dixon JS. Human pituitary growth hormone. 32. The primary structure of the hormone: revision. Arch Biochem Biophys. 1971, 146(1):233-6.

365. Li CH, Evans HM, Simpson ME. Isolation and properties of the anterior hypophyseal growth hormone. J Biol Chem. 1945, 159 : 353-366.

366. Li CH, Evans HM. The isolation of pituitary growth hormone. Science. 1944, 99 :183-184.

367. Li CH, Papkoff H. Preparation and properties of growth hormone from human and monkey pituitary glands. Science. 1956, 124(3235):1293-4.

368. Li CH, Simpson ME, Evans HM. Influence of growth and adrenocorticotropic hormones on the body composition of hypophysectomized rats. Endocrinology. 1949, 44:71-75.

369. Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. J Biol Chem. 1996c, 271(46):29182-90.

370. Li S, Okamoto T, Chun M, Sargiacomo M, Casanova JE, Hansen SH, Nishimoto I, Lisanti MP. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. J Biol Chem. 1995, 270(26):15693-701.

371. Li S, Seitz R, Lisanti MP. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. J Biol Chem. 1996a, 271(7):3863-8.

372. Li S, Song KS, Lisanti MP. Expression and characterization of recombinant caveolin. Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes. J Biol Chem. 1996b, 271(1):568-73.

373. Li WP, Liu P, Pilcher BK, Anderson RG. Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. J Cell Sci. 2001, 114(Pt 7):1397-408.

374. Liang L, Jiang J, Frank SJ. Insulin receptor substrate-1-mediated enhancement of growth hormone-induced mitogen-activated protein kinase activation. Endocrinology. 2000, 141(9):3328-36.

375. Liao J, Fu Y, Shuai K. Distinct roles of the NH2- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000, 97(10):5267-72.

376. Liberti JP, Navon RS, Longman ES, Jezyk PF. Hepatic lipid metabolism in hypophysectomized and growth hormone-treated hypophysectomized rats. Proc Soc Exp Biol Med. 1970, 133(4):1346-50.

377. Liou JY, Deng WG, Gilroy DW, Shyue SK, Wu KK. Colocalization and interaction of cyclooxygenase-2 with caveolin-1 in human fibroblasts. J Biol Chem. 2001, 276(37):34975-82.

378. Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. J Cell Biol. 1994, 126(1):111-26.

379. Lisanti MP, Tang ZL, Sargiacomo M. Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae. J Cell Biol. 1993, 123(3):595-604.

380. Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998a, 95(18):10626-31.

381. Liu JL, Grinberg A, Westphal H, Sauer B, Accili D, Karas M, LeRoith D. Insulin-like growth factor-I affects perinatal lethality and postnatal development in a gene dosage-dependent manner: manipulation using the Cre/loxP system in transgenic mice. Mol Endocrinol. 1998b, 12(9):1452-62.

382. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). Cell. 1993, 75(1):59-72.

383. Liu P, Anderson RG. Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. J Biol Chem. 1995, 270(45):27179-85.

384. Liu P, Li WP, Machleidt T, Anderson RG. Identification of caveolin-1 in lipoprotein particles secreted by exocrine cells. Nat Cell Biol. 1999, 1(6):369-75.

385. Liu P, Rudick M, Anderson RG. Multiple functions of caveolin-1. J Biol Chem. 2002, 277(44):41295-8.

386. Lobie PE, Allevato G, Nielsen JH, Norstedt G, Billestrup N. Requirement of tyrosine residues 333 and 338 of the growth hormone (GH) receptor for selected GH-stimulated function. J Biol Chem. 1995, 270(37):21745-50.

387. Lobie PE, Mertani H, Morel G, Morales-Bustos O, Norstedt G, Waters MJ. Receptor-mediated nuclear translocation of growth hormone. J Biol Chem. 1994, 269(33):21330-9.

388. Lobie PE, Sadir R, Graichen R, Mertani HC, Morel G. Caveolar internalization of growth hormone. Exp Cell Res. 1999, 246(1):47-55.

389. Lobie PE, Waxman DJ. Growth hormone. In : Encyclopedia of hormones/ed. par HL Henry, AW Norman. Academic press, 2003.-P. 208-216.

390. Lobie PE, Zhu T, Graichen R, Goh EL. Growth hormone, insulin-like growth factor I and the CNS: localization, function and mechanism of action. Growth Horm IGF Res. 2000, 10 Suppl B:S51-6.

391. London E, Brown DA. Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). Biochim Biophys Acta. 2000, 1508(1-2):182-95.

392. Londos, C, Brasaemle, DL, Schultz, CJ, Segrest, JP, and Kimmel, AR. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. Semin. Cell Dev. Biol. 1999, 10:51-58.

393. Longva KE, Blystad FD, Stang E, Larsen AM, Johannessen LE, Madshus IH. Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. J Cell Biol. 2002, 156(5):843-54.

394. Look DC, Pelletier MR, Tidwell RM, Roswit WT, Holtzman MJ. Stat1 depends on transcriptional synergy with Sp1. J Biol Chem. 1995, 270(51):30264-7.

395. Losinski NE, Horvath E, Kovacs K. Double-labeling immunogold electron microscopic study of hormonal colocalization in nontumorous and adenomatous rat pituitaries. Am J Anat. 1989, 185:236-243.

396. Love DW, Whatmore AJ, Clayton PE, Silva CM. Growth hormone stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway is cell type specific. Endocrinology. 1998, 139(4):1965-71.

397. Lundeberg S, Belfrage M, Wernerman J, von der Decken A, Thunell S, Vinnars E. Growth hormone improves muscle protein metabolism and whole body nitrogen economy in man during a hyponitrogenous diet. Metabolism. 1991, 40(3):315-22.

M

398. Maarse AC, Blom J, Grivell LA, Meijer M. MPI1, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria. EMBO J. 1992, 11(10):3619-28.

399. MacBride HM, Millar DG, Li JM, Shore GC. A signal-anchor sequence selective for the mitochondrial outer membrane. J Cell Biol. 1992, 119(6):1451-7.

400. Machleidt T, Li WP, Liu P, Anderson RG. Multiple domains in caveolin-1 control its intracellular traffic. J Cell Biol. 2000, 148(1):17-28.

401. MacKenzie S, Fleming I, Houslay MD, Anderson NG, Kilgour E. Growth hormone and phorbol esters require specific protein kinase C isoforms to activate mitogen-activated protein kinases in 3T3-F442A cells. Biochem J. 1997, 324 (Pt 1):159-65.

402. MacLeod JN, Pampori NA, Shapiro BH. Sex differences in the ultradian pattern of plasma growth hormone concentrations in mice. J Endocrinol. 1991 131:395-9.

403. MacNiven MA, Cao H, Pitts KR, Yoon Y. The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. Trends Biochem Sci. 2000, 25(3):115-20.

404. Maddaiah VT, Clejan S. Growth hormone and liver mitochondria: time course of effects on respiration and fatty acid composition in hypophysectomized rats. Endocrinology. 1986, 119(1):250-2.

405. Maddaiah VT, Collipp PJ, Lin JH, Duffy JL. Growth hormone and liver mitochondria effect on morphology and protein turnover. Biochem Med. 1976a, 16(1):47-54.

406. Maddaiah VT, Rezvani I, Chen SY, Collipp PJ. Distribution of 3 H-acetyl human growth hormone in subcellular fractions of rat liver. Biochem Med. 1970, 4(5):492-9.

407. Maddaiah VT, Sharma RK, Balachandar V, Rezvani I, Collipp PJ, Chen SY. Effect of growth hormone on mitochondrial protein synthesis. J Biol Chem. 1973, 248(12):4263-8.

408. Maddaiah VT, Weston CL, Chen SY, Collipp PJ. Growth hormone and liver mitochondria. Effects on cytochromes and some enzymes. Arch Biochem Biophys. 1976b, 173(1):225-30.

409. Maggi D, Biedi C, Segat D, Barbero D, Panetta D, Cordera R. IGF-I induces caveolin 1 tyrosine phosphorylation and translocation in the lipid rafts. Biochem Biophys Res Commun. 2002, 295(5):1085-9.

410. Malatesta F, Nicoletti F, Zickermann V, Ludwig B, Brunori M. Electron entry in a CuA mutant of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans. Conclusive evidence on the initial electron entry metal center. FEBS Lett. 1998, 434(3):322-4.

411. Maniatis T, Falvo JV, Kim TH, Kim TK, Lin CH, Parekh BS, Wathelet MG. Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1998, 63:609-20.

412. Mannella CA, Marko M, Buttle K. Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. Trends Biochem Sci. 1997, 22(2):37-8.

413. Mannella CA, Marko M, Penczek P, Barnard D, Frank J. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. Microsc Res Tech. 1994, 27(4):278-83.

414. Mannor DA, Winer LM, Shaw MA, Baumann G. Plasma growth hormone (GH)-binding proteins: effect on GH binding to receptors and GH action. J Clin Endocrinol Metab. 1991, 73(1):30-4.

415. Manson JM, Wilmore DW. Positive nitrogen balance with human growth hormone and hypocaloric intravenous feeding. Surgery. 1986, 100(2):188-97.

416. Marsh M, McMahon HT. The structural era of endocytosis. Science. 1999, 285(5425):215-20.

417. Martial JA, Hallewell RA, Baxter JD, Goodman HM. Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. Science. 1979, 205(4406):602-7.

418. Martin FC, Yeo AL, Sonksen PH. Growth hormone secretion in the elderly: ageing and the somatopause. Baillieres Clin Endocrinol Metab. 1997, 11:223-50.

419. Martino A, Holmes JH 4th, Lord JD, Moon JJ, Nelson BH. Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2. J Immunol. 2001, 166(3):1723-9.

420. Mathews LS, Enberg B, Norstedt G. Regulation of rat growth hormone receptor gene expression. J Biol Chem. 1989, 264(17):9905-10.

421. Matsubara T, Hasegawa T, Tochino Y, Tanaka A, Uemura-Ishikawa Y. The effects of hypophysectomy on the structure and function of rat liver mitochondria. J Biochem (Tokyo). 1972, 72(6):1379-90.

422. Matsumoto A, Seki Y, Kubo M, Ohtsuka S, Suzuki A, Hayashi I, Tsuji K, Nakahata T, Okabe M, Yamada S, Yoshimura A. Suppression of STAT5 functions in liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice. Mol Cell Biol. 1999, 19(9):6396-407.

423. Mayer A, Neupert W, Lill R. Mitochondrial protein import: reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding. Cell. 1995, 80(1):127-37.

424. Mayo KE, Miller T, DeAlmeida V, Godfrey P, Zheng J, Cunha SR. Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor. Recent Prog Horm Res. 2000, 55:237-66.

425. Meier VS, Groner B. The nuclear factor YY1 participates in repression of the beta-casein gene promoter in mammary epithelial cells and is counteracted by mammary gland factor during lactogenic hormone induction. Mol Cell Biol. 1994, 14(1):128-37.

426. Melen K, Kinnunen L, Julkunen I. Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs. J Biol Chem. 2001, 276(19):16447-55.

427. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Kremer L, von Kobbe C, de Ana AM, Merida I, Martinez-A C. Conformational changes required in the human growth hormone receptor for growth hormone signaling. J Biol Chem. 1997, 272(14):9189-96.

428. Mendrola JM, Berger MB, King MC, Lemmon MA. The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. J Biol Chem. 2002, 277(7):4704-12.

429. Menon RK, Stephan DA, Singh M, Morris SM Jr, Zou L. Cloning of the promoter-regulatory region of the murine growth hormone receptor gene. Identification of a developmentally regulated enhancer element. J Biol Chem. 1995, 270(15):8851-9.

430. Mertani HC, Morel G. In situ gene expression of growth hormone (GH) receptor and GH binding protein in adult male rat tissues. Mol Cell Endocrinol. 1995, 109(1):47-61.

431. Mertani HC, Raccurt M, Abbate A, Kindblom J, Tornell J, Billestrup N, Usson Y, Morel G, Lobie PE. Nuclear translocation and retention of growth hormone. Endocrinology. 2003, 144: 3182-3195.

432. Mertani HC, Waters MJ, Morel G. Cellular trafficking of exogenous growth hormone in dwarf rat pituitary. Neuroendocrinology. 1996, 63(3):257-68.

433. Mertani HC, Zhu T, Goh EL, Lee KO, Morel G, Lobie PE. 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. 2001, 276(24):21464-75.

434. Meyer DJ, Campbell GS, Cochran BH, Argetsinger LS, Larner AC, Finbloom DS, Carter-Su C, Schwartz J. Growth hormone induces a DNA binding factor related to the interferon-stimulated 91-kDa transcription factor. J Biol Chem. 1994, 269(7):4701-4.

435. Meyer J, Jucker M, Ostertag W, Stocking C. Carboxyl-truncated STAT5beta is generated by a nucleus-associated serine protease in early hematopoietic progenitors. Blood. 1998, 91(6):1901-8.

436. Miller WL, Eberhardt NL. Structure and evolution of the growth hormone gene family. Endocr Rev. 1983, 4:97-130.

437. Mineo C, Gill GN, Anderson RG. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. J Biol Chem. 1999, 274(43):30636-43.

438. Mineo C, Ying YS, Chapline C, Jaken S, Anderson RG. Targeting of protein kinase C alpha to caveolae. J Cell Biol. 1998, 141(3):601-10.

439. Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Niles WD, Gilchrist A, Hamm HE, Malik AB. Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. J Cell Biol. 2000, 150(5):1057-70.

440. Miyake S, Lupher ML Jr, Druker B, Band H. The tyrosine kinase regulator Cbl enhances the ubiquitination and degradation of the platelet-derived growth factor receptor alpha. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95(14):7927-32.

441. Model K, Meisinger C, Prinz T, Wiedemann N, Truscott KN, Pfanner N, Ryan MT. Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. Nat Struct Biol. 2001, 8(4):361-70.

442. Mol JA, Henzen-Logmans SC, Hageman P, Misdorp W, Blankenstein MA, Rijnberk A.Expression of the gene encoding growth hormone in the human mammary gland. J Clin Endocrinol Metab. 1995, 80(10):3094-6.

443. Moldrup A, Allevato G, Dyrberg T, Nielsen JH, Billestrup N. Growth hormone action in rat insulinoma cells expressing truncated growth hormone receptors. J Biol Chem. 1991, 266(26):17441-5.

444. Moller C, Emtner M, Arner P, Norstedt G. Growth hormone regulation of lipid metabolism in cells transfected with growth hormone receptor cDNA. Mol Cell Endocrinol. 1994, 99(1):111-7.

445. Moller C, Hansson A, Enberg B, Lobie PE, Norstedt G. Growth hormone (GH) induction of tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in cells transfected with rat GH receptor cDNA. J Biol Chem. 1992, 267(32):23403-8.

446. Moller N, Butler PC, Antsiferov MA, Alberti KG. Effects of growth hormone on insulin sensitivity and forearm metabolism in normal man. Diabetologia. 1989, 32(2):105-10.

447. Moller N, Gjedsted J, Gormsen L, Fuglsang J, Djurhuus C. Effects of growth hormone on lipid metabolism in humans. Growth Horm IGF Res. 2003, 13 Suppl:S18-21.

448. Moller N, Jorgensen JO, Alberti KG, Flyvbjerg A, Schmitz O. Short-term effects of growth hormone on fuel oxidation and regional substrate metabolism in normal man. J Clin Endocrinol Metab. 1990a, 70(4):1179-86.

449. Moller N, Jorgensen JO, Schmitz O, Moller J, Christiansen J, Alberti KG, Orskov H. Effects of a growth hormone pulse on total and forearm substrate fluxes in humans. Am J Physiol. 1990b, 258(1 Pt 1):E86-91.

450. Moller N, Porksen N, Ovesen P, Alberti KG. Evidence for increased sensitivity of fuel mobilization to growth hormone during short-term fasting in humans. Horm Metab Res. 1993, 25(3):175-9.

451. Monier S, Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM, Kurzchalia TV. Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. FEBS Lett. 1996, 388(2-3):143-9.

452. Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. Mol Biol Cell. 1995, 6(7):911-27.

453. Montesano R, Roth J, Robert A, Orci L. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. Nature. 1982, 296(5858):651-3.

454. Mora R, Bonilha VL, Marmorstein A, Scherer PE, Brown D, Lisanti MP, Rodriguez-Boulan E. Caveolin-2 localizes to the golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when co-expressed with caveolin-1. J Biol Chem. 1999, 274(36):25708-17.

455. Morales O, Samuelsson MK, Lindgren U, Haldosen LA. Effects of 1{alpha}, 25-Dihydroxyvitamin D3 and Growth Hormone on apoptosis and proliferation in UMR 106 osteoblast like cells. Endocrinology. 2003, ref : doi:10.1210/en.2003-0718.

456. Morel G, Dihl F, Gossard F. 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. 1989, 65:81-90.

457. Morel G, Gallego R, Boulanger L, Pintos E, Garcia-Caballero T, Gaudreau P. Restricted presence of the growth hormone-releasing hormone receptor to somatotropes in rat and human pituitaries. Neuroendocrinology. 1999, 70:128-36.

458. Morel G. Internalization and nuclear localization of peptide hormones. Biochem Pharmacol. 1994, 47:63-76.

459. Motley A, Bright NA, Seaman MN, Robinson MS. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. J Cell Biol. 2003, 162(5):909-18.

460. Moulin S, Bouzinba-Segard H, Kelly PA, Finidori J. Jak2 and proteasome activities control the availability of cell surface growth hormone receptors during ligand exposure. Cell Signal. 2003, 15(1):47-55.

461. Moutoussamy S, Renaudie F, Lago F, Kelly PA, Finidori J. Grb10 identified as a potential regulator of growth hormone (GH) signaling by cloning of GH receptor target proteins. J Biol Chem. 1998, 273(26):15906-12.

462. Mowen KA, Tang J, Zhu W, Schurter BT, Shuai K, Herschman HR, David M. Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. Cell. 2001, 104(5):731-41.

463. Muhlethaler-Mottet A, Di Berardino W, Otten LA, Mach B. Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. Immunity. 1998, 8(2):157-66.

464. Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR. Endocytosis. Physiol Rev. 1997, 77(3):759-803.

465. Mundy DI, Machleidt T, Ying YS, Anderson RG, Bloom GS. Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. J Cell Sci. 2002, 115(Pt 22):4327-39.

466. Murakami H, Pain D, Blobel G. 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. J Cell Biol. 1988, 107(6 Pt 1):2051-7.

467. Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995, 92(22):10339-43.

468. Murphy LJ, Lazarus L. The mouse fibroblast growth hormone receptor: ligand processing and receptor modulation and turnover. Endocrinology. 1984, 115(4):1625-32.

469. Murphy, D.J., and Vance, J. Mechanisms of lipid-body formation. Trends Biochem. Sci. 1999, 24:109-115.

470. Musashi M, Ota S, Shiroshita N. The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. Int J Hematol. 2000, 72(1):12-9.

471. Mutvei A, Husman B, Andersson G, Nelson BD. Thyroid hormone and not growth hormone is the principle regulator of mammalian mitochondrial biogenesis. Acta Endocrinol (Copenh). 1989, 121(2):223-8.

472. Mylonas PG, Matsouka PT, Papandoniou EV, Vagianos C, Kalfarentzos F, Alexandrides TK. Growth hormone and insulin-like growth factor I protect intestinal cells from radiation induced apoptosis. Mol Cell Endocrinol. 2000, 160(1-2):115-22.

N

473. Nagai H, Naka T, Terada Y, Komazaki T, Yabe A, Jin E, Kawanami O, Kishimoto T, Konishi N, Nakamura M, Kobayashi Y, Emi M. Hypermethylation associated with inactivation of the SOCS-1 gene, a JAK/STAT inhibitor, in human hepatoblastomas. J Hum Genet. 2003, 48(2):65-9.

474. Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto T. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. Nature. 1997, 387(6636):924-9.

475. Nakai M, Hase T, Matsubara H. Precise determination of the mitochondrial import signal contained in a 70 kDa protein of yeast mitochondrial outer membrane. J Biochem (Tokyo). 1989, 105(4):513-9.

476. Nakane PK. Classification of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. J. Histochem. Cytochem. 1970, 18:9-20.

477. Nam SY, Marcus C. Growth hormone and adipocyte function in obesity. Horm Res. 2000, 53 Suppl 1:87-97.

478. Nam SY, Lobie PE. The mechanism of effect of growth hormone on preadipocyte and adipocyte function. Obes Rev. 2000, 1(2):73-86.

479. Neupert W. Protein import into mitochondria. Annu Rev Biochem. 1997, 66:863-917.

480. Niall HD, Hogan ML, Sauer R, Rosenblum IY, Greenwood FC. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. Proc Natl Acad Sci U S A. 1971, 68(4):866-70.

481. Nichols BJ. A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. Nat Cell Biol. 2002, 4(5):374-8.

482. Nichols BJ, Kenworthy AK, Polishchuk RS, Lodge R, Roberts TH, Hirschberg K, Phair RD, Lippincott-Schwartz J. Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. J Cell Biol. 2001, 53(3):529-41.

483. Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J. Endocytosis without clathrin coats. Trends Cell Biol. 2001, 11(10):406-12.

484. Nielsen S, Moller N, Christiansen JS, Jorgensen JO. Pharmacological antilipolysis restores insulin sensitivity during growth hormone exposure. Diabetes. 2001, 50(10):2301-8.

485. Nieminen AL. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. Int Rev Cytol. 2003, 224:29-55.

486. Nikitovitch-Winer MB, Atkin J, Maley BE. Colocalization of prolactin and growth hormone within specific adenohypophyseal cells in male, female, and lactating female rats. Endocrinology. 1987, 121:625-630.

487. Nogueira V, Rigoulet M, Piquet MA, Devin A, Fontaine E, Leverve XM. Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. J Biol Chem. 2001, 276(49):46104-10.

488. Nomura R, Fujimoto T. Tyrosine-phosphorylated caveolin-1: immunolocalization and molecular characterization. Mol Biol Cell. 1999, 10(4):975-86.

489. Nonet ML, Holgado AM, Brewer F, Serpe CJ, Norbeck BA, Holleran J, Wei L, Hartwieg E, Jorgensen EM, Alfonso AU. NC-11, a Caenorhabditis elegans AP180 homologue, regulates the size and protein composition of synaptic vesicles. Mol Biol Cell. 1999, 10(7):2343-60.

490. Norrelund H, Nair KS, Jorgensen JO, Christiansen JS, Moller N. The protein-retaining effects of growth hormone during fasting involve inhibition of muscle-protein breakdown. Diabetes. 2001, 50(1):96-104.

491. Norrelund H, Nair KS, Nielsen S, Frystyk J, Ivarsen P, Jorgensen JO, Christiansen JS, Moller N. The decisive role of free fatty acids for protein conservation during fasting in humans with and without growth hormone. J Clin Endocrinol Metab. 2003, 88(9):4371-8.

O

492. Oberbauer AM, Stern JS, Johnson PR, Horwitz BA, German JB, Phinney SD, Beermann DH, Pomp D, Murray JD. Body composition of inactivated growth hormone (oMt1a-oGH) transgenic mice: generation of an obese phenotype. Growth Dev Aging. 1997, 61(3-4):169-79.

493. Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. J Cell Biol. 1998, 141(1):101-14.

494. Ohlendieck K, Riesinger I, Adams V, Krause J, Brdiczka D. Enrichment and biochemical characterization of boundary membrane contact sites from rat-liver mitochondria. Biochim Biophys Acta. 1986, 860(3):672-89.

495. Ohmori Y, Schreiber RD, Hamilton TA. Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. J Biol Chem. 1997, 272(23):14899-907.

496. Oka N, Yamamoto M, Schwencke C, Kawabe J, Ebina T, Ohno S, Couet J, Lisanti MP, Ishikawa Y. Caveolin interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. J Biol Chem. 1997, 272(52):33416-21.

497. Okada S, Kopchick JJ. Biological effects of growth hormone and its antagonist. Trends Mol Med. 2001, 7(3):126-32.

498. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. J Biol Chem. 1998, 273(10):5419-22.

499. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. Cell Signal. 2000, 12(1):1-13.

500. Orskov L, Schmitz O, Jorgensen JO, Arnfred J, Abildgaard N, Christiansen JS, Alberti KG, Orskov H. Influence of growth hormone on glucose-induced glucose uptake in normal men as assessed by the hyperglycemic clamp technique. J Clin Endocrinol Metab. 1989, 68(2):276-82.

501. O'Shea JJ, Notarangelo LD, Johnston JA, Candotti F. Advances in the understanding of cytokine signal transduction: the role of Jaks and STATs in immunoregulation and the pathogenesis of immunodeficiency. J Clin Immunol. 1997, 17(6):431-47.

502. Ostermeyer AG, Paci JM, Zeng Y, Lublin DM, Munro S, Brown DA. Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets. J Cell Biol. 2001, 152(5):1071-8.

503. Ouchi T, Lee SW, Ouchi M, Aaronson SA, Horvath CM. Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000, 97(10):5208-13.

P

504. Palade G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science. 1975, 189(4200):347-58.

505. Palade G. The fine structure of blood capillaries. J Appl Phys, 1953, 24 :1024.

506. Parat MO, Fox PL. Palmitoylation of caveolin-1 in endothelial cells is post-translational but irreversible. J Biol Chem. 2001, 276(19):15776-82.

507. Park HY, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE, Jang Y, Cho SY, Kim HS. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. Exp Mol Med. 2001, 33(2):95-102.

508. Parolini I, Sargiacomo M, Galbiati F, Rizzo G, Grignani F, Engelman JA, Okamoto T, Ikezu T, Scherer PE, Mora R, Rodriguez-Boulan E, Peschle C, Lisanti MP. Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. J Biol Chem. 1999, 274(36):25718-25.

509. Parpal S, Karlsson M, Thorn H, Stralfors P. Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. J Biol Chem. 2001, 276(13):9670-8.

510. Parton RG. Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. J Histochem Cytochem. 1994, 42(2):155-66.

511. Parton RG. Caveolae and caveolins. Curr Opin Cell Biol. 1996, 8(4):542-8.

512. Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E. Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. J Cell Biol. 1997, 136(1):137-54.

513. Patthy L. Homology of a domain of the growth hormone/prolactin receptor family with type III modules of fibronectin. Cell. 1990, 61(1):13-4.

514. Paukku K, Valgeirsdottir S, Saharinen P, Bergman M, Heldin CH, Silvennoinen O. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced activation of signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 is mediated by PDGF beta-receptor and is not dependent on c-src, fyn, jak1 or jak2 kinases. Biochem J. 2000, 345 Pt 3:759-66.

515. Pawson T. Protein modules and signalling networks. Nature. 1995, 373(6515):573-80.

516. Pearse BM. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A. 1976, 73(4):1255-9.

517. Pearse BM. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. J Mol Biol. 1975, 97(1):93-8.

518. Pedersen SB, Kristensen K, Fisker S, Jorgensen JO, Christiansen JS, Richelsen B. Regulation of uncoupling protein-2 and -3 by growth hormone in skeletal muscle and adipose tissue in growth hormone-deficient adults. J Clin Endocrinol Metab. 1999, 84(11):4073-8.

519. Pelkmans L, Helenius A. Endocytosis via caveolae. Traffic. 2002, 3(5):311-20.

520. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. Nat Cell Biol. 2001, 3(5):473-83.

521. Pelkmans L, Puntener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. Science. 2002, 296(5567):535-9.

522. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science. 1995, 269(5223):540-3.

523. Perkins GA, Frey TG. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. Micron. 2000, 31(1):97-111.

524. Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. J Struct Biol. 1997, 119(3):260-72.

525. Peters KR, Carley WW, Palade GE. Endothelial plasmalemmal vesicles have a characteristic striped bipolar surface structure. J Cell Biol. 1985, 101(6):2233-8.

526. Peyreigne C, Raynaud E, Fedou C, Prefaut C, Brun JF, Mercier J. Does growth hormone treatment alter skeletal muscle mitochondrial respiration in rats? Horm Res. 2002, 58(6):287-91.

527. Pfanner N, Wiedemann N. Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases. Curr Opin Cell Biol. 2002, 14(4):400-11.

528. Pfeffer LM, Mullersman JE, Pfeffer SR, Murti A, Shi W, Yang CH. STAT3 as an adapter to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNAR1 chain of the type I interferon receptor. Science. 1997, 276(5317):1418-20.

529. Phornphutkul C, Frick GP, Goodman HM, Berry SA, Gruppuso PA. Hepatic growth hormone signaling in the late gestation fetal rat. Endocrinology. 2000, 141(10):3527-33.

530. Piazza F, Valens J, Lagasse E, Schindler C. Myeloid differentiation of FdCP1 cells is dependent on Stat5 processing. Blood. 2000, 96(4):1358-65.

531. Plemper RK, Wolf DH. Retrograde protein translocation: Eradication of secretory proteins in health and disease. Trends Biochem Sci. 1999, 24(7):266-70.

532. Pol, A., Calvo, M. and Enrich, C. Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. FEBS Lett. 1998, 441: 34-38.

533. Pol A, Luetterforst R, Lindsay M, Heino S, Ikonen E, Parton RG. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. J Cell Biol. 2001, 152(5):1057-70.

534. Postel-Vinay MC, Kayser C, Desbuquois B. Fate of injected human growth hormone in the female rat liver in vivo. Endocrinology. 1982, 111(1):244-51.

535. Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillett N, Stewart TA. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. Genes Dev. 1993, 7(12B):2609-17.

536. Press M. Growth hormone and metabolism. Diabetes Metab Rev. 1988, 4(4):391-414.

537. Pugh BF. Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. Gene. 2000, 255(1):1-14.

538. Puri V, Watanabe R, Singh RD, Dominguez M, Brown JC, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. J Cell Biol. 2001, 154(3):535-47.

Q

539. Qualmann B, Kessels MM, Kelly RB. Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. J Cell Biol. 2000, 150(5):F111-6.

R

540. Raccurt M, Lobie PE, Moudilou E, Garcia-Caballero T, Frappart L, Morel G, Mertani HC. High stromal and epithelial human gh gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland. J Endocrinol. 2002, 175(2):307-18.

541. Ram PA, Waxman DJ. Interaction of growth hormone-activated STATs with SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1 and nuclear JAK2 tyrosine kinase. J Biol Chem. 1997, 272(28):17694-702.

542. Ram PA, Waxman DJ. SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms. J Biol Chem. 1999, 274(50):35553-61.

543. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet. 1963, 13(1):785-9.

544. Rand-Weaver M, Pottinger TG, Sumpter JP. Plasma somatolactin concentrations in salmonid fish are elevated by stress. J Endocrinol. 1993 138:509-15.

545. Rapaport D. Finding the right organelle. EMBO Rep. 2003, 4(10):948-52.

546. Rapaport D, Taylor RD, Kaser M, Langer T, Neupert W, Nargang FE. Structural requirements of Tom40 for assembly into preexisting TOM complexes of mitochondria. Mol Biol Cell. 2001, 12(5):1189-98.

547. Rasmussen MH, Hvidberg A, Juul A, Main KM, Gotfredsen A, Skakkebaek NE, Hilsted J, Skakkebae NE. Massive weight loss restores 24-hour growth hormone release profiles and serum insulin-like growth factor-I levels in obese subjects. J Clin Endocrinol Metab. 1995, 80(4):1407-15.

548. Rassow J, Guiard B, Wienhues U, Herzog V, Hartl FU, Neupert W. Translocation arrest by reversible folding of a precursor protein imported into mitochondria. A means to quantitate translocation contact sites. J Cell Biol. 1989, 109(4 Pt 1):1421-8.

549. Rassow J, Pfanner N. The protein import machinery of the mitochondrial membranes. Traffic. 2000, 1(6):457-64.

550. Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di Vizio D, Hou H Jr, Kneitz B, Lagaud G, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. J Biol Chem. 2001b, 276(41):38121-38.

551. Razani B, Lisanti MP. Caveolins and caveolae: molecular and functional relationships. Exp Cell Res. 2001b, 271(1):36-44.

552. Razani B, Zhang XL, Bitzer M, von Gersdorff G, Bottinger EP, Lisanti MP. Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. J Biol Chem. 2001a, 276(9):6727-38.

553. Recher S, Raccurt M, Lambert A, Lobie PE, Mertani HC, Morel G. Prenatal and adult growth hormone gene expression in rat lymphoid organs. J Histochem Cytochem. 2001, 49:347-54.

554. Reichert AS, Neupert W. Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. Biochim Biophys Acta. 2002, 1592(1):41-9.

555. Reichlin S. Somatostatin. N Engl J Med. 1983, 309:1495-501.

556. Reisine T, Bell GI. Molecular biology of somatostatin receptors. Endocr Rev. 1995 16:427-42.

557. Rezvani I, Maddaiah VT, Collipp PJ, Thomas J, Chen SY.Kinetics of uptake and subcellular distribution of human growth hormone in liver slices. Biochem Med. 1973, 7(3):432-40.

558. Richelsen B. Action of growth hormone in adipose tissue. Horm Res. 1997, 48 Suppl 5:105-10.

559. Richelsen B. Effect of growth hormone on adipose tissue and skeletal muscle lipoprotein lipase activity in humans. J Endocrinol Invest. 1999, 22(5 Suppl):10-5.

560. Richelsen B, Pedersen SB, Kristensen K, Borglum JD, Norrelund H, Christiansen JS, Jorgensen JO. Regulation of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and gene expression in adipose and muscle tissue by growth hormone treatment during weight loss in obese patients. Metabolism. 2000, 49(7):906-11.

561. Ridderstrale M, Degerman E, Tornqvist H. 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. 1995, 270(8):3471-4.

562. Ridderstrale M, Tornqvist H. PI-3-kinase inhibitor Wortmannin blocks the insulin-like effects of growth hormone in isolated rat adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 1994, 203(1):306-10.

563. Ringerike T, Blystad FD, Levy FO, Madshus IH, Stang E. Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae. J Cell Sci. 2002, 115(Pt 6):1331-40.

564. Ringstad N, Gad H, Low P, Di Paolo G, Brodin L, Shupliakov O, De Camilli P. Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. Neuron. 1999, 24(1):143-54.

565. Rizza RA, Mandarino LJ, Gerich JE. Effects of growth hormone on insulin action in man. Mechanisms of insulin resistance, impaired suppression of glucose production, and impaired stimulation of glucose utilization. Diabetes. 1982, 31(8 Pt 1):663-9.

566. Roberts CT Jr, Lasky SR, Lowe WL Jr, Seaman WT, Le Roith D. Molecular cloning of rat insulin-like growth factor I complementary deoxyribonucleic acids: differential messenger ribonucleic acid processing and regulation by growth hormone in extrahepatic tissues. Mol Endocrinol. 1987, 1(3):243-8.

567. Robinson KM, Lemire BD. Covalent attachment of FAD to the yeast succinate dehydrogenase flavoprotein requires import into mitochondria, presequence removal, and folding. J Biol Chem. 1996, 271(8):4055-60.

568. Rodriguez-Fernandez JL. Why do so many stimuli induce tyrosine phosphorylation of FAK? Bioessays. 1999, 21(12):1069-75.

569. Roepstorff K, Thomsen P, Sandvig K, van Deurs B. Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. J Biol Chem. 2002, 277(21):18954-60.

570. Roise D, Schatz G. Mitochondrial presequences. J Biol Chem. 1988, 263(10):4509-11.

571. Ron D, Kazanietz MG. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. FASEB J. 1999, 13(13):1658-76.

572. Rosicka M, Krsek M, Jarkovska Z, Marek J, Schreiber V. Ghrelin -- a new endogenous growth hormone secretagogue. Physiol Res. 2002, 51(5):435-41.

573. Rosenthal MJ, Woodside WF. Nocturnal regulation of free fatty acids in healthy young and elderly men. Metabolism. 1988, 37(7):645-8.

574. Ross RJ, Esposito N, Shen XY, Von Laue S, Chew SL, Dobson PR, Postel-Vinay MC, Finidori J. A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. Mol Endocrinol. 1997, 11(3):265-73.

575. Ross RJ, Leung KC, Maamra M, Bennett W, Doyle N, Waters MJ, Ho KK. Binding and functional studies with the growth hormone receptor antagonist, B2036-PEG (pegvisomant), reveal effects of pegylation and evidence that it binds to a receptor dimer. J Clin Endocrinol Metab. 2001, 86(4):1716-23.

576. Roth TF, Porter KR. Yolk protein uptake in oocyte of the mosquito Aedes aegypti. J Cell Biol. 1964, 20:313-330.

577. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell. 1992, 68(4):673-82.

578. Rowlinson SW, Behncken SN, Rowland JE, Clarkson RW, Strasburger CJ, Wu Z, Baumbach W, Waters MJ. 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 receptor signaling. J Biol Chem. 1998, 273(9):5307-14.

579. Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG. Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. Nat Cell Biol. 1999, 1(2):98-105.

580. Rudman D, Kutner MH, Rogers CM, Lubin MF, Fleming GA, Bain RP. Impaired growth hormone secretion in the adult population: relation to age and adiposity. J Clin Invest. 1981, 67:1361-9.

581. Rui L, Archer SF, Argetsinger LS, Carter-Su C. Platelet-derived growth factor and lysophosphatidic acid inhibit growth hormone binding and signaling via a protein kinase C-dependent pathway. J Biol Chem. 2000, 275(4):2885-92.

582. Rui L, Carter-Su C. Identification of SH2-Bbeta as a potent cytoplasmic activator of the tyrosine kinase Janus kinase 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999, 96(13):7172-7.

583. Rui L, Mathews LS, Hotta K, Gustafson TA, Carter-Su C. Identification of SH2-Bbeta as a substrate of the tyrosine kinase JAK2 involved in growth hormone signaling. Mol Cell Biol. 1997, 17(11):6633-44.

584. Rusinol AE, Cui Z, Chen MH, Vance JE. A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. J Biol Chem. 1994,269(44):27494-502.

585. Ryan KR, Leung RS, Jensen RE. Characterization of the mitochondrial inner membrane translocase complex: the Tim23p hydrophobic domain interacts with Tim17p but not with other Tim23p molecules. Mol Cell Biol. 1998, 18(1):178-87.

S

586. Sachse M, Urbe S, Oorschot V, Strous GJ, Klumperman J. Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. Mol Biol Cell. 2002, 13(4):1313-28.

587. Sachse M, van Kerkhof P, Strous GJ, Klumperman J. 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. 2001, 114(Pt 21):3943-52.

588. Sadir R, Lambert A, Lortat-Jacob H, Morel G. Caveolae and clathrin-coated vesicles: two possible internalization pathways for IFN-gamma and IFN-gamma receptor. Cytokine. 2001, 14(1):19-26.

589. Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. Mol Cell Biol. 2000, 20(10):3387-95.

590. Sakaue H, Ogawa W, Takata M, Kuroda S, Kotani K, Matsumoto M, Sakaue M, Nishio S, Ueno H, Kasuga M. Phosphoinositide 3-kinase is required for insulin-induced but not for growth

hormone- or hyperosmolarity-induced glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Mol Endocrinol. 1997, 11(10):1552-62.

591. Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, Kay L, Sikk P, Tiivel T, Tranqui L, Olivares J, Winkler K, Wiedemann F, Kunz WS. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. Mol Cell Biochem 1998, 184: 81-100.

592. Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. Nature. 1995, 377(6549):527-9.

593. Sandvig K, van Deurs B. Membrane traffic exploited by protein toxins. Annu Rev Cell Dev Biol. 2002, 18:1-24.

594. Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995, 92(20):9407-11.

595. Sargiacomo M, Sudol M, Tang Z, Lisanti MP. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. J Cell Biol. 1993, 122(4):789-807.

596. Sasse J, Hemmann U, Schwartz C, Schniertshauer U, Heesel B, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Heinrich PC, Horn F. Mutational analysis of acute-phase response factor/Stat3 activation and dimerization. Mol Cell Biol. 1997, 17(8):4677-86.

597. Sayer RJ. Intracellular Ca2+ handling. Adv Exp Med Biol. 2002, 513:183-96.

598. Scacchi M, Pincelli AI, Cavagnini F. Growth hormone in obesity. Int J Obes Relat Metab Disord. 1999, 23(3):260-71.

599. Schaefer TS, Sanders LK, Park OK, Nathans D. Functional differences between Stat3alpha and Stat3beta. Mol Cell Biol. 1997, 17(9):5307-16.

600. Scheffler IE. Mitochondria make a come back. Adv Drug Deliv Rev. 2001, 49(1-2):3-26.

601. Scheiffele P, Verkade P, Fra AM, Virta H, Simons K, Ikonen E. Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. J Cell Biol. 1998, 140(4):795-806.

602. Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, Lisanti MP. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. J Biol Chem. 1997, 272(46):29337-46.

603. Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996, 93(1):131-5.

604. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. Prog Biophys Mol Biol. 1999, 71(3-4):435-78.

605. Schlaepfer DD, Hunter T. Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. J Biol Chem. 1997, 272(20):13189-95.

606. Schlegel A, Schwab RB, Scherer PE, Lisanti MP. A role for the caveolin scaffolding domain in mediating the membrane attachment of caveolin-1. The caveolin scaffolding domain is both necessary and sufficient for membrane binding in vitro. J Biol Chem. 1999, 274(32):22660-7.

607. Schleyer M, Neupert W. Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. Cell. 1985, 43(1):339-50.

608. Schmid SL, McNiven MA, De Camilli P. Dynamin and its partners: a progress report. Curr Opin Cell Biol. 1998, 10(4):504-12.

609. Schmidt A, Wolde M, Thiele C, Fest W, Kratzin H, Podtelejnikov AV, Witke W, Huttner WB, Soling HD. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. Nature. 1999, 401(6749):133-41.

610. Schneider HC, Westermann B, Neupert W, Brunner M. The nucleotide exchange factor MGE exerts a key function in the ATP-dependent cycle of mt-Hsp70-Tim44 interaction driving mitochondrial protein import. EMBO J. 1996, 15(21):5796-803.

611. Schnitzer JE, Liu J, Oh P. Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. J Biol Chem. 1995, 270(24):14399-404.

612. Schwartz AL, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. Annu Rev Med. 1999, 50:57-74.

613. Schwartz J, Carter-Su C. Effects of growth hormone on glucose metabolism and glucose transport in 3T3-F442A cells: dependence on cell differentiation. Endocrinology. 1988, 122(5):2247-56.

614. Scow R. Effect of growth hormone and thyroxine on growth and chemical composition of muscle, bone and other tissues in thyroidectomized-hypophysectomized rats. Am J Physiol. 1959, 196(4):859-65.

615. Segard HB, Moulin S, Boumard S, Augier de Cremiers C, Kelly PA, Finidori J. Autocrine growth hormone production prevents apoptosis and inhibits differentiation in C2C12 myoblasts. Cell Signal. 2003, 15(6):615-23.

616. Seeburg PH, Shine J, Martial JA, Baxter JD, Goodman HM. Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. Nature. 1977, 270(5637):486-94.

617. Seeburg PH. The human growth hormone gene family: nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. DNA. 1982, 1(3):239-49.

618. Seuntjens E, Hauspie A, Roudbaraki M, Vankelecom H, Denef C. Combined expression of different hormone genes in single cells of normal rat and mouse pituitary. Arch Phys Biochem. 2002a, 110:12-15.

619. Seunjens E, Hauspie A, Vankelecom H, Denef C. Ontogeny of plurihormonal cells in the anterior pituitary of the mouse, as studied by means of hormone mRNA detection in single cells. J Neuroendo. 2002b, 14:611-619.

620. Sever S, Damke H, Schmid SL. Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. Traffic. 2000, 1(5):385-92.

621. Sever S, Muhlberg AB, Schmid SL. Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. Nature. 1999, 398(6727):481-6.

622. Shadid S, Jensen MD. Effects of growth hormone administration in human obesity. Obes Res. 2003, 11(2):170-5.

623. Shaneyfelt T, Husein R, Bubley G, Mantzoros CS. Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis. J Clin Oncol. 2000, 18(4):847-53.

624. Shaul PW, Anderson RG. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. Am J Physiol. 1998, 275(5 Pt 1):L843-51.

625. Shuai K. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. Oncogene. 2000, 19(21):2638-44.

626. Shuai K. The STAT family of proteins in cytokine signaling. Prog Biophys Mol Biol. 1999, 71(3-4):405-22.

627. Silva CM, Day RN, Weber MJ, Thorner MO. Human growth hormone (GH) receptor is characterized as the 134-kilodalton tyrosine-phosphorylated protein activated by GH treatment in IM-9 cells. Endocrinology. 1993, 133(5):2307-12.

628. Simbeni R, Pon L, Zinser E, Paltauf F, Daum G. Mitochondrial membrane contact sites of yeast. Characterization of lipid components and possible involvement in intramitochondrial translocation of phospholipids. J Biol Chem. 1991, 266(16):10047-9.

629. Simionescu N, Lupu F, Simionescu M.Rings of membrane sterols surround the openings of vesicles and fenestrae, in capillary endothelium. J Cell Biol. 1983, 97(5 Pt 1):1592-600.

630. Simon AR, Vikis HG, Stewart S, Fanburg BL, Cochran BH, Guan KL. Regulation of STAT3 by direct binding to the Rac1 GTPase. Science. 2000, 290(5489):144-7.

631. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. Nature. 1997, 387(6633):569-72.

632. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000, 1(1):31-9.

633. Simpson ME, Asling CW, Evans HM. Some endocrine influences on skeletal growth and differenciation. Yale J Biol Med. 1950, 23:1-27.

634. Sirotkin AV, Makarevich AV. GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of the cAMP/protein kinase A system. J Endocrinol. 1999, 163(2):317-27.

635. Sirrenberg C, Bauer MF, Guiard B, Neupert W, Brunner M. Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. Nature. 1996, 384(6609):582-5.

636. Sirrenberg C, Endres M, Folsch H, Stuart RA, Neupert W, Brunner M. Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. Nature. 1998, 391(6670):912-5.

637. Sjogren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, LeRoith D, Tornell J, Isaksson OG, Jansson JO, Ohlsson C. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999, 96(12):7088-92.

638. Skaggs SR, Crist DM. Exogenous human growth hormone reduces body fat in obese women. Horm Res. 1991, 35(1):19-24.

639. Slepnev VI, De Camilli P.Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. Nat Rev Neurosci. 2000, 1(3):161-72.

640. Smal J, Closset J, Hennen G, De Meyts P. Receptor binding properties and insulin-like effects of human growth hormone and its 20 kDa-variant in rat adipocytes. J Biol Chem. 1987, 262(23):11071-9.

641. Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. Mol Cell Biol. 1999, 19(11):7289-304.

642. Smart EJ, Ying Y, Donzell WC, Anderson RG. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. J Biol Chem. 1996, 271(46):29427-35.

643. Smart EJ, Ying YS, Anderson RG. Hormonal regulation of caveolae internalization. J Cell Biol. 1995, 131(4):929-38.

644. Smart EJ, Ying YS, Conrad PA, Anderson RG. Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. J Cell Biol. 1994, 127(5):1185-97.

645. Smit et al, 1999. Molecular events in growth hormone receptor interaction and signaling. Handbook of Physiology (vol V) (Kostyo JL ed.) pp445-480, Oxford University Press.

646. Smit LS, Meyer DJ, Billestrup N, Norstedt G, Schwartz J, Carter-Su C. 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. 1996, 10(5):519-33.

647. Smith WC, Kuniyoshi J, Talamantes F. Mouse serum growth hormone (GH) binding protein has GH receptor extracellular and substituted transmembrane domains. Mol Endocrinol. 1989, 3(6):984-90.

648. Smythe E. Clathrin-coated vesicle formation: a paradigm for coated-vesicle formation. Biochem Soc Trans. 2003, 31(Pt 3):736-9.

649. Snyder DK, Underwood LE, Clemmons DR. Anabolic effects of growth hormone in obese diet-restricted subjects are dose dependent. Am J Clin Nutr. 1990, 52(3):431-7.

650. Song KS, Li S, Okamoto T, Quilliam LA, Sargiacomo M, Lisanti MP. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. J Biol Chem. 1996, 271(16):9690-7.

651. Song KS, Tang Z, Li S, Lisanti MP.Mutational analysis of the properties of caveolin-1. A novel role for the C-terminal domain in mediating homo-typic caveolin-caveolin interactions. J Biol Chem. 1997, 272(7):4398-403.

652. Sonksen PH, Salomon F, Cuneo R. Metabolic effects of hypopituitarism and acromegaly. Horm Res. 1991, 36 Suppl 1:27-31.

653. Sotiropoulos A, Moutoussamy S, Binart N, Kelly PA, Finidori J. The membrane proximal region of the cytoplasmic domain of the growth hormone receptor is involved in the activation of Stat 3. FEBS Lett. 1995, 369(2-3):169-72.

654. Sotiropoulos A, Perrot-Applanat M, Dinerstein H, Pallier A, Postel-Vinay MC, Finidori J, Kelly PA. Distinct cytoplasmic regions of the growth hormone receptor are required for activation of JAK2, mitogen-activated protein kinase, and transcription. Endocrinology. 1994, 135(4):1292-8.

655. Souza SC, Frick GP, Yip R, Lobo RB, Tai LR, Goodman HM. Growth hormone stimulates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. J Biol Chem. 1994, 269(48):30085-8.

656. Sowa G, Pypaert M, Sessa WC. Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001, 98(24):14072-7.

657. Spencer SA, Hammonds RG, Henzel WJ, Rodriguez H, Waters MJ, Wood WI. Rabbit liver growth hormone receptor and serum binding protein. Purification, characterization, and sequence. J Biol Chem. 1988, 263(16):7862-7.

658. Spencer SA, Leung DW, Godowski PJ, Hammonds RG, Waters MJ, Wood WI. Growth hormone receptor and binding protein. Recent Prog Horm Res. 1990, 46:165-81.

659. Stahlhut M, van Deurs B. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. Mol Biol Cell. 2000, 11(1):325-37.

660. Stan RV, Ghitescu L, Jacobson BS, Palade GE. Isolation, cloning, and localization of rat PV-1, a novel endothelial caveolar protein. J Cell Biol. 1999, 145(6):1189-98.

661. Stan RV, Roberts WG, Predescu D, Ihida K, Saucan L, Ghitescu L, Palade GE. Immunoisolation and partial characterization of endothelial plasmalemmal vesicles (caveolae). Mol Biol Cell. 1997, 8(4):595-605.

662. Stang E, Johannessen LE, Knardal SL, Madshus IH. Polyubiquitination of the epidermal growth factor receptor occurs at the plasma membrane upon ligand-induced activation. J Biol Chem. 2000, 275(18):13940-7.

663. Stocklin E, Wissler M, Gouilleux F, Groner B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. Nature. 1996, 383(6602):726-8.

664. Stofega MR, Herrington J, Billestrup N, Carter-Su C. Mutation of the SHP-2 binding site in growth hormone (GH) receptor prolongs GH-promoted tyrosyl phosphorylation of GH receptor, JAK2, and STAT5B. Mol Endocrinol. 2000, 14(9):1338-50.

665. Stoorvogel W, Oorschot V, Geuze HJ. A novel class of clathrin-coated vesicles budding from endosomes. J Cell Biol. 1996, 132(1-2):21-33.

666. Stowell MH, Marks B, Wigge P, McMahon HT. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. Nat Cell Biol. 1999, 1(1):27-32.

667. Strous GJ, Gent J. Dimerization, ubiquitylation and endocytosis go together in growth hormone receptor function. FEBS Lett. 2002, 529(1):102-9.

668. Strous GJ, Govers R. The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. J Cell Sci. 1999, 112 (Pt 10):1417-23.

669. Strous GJ, van Kerkhof P. The ubiquitin-proteasome pathway and the regulation of growth hormone receptor availability. Mol Cell Endocrinol. 2002, 197(1-2):143-51.

670. Strous GJ, van Kerkhof P, Govers R, Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor. EMBO J. 1996, 15(15):3806-12.

671. Su YC, Han J, Xu S, Cobb M, Skolnik EY. NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain. EMBO J. 1997, 16(6):1279-90.

672. Subramaniam PS, Johnson HM. Lipid microdomains are required sites for the selective endocytosis and nuclear translocation of IFN-gamma, its receptor chain IFN-gamma receptor-1, and the phosphorylation and nuclear translocation of STAT1alpha. J Immunol. 2002, 169(4):1959-69.

673. Sun RJ, Muller S, Zhuang FY, Stoltz JF, Wang X. Caveolin-1 redistribution in human endothelial cells induced by laminar flow and cytokine. Biorheology. 2003, 40(1-3):31-9.

674. Sweeney G, Somwar R, Ramlal T, Volchuk A, Ueyama A, Klip A. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. J Biol Chem. 1999, 274(15):10071-8.

675. Sweitzer SM, Hinshaw JE. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. Cell. 1998, 93(6):1021-9.

T

676. Takahashi, S. Heterogeneity and development of somatotrophs and mammotrophs in the rat. Zool Sci. 1992, 9: 901-924.

677. Takahashi Y, Kaji H, Okimura Y, Goji K, Abe H, Chihara K. Brief report: short stature caused by a mutant growth hormone. N Engl J Med. 1996, 334(7):432-6.

678. Takei K, McPherson PS, Schmid SL, De Camilli P. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. Nature. 1995, 374(6518):186-90.

679. Takeshita T, Arita T, Higuchi M, Asao H, Endo K, Kuroda H, Tanaka N, Murata K, Ishii N, Sugamura K. STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction. Immunity. 1997, 6(4):449-57.

680. Tanaka S, Ouchi T, Hanafusa H. Downstream of Crk adaptor signaling pathway: activation of Jun kinase by v-Crk through the guanine nucleotide exchange protein C3G. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997, 94(6):2356-61.

681. Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. J Biol Chem. 1996, 271(4):2255-61.

682. Tanner JW, Leingang KA, Mueckler MM, Glenn KC. Cellular mechanism of the insulin-like effect of growth hormone in adipocytes. Rapid translocation of the HepG2-type and adipocyte/muscle glucose transporters. Biochem J. 1992, 282 (Pt 1):99-106.

683. Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. Nat Cell Biol. 2000, 2(1):42-9.

684. Thirone AC, Carvalho CR, Saad MJ. Growth hormone stimulates the tyrosine kinase activity of JAK2 and induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates and Shc in rat tissues. Endocrinology. 1999, 140(1):55-62.

685. Thomas MJ. The molecular basis of growth hormone action. Growth Horm IGF Res. 1998, 8(1):3-11.

686. Thompson BJ, Shang CA, Waters MJ. Identification of genes induced by growth hormone in rat liver using cDNA arrays. Endocrinology. 2000, 141(11):4321-4.

687. Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhut M, van Deurs B. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. Mol Biol Cell. 2002, 13(1):238-50.

688. Thomson M. Molecular and cellular mechanisms used in the acute phase of stimulated steroidogenesis. Horm Metab Res. 1998, 30(1):16-28.

689. Thomson M. Does cholesterol use the mitochondrial contact site as a conduit to the steroidogenic pathway? Bioessays. 2003, 25(3):252-8.

690. Thomson M, Korn M, Hall PF. GTP-binding proteins in adrenocortical mitochondria. Biochim Biophys Acta. 1995, 1248(2):159-69.

691. Tiruppathi C, Song W, Bergenfeldt M, Sass P, Malik AB. Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. J Biol Chem. 1997, 272(41):25968-75.

692. Toker A. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. Mol Pharmacol. 2000, 57(4):652-8.

693. Tollet P, Hamberg M, Gustafsson JA, Mode A. Growth hormone signaling leading to CYP2C12 gene expression in rat hepatocytes involves phospholipase A2. J Biol Chem. 1995 270(21):12569-77.

694. Tollet P, Legraverend C, Gustafsson JA, Mode A. A role for protein kinases in the growth hormone regulation of cytochrome P4502C12 and insulin-like growth factor-I messenger RNA expression in primary adult rat hepatocytes. Mol Endocrinol. 1991, 5(9):1351-8.

695. Tollet-Egnell P, Flores-Morales A, Stavreus-Evers A, Sahlin L, Norstedt G. Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. Endocrinology. 1999, 140(8):3693-704.

696. Travers MT, Barber MC, Tonner E, Quarrie L, Wilde CJ, Flint DJ. The role of prolactin and growth hormone in the regulation of casein gene expression and mammary cell survival: relationships to milk synthesis and secretion. Endocrinology. 1996, 137(5):1530-9.

697. Trigatti BL, Anderson RG, Gerber GE. Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. Biochem Biophys Res Commun. 1999, 255(1):34-9.

698. Trowbridge IS, Collawn JF, Hopkins CR. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. Annu Rev Cell Biol. 1993, 9:129-61.

699. Trumpower BL, Edwards CA. Purification of a reconstitutively active iron-sulfur protein (oxidation factor) from succinate . cytochrome c reductase complex of bovine heart mitochondria. J Biol Chem. 1979, 254(17):8697-706.

700. Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 A. Science. 1995, 269(5227):1069-74.

701. Tsushima T, Friesen HG. Radioreceptor assay for growth hormone. J Clin Endocrinol Metab. 1973, 37(2):334-7.

702. Tuggle CK, Trenkle A. Control of growth hormone synthesis. Domest Anim Endocrinol. 1996, 13:1-33.

U

703. Uittenbogaard A, Smart EJ. Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. J Biol Chem. 2000, 275(33):25595-9.

704. Uittenbogaard A, Ying Y, Smart EJ. Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. J Biol Chem. 1998, 273(11):6525-32.

705. Ungewickell E, Branton D. Assembly units of clathrin coats. Nature. 1981, 289(5796):420-2.

706. Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SE, Lindner R, Prasad K, Barouch W, Martin B, Greene LE, Eisenberg E. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. Nature. 1995, 378(6557):632-5.

707. Untergasser G, Kranewitter W, Schwarzler P, Madersbacher S, Dirnhofer S, Berger P. Organ-specific expression pattern of the human growth hormone/placental lactogen gene-cluster in the testis. Mol Cell Endocrinol. 1997, 130:53-60.

V

708. Vance JE. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. J Biol Chem. 1990, 265(13):7248-56.

709. van der Klei IJ, Veenhuis M, Neupert W. A morphological view on mitochondrial protein targeting. Microsc Res Tech. 1994, 27(4):284-93.

710. Vanderkuur JA, Butch ER, Waters SB, Pessin JE, Guan KL, Carter-Su C. Signaling molecules involved in coupling growth hormone receptor to mitogen-activated protein kinase activation. Endocrinology. 1997, 138(10):4301-7.

711. VanderKuur JA, Wang X, Zhang L, Allevato G, Billestrup N, Carter-Su C. Growth hormone-dependent phosphorylation of tyrosine 333 and/or 338 of the growth hormone receptor. J Biol Chem. 1995, 270(37):21738-44.

712. VanderKuur JA, Wang X, Zhang L, Campbell GS, Allevato G, Billestrup N, Norstedt G, Carter-Su C. Domains of the growth hormone receptor required for association and activation of JAK2 tyrosine kinase. J Biol Chem. 1994, 269(34):21709-17.

713. van Deurs B, Roepstorff K, Hommelgaard AM, Sandvig K. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. Trends Cell Biol. 2003, 13(2):92-100.

714. van Kerkhof P, Strous GJ. The ubiquitin-proteasome pathway regulates lysosomal degradation of the growth hormone receptor and its ligand. Biochem Soc Trans. 2001, 29(Pt 4):488-93.

715. van Kerkhof P, Alves dos Santos CM, Sachse M, Klumperman J, Bu G, Strous GJ. Proteasome inhibitors block a late step in lysosomal transport of selected membrane but not soluble proteins. Mol Biol Cell. 2001b, 12(8):2556-66.

716. van Kerkhof P, Govers R, Alves dos Santos CM, Strous GJ. Endocytosis and degradation of the growth hormone receptor are proteasome-dependent. J Biol Chem. 2000, 275(3):1575-80.

717. van Kerkhof P, Sachse M, Klumperman J, Strous GJ. Growth hormone receptor ubiquitination coincides with recruitment to clathrin-coated membrane domains. J Biol Chem. 2001a, 276(6):3778-84.

718. van Kerkhof P, Smeets M, Strous GJ. The ubiquitin-proteasome pathway regulates the availability of the GH receptor. Endocrinology. 2002, 143(4):1243-52.

719. van Loon AP, Schatz G. Transport of proteins to the mitochondrial intermembrane space: the 'sorting' domain of the cytochrome c1 presequence is a stop-transfer sequence specific for the mitochondrial inner membrane. EMBO J. 1987, 6(8):2441-8.

720. van Wilpe S, Ryan MT, Hill K, Maarse AC, Meisinger C, Brix J, Dekker PJ, Moczko M, Wagner R, Meijer M, Guiard B, Honlinger A, Pfanner N. Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. Nature. 1999, 401(6752):485-9.

721. Varshavsky A. The ubiquitin system. Trends Biochem Sci. 1997, 22(10):383-7.

722. Vignais ML, Gilman M. Distinct mechanisms of activation of Stat1 and Stat3 by platelet-derived growth factor receptor in a cell-free system. Mol Cell Biol. 1999, 19(5):3727-35.

723. Vikman K, Carlsson B, Billig H, Eden S. Expression and regulation of growth hormone (GH) receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) in rat adipose tissue, adipocytes, and adipocyte precursor cells: GH regulation of GH receptor mRNA. Endocrinology. 1991, 129(3):1155-61.

724. Vincent V, Goffin V, Rozakis-Adcock M, Mornon JP, Kelly PA. Identification of cytoplasmic motifs required for short prolactin receptor internalization. J Biol Chem. 1997, 272(11):7062-8.

725. Visconti R, Gadina M, Chiariello M, Chen EH, Stancato LF, Gutkind JS, O'Shea JJ. Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity. Blood. 2000, 96(5):1844-52.

726. Vleurick L, Pezet A, Kuhn ER, Decuypere E, Edery M. A beta-turn endocytic code is required for optimal internalization of the growth hormone receptor but not for alpha-adaptin association. Mol Endocrinol. 1999, 13(11):1823-31.

727. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. Annu Rev Biochem. 1999, 68:1015-68.

728. von Heijne G. Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. EMBO J. 1986, 5(6):1335-42.

729. Voos W, Martin H, Krimmer T, Pfanner N. Mechanisms of protein translocation into mitochondria. Biochim Biophys Acta. 1999, 1422(3):235-54.

W

730. Wabitsch M, Hauner H, Heinze E, Teller WM. The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation. Metabolism. 1995, 44(10 Suppl 4):45-9.

731. Walker JE. The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. Q Rev Biophys. 1992, 25(3):253-324.

732. Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? Science. 1992, 256(5057):628-32.

733. Wang D, Moriggl R, Stravopodis D, Carpino N, Marine JC, Teglund S, Feng J, Ihle JN. A small amphipathic alpha-helical region is required for transcriptional activities and proteasome-dependent turnover of the tyrosine-phosphorylated Stat5. EMBO J. 2000, 19(3):392-9.

734. Wang J, Zhou J, Bondy CA. Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. FASEB J. 1999a, 13(14):1985-90.

735. Wang K, Zhen Y, Sadoski R, Grinnell S, Geren L, Ferguson-Miller S, Durham B, Millett F. Definition of the interaction domain for cytochrome c on cytochrome c oxidase. Ii. Rapid kinetic analysis of electron transfer from cytochrome c to Rhodobacter sphaeroides cytochrome oxidase surface mutants. J Biol Chem. 1999b, 274(53):38042-50.

736. Wang X, Xu B, Souza SC, Kopchick JJ. Growth hormone (GH) induces tyrosine-phosphorylated proteins in mouse L cells that express recombinant GH receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994, 91(4):1391-5.

737. Waters MJ, Friesen HG. Purification and partial characterization of a nonprimate growth hormone receptor. J Biol Chem. 1979, 254(14):6815-25.

738. Waxman DJ, Ram PA, Park SH, Choi HK. Intermittent plasma growth hormone triggers tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of a liver-expressed, Stat 5-related DNA binding protein. Proposed role as an intracellular regulator of male-specific liver gene transcription. J Biol Chem. 1995, 270(22):13262-70.

739. Waxman DJ. Growth hormone pulse-activated STAT5 signalling: a unique regulatory mechanism governing sexual dimorphism of liver gene expression. Novartis Found Symp. 2000, 227:61-74; discussion 75-81.

740. Way M, Parton RG. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. FEBS Lett. 1996, 378(1):108-12.

741. Weigent DA, Baxter JB, Wear WE, Smith LR, Bost KL, Blalock JE. Production of immunoreactive growth hormone by mononuclear leukocytes. FASEB J. 1988, 2:2812-8.

742. Weiss C, Oppliger W, Vergeres G, Demel R, Jeno P, Horst M, de Kruijff B, Schatz G, Azem A. Domain structure and lipid interaction of recombinant yeast Tim44. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999, 96(16):8890-4.

743. Welbourne T, Joshi S, McVie R. Growth hormone effects on hepatic glutamate handling in vivo. Am J Physiol. 1989, 257(6 Pt 1):E959-62.

744. Wells JA, Cunningham BC, Fuh G, Lowman HB, Bass SH, Mulkerrin MG, Ultsch M, deVos AM. The molecular basis for growth hormone-receptor interactions. Recent Prog Horm Res. 1993, 48:253-75.

745. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. Cell. 1995, 82(2):241-50.

746. White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. Recent Prog Horm Res. 1998, 53:119-38.

747. Wilkinson KD. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. FASEB J. 1997, 11(14):1245-56.

748. Wilks AF, Harpur AG. Cytokine signal transduction and the JAK family of protein tyrosine kinases. Bioessays. 1994, 16(5):313-20.

749. Wimley WC, White SH. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. Nat Struct Biol. 1996, 3(10):842-8.

750. Winkler FK, Stanley KK. Clathrin heavy chain, light chain interactions. EMBO J. 1983, 2(8):1393-400.

751. Winston LA, Hunter T. JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone. J Biol Chem. 1995, 270(52):30837-40.

752. Witt H, Malatesta F, Nicoletti F, Brunori M, Ludwig B. Cytochrome-c-binding site on cytochrome oxidase in Paracoccus denitrificans. Eur J Biochem. 1998a, 251(1-2):367-73.

753. Witt H, Malatesta F, Nicoletti F, Brunori M, Ludwig B. Tryptophan 121 of subunit II is the electron entry site to cytochrome-c oxidase in Paracoccus denitrificans. Involvement of a hydrophobic patch in the docking reaction. J Biol Chem. 1998b, 273(9):5132-6.

754. Wolthers T, Grofte T, Jorgensen JO, Vilstrup H. Growth hormone prevents prednisolone-induced increase in functional hepatic nitrogen clearance in normal man. J Hepatol. 1997, 27(5):789-95.

755. Wolthers T, Groftne T, Moller N, Christiansen JS, Orskov H, Weeke J, Jorgensen JO. Calorigenic effects of growth hormone: the role of thyroid hormones. J Clin Endocrinol Metab. 1996, 81(4):1416-9.

756. Wong ED, Wagner JA, Gorsich SW, McCaffery JM, Shaw JM, Nunnari J. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. J Cell Biol. 2000, 151(2):341-52.

757. Wood TJ, Sliva D, Lobie PE, Pircher TJ, Gouilleux F, Wakao H, Gustafsson JA, Groner B, Norstedt G, Haldosen LA. Mediation of growth hormone-dependent transcriptional activation by mammary gland factor/Stat 5. J Biol Chem. 1995, 270(16):9448-53.

758. Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G. Thyroid hormone action in mitochondria. J Mol Endocrinol. 2001, 26(1):67-77.

759. Wu H, Klingmuller U, Besmer P, Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. Nature. 1995, 377(6546):242-6.

760. Wyszomierski SL, Rosen JM. Cooperative effects of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) and C/EBPbeta (CCAAT/enhancer-binding protein-beta) on beta-casein gene transcription are mediated by the glucocorticoid receptor. Mol Endocrinol. 2001, 15(2):228-40.

X

761. Xiang Y, Rybin VO, Steinberg SF, Kobilka B. Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. J Biol Chem. 2002, 277(37):34280-6.

Y

762. Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999, 96(13):7324-9.

763. Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. J biophys biochem cytol. 1955, 1:445-458.

764. Yamada K, Lipson KE, Donner DB. Structure and proteolysis of the growth hormone receptor on rat hepatocytes. Biochemistry. 1987, 26(14):4438-43.

765. Yamamoto M, Toya Y, Schwencke C, Lisanti MP, Myers MG Jr, Ishikawa Y. Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. J Biol Chem. 1998, 273(41):26962-8.

766. Yamashita H, Xu J, Erwin RA, Farrar WL, Kirken RA, Rui H. Differential control of the phosphorylation state of proline-juxtaposed serine residues Ser725 of Stat5a and Ser730 of Stat5b in prolactin-sensitive cells. J Biol Chem. 1998, 273(46):30218-24.

767. Yamauchi T, Kaburagi Y, Ueki K, Tsuji Y, Stark GR, Kerr IM, Tsushima T, Akanuma Y, Komuro I, Tobe K, Yazaki Y, Kadowaki T. Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1, -2, and -3, their association with p85 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and concomitantly PI3-kinase activation via JAK2 kinase. J Biol Chem. 1998, 273(25):15719-26.

768. Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, Tamemoto H, Sekine N, Wada M, Honjo M, Takahashi M, Takahashi T, Hirai H, Tushima T, Akanuma Y, Fujita T, Komuro I, Yazaki Y, Kadowaki T. Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. Nature. 1997, 390(6655):91-6.

769. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN, Yoshimura A. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. EMBO J. 1999, 18(5):1309-20.

770. Ye B, Maret W, Vallee BL. Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001, 98(5):2317-22.

771. Yenush L, White MF. The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. Bioessays. 1997, 19(6):491-500.

772. Yip RG, Goodman HM. Growth hormone and dexamethasone stimulate lipolysis and activate adenylyl cyclase in rat adipocytes by selectively shifting Gi alpha2 to lower density membrane fractions. Endocrinology. 1999, 140(3):1219-27.

773. Yu CL, Burakoff SJ. Involvement of proteasomes in regulating Jak-STAT pathways upon interleukin-2 stimulation. J Biol Chem. 1997, 272(22):14017-20.

Z

774. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. J Exp Med. 1996, 183(4):1533-44.

775. Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schoner BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP, Schevitz RW. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. Nature. 1997, 387(6629):206-9.

776. Zhang X, Blenis J, Li HC, Schindler C, Chen-Kiang S. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. Science. 1995, 267(5206):1990-4.

777. 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. 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 U S A. 1999c, 96(5):2071-6.

778. Zhang Y, Guan R, Jiang J, Kopchick JJ, Black RA, Baumann G, Frank SJ. Growth hormone (GH)-induced dimerization inhibits phorbol ester-stimulated GH receptor proteolysis. J Biol Chem. 2001, 276(27):24565-73.

779. Zhang Y, Jiang J, Black RA, Baumann G, Frank SJ. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) is a growth hormone binding protein (GHBP) sheddase: the metalloprotease TACE/ADAM-17 is critical for (PMA-induced) GH receptor proteolysis and GHBP generation. Endocrinology. 2000, 141(12):4342-8.

780. Zhang Y, Jiang J, Kopchick JJ, Frank SJ. Disulfide linkage of growth hormone (GH) receptors (GHR) reflects GH-induced GHR dimerization. Association of JAK2 with the GHR is enhanced by receptor dimerization. J Biol Chem. 1999a, 274(46):33072-84.

781. Zhang B, Koh YH, Beckstead RB, Budnik V, Ganetzky B, Bellen HJ. Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. Neuron. 1998, 21(6):1465-75.

782. Zhang X, Wrzeszczynska MH, Horvath CM, Darnell JE Jr. Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. Mol Cell Biol. 1999b, 19(10):7138-46.

783. Zhang JJ, Zhao Y, Chait BT, Lathem WW, Ritzi M, Knippers R, Darnell JE Jr. Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1alpha in IFN-gamma-induced transcriptional activation. EMBO J. 1998, 17(23):6963-71.

784. Zhen Y, Hoganson CW, Babcock GT, Ferguson-Miller S. Definition of the interaction domain for cytochrome c on cytochrome c oxidase. I. Biochemical, spectral, and kinetic

characterization of surface mutants in subunit ii of Rhodobacter sphaeroides cytochrome aa(3). J Biol Chem. 1999, 274(53):38032-41.

785. Zhou Y, Xu BC, Maheshwari HG, He L, Reed M, Lozykowski M, Okada S, Cataldo L, Coschigamo K, Wagner TE, Baumann G, Kopchick JJ. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). Proc Natl Acad Sci U S A. 1997, 94(24):13215-20.

786. Zhu M, John S, Berg M, Leonard WJ. Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFNgamma-mediated signaling. Cell. 1999, 96(1):121-30.

787. Zhu T, Goh EL, Graichen R, Ling L, Lobie PE. Signal transduction via the growth hormone receptor. Cell Signal. 2001, 13(9):599-616.

788. Zhu T, Goh EL, Lobie PE. 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. 1998a, 273(17):10682-9.

789. Zhu T, Goh EL, LeRoith D, Lobie PE. 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. 1998b, 273(50):33864-75.

790. Zhu T, Lobie PE. 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. 2000, 275(3):2103-14.

791. Zierler KL, Rabinowitz D. Roles of insulins and growth hormones based on studies of forearm metabolism in man. Medicine (Baltimore). 1963, 42:385-402.

792. Zou L, Burmeister LA, Sperling MA. Isolation of a liver-specific promoter for human growth hormone receptor gene. Endocrinology. 1997, 138(4):1771-4.