

Conclusion

Le modèle dinde est un modèle original du fait de l'existence d'une hyperplasie post-natale, qui n'est pas décrite chez les mammifères ou d'autres oiseaux. Il présente de ce fait, un intérêt zootechnique certain.

Les variations de capacité de prolifération des cellules satellites, qui différencient très nettement les deux souches, en font également un modèle intéressant pour l'étude des mécanismes de la croissance musculaire. Ce modèle semble aussi tout à fait adapté à l'étude des relations nerf-muscle.

Références bibliographiques

Abourachid A., 1990. Etude morpho-fonctionnelle de l'appareil locomoteur de deux souches de dindons domestiques. Thèse de doctorat de l'Université de Rennes I.

Bakou S., Cherel Y., Gabineau B., Guigand L., Wyers M., 1995. Type specific changes in fiber size and satellite cell activation following denervation of two strains turkey muscles. *J. Anat.* (sous presse).

Cherel Y., Bakou S., Wyers M., 1995. Hypertrophy as a response to denervation of multi-innervated fibers in two strains of turkey. *Biology of the cell* (sous presse).

Cherel Y., Bakou S., Wyers M., 1995. Satellite cell activation and evolution following muscle denervation in two strains of turkey. *Biology of the cell* (sous presse).

Abourachid A., 1990. Etude morpho-fonctionnelle de l'appareil locomoteur de deux souches de dindons domestiques. Thèse de doctorat de l'Université de Rennes I.

Bakou S., Cherel Y., Gabineau B., Guigand L., Wyers M., 1995. Type specific changes in fiber size and satellite cell activation following denervation of two strains turkey muscles. *J. Anat.* (sous presse).

Cherel Y., Bakou S., Wyers M., 1995. Hypertrophy as a response to denervation of multi-innervated fibers in two strains of turkey. *Biology of the cell* (sous presse).

Cherel Y., Bakou S., Wyers M., 1995. Satellite cell activation and evolution following muscle denervation in two strains of turkey. *Biology of the cell* (sous presse).

H. JAMMES,
J. DJIANE
INRA Unité d'Endocrinologie moléculaire
78352 Jouy-en-Josas
Cedex

Le récepteur de la GH peut-il constituer un marqueur de la variabilité des capacités de croissance entre types génétiques ? Etude chez le bovin et le lapin

L'implication de l'hormone de croissance (GH) dans la croissance post-natale est clairement établie. Elle se caractérise, entre autres, par une mise en place des récepteurs de la GH (RGH) à la surface des cellules hépatiques, conférant ainsi une sensibilité accrue à la GH. Le clonage de l'ADNc du récepteur de la GH (Leung *et al* 1987) a permis de mettre en évidence une expression du gène du RGH ubiquitaire (cœur, rein, muscle, glande mammaire) et précoce (chez le fœtus ovin : O'Mahoney *et al* 1994 ; rat : Garcia-Aragon *et al* 1992) bien que la détection biochimique du récepteur par mesure de la liaison de la GH fut négative. De plus, des ostéoblastes ou des hépatocytes de fœtus présentent une réponse cellulaire à la GH *in vitro*. Ces résultats suggèrent donc une intervention directe de la GH via son récepteur sur le développement fœtal et néo-natal au niveau de types cellulaires impliqués dans la croissance, telles les cellules musculaires et les ostéoblastes.

Le travail présenté s'organise en trois parties : l'implication de l'axe somatotrope au

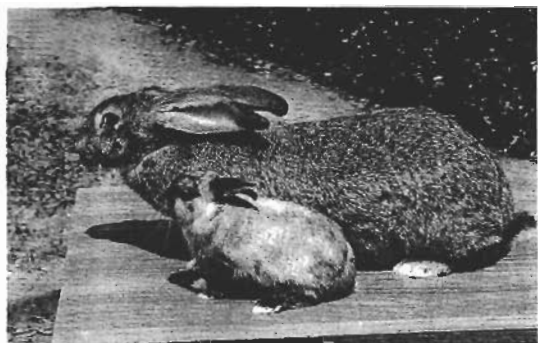
cours du développement post-natal dans le cas de phénotypes extrêmes (espèce cunicole), l'expression du gène du RGH dans le muscle au cours du développement fœtal bovin et la recherche de séquences régulatrices de l'expression du gène du RGH.

Implication de l'axe somatotrope dans les phénotypes « nain » et « géant » chez le lapin

(en collaboration avec J. Ouhayoun et F. Hulot, INRA Recherches Cunicoles, et B. Guillaume, INA P-G)

L'espèce cunicole se caractérise par une grande variabilité de taille et de poids au stade adulte. Les races Géant des Flandres et Nain de couleur représentent les extrêmes : 7 kg et 1 kg respectivement pour l'adulte (figure 1). La race Néo-Zélandaise blanche (NZ)

Figure 1. Lapins « Géant des Flandres » et « Nain de couleur ». (lapins mâles adultes).



est le prototype de la race moyenne (4 kg). Les phénotypes « nain » et « géant » peuvent rendre compte de multiples défauts de régulation de l'axe somatotrope : dérèglement hypophysaire, défaut de réceptivité hépatique ou des tissus périphériques, résistance à la GH et/ou aux somatomédines.

Les profils de GH sérique, déterminés pour ces trois races aux jours 1, 28 et 56 après la naissance ne peuvent rendre compte des phénotypes extrêmes étudiés.

En utilisant la GH bovine comme ligand radioiodé (^{125}I -bGH), une augmentation de la liaison spécifique est observée dans le foie au cours du développement post-natal. Cette augmentation est beaucoup plus marquée pour les lapins nains que pour les NZ (x6 et x4, respectivement), et inexistante pour les géants. L'analyse des courbes de compétition de liaison par régression non linéaire (programme multifit) démontre que ces variations de la liaison spécifique sont principalement la conséquence d'une augmentation du nombre de récepteurs. Au contraire, l'affinité des récepteurs pour l'hormone diminue entre 1 jour et 28 jours après la naissance. Dans le sérum, la protéine de liaison de la GH est détectée par mesure de la liaison de ^{125}I -bGH par HPLC. Les taux de protéine de liaison mesurés dans ces conditions sont corrélés à ceux des récepteurs membranaires. L'analyse de l'expression du gène du récepteur de la GH (RGH), réalisée par Northern blot en utilisant comme sonde un ADNc RGH de lapin, démontre la présence d'un transcrite majoritaire de 4,5 kb spécifique du RGH dans le foie pour les trois races de lapins et à chaque stade étudié. L'expression du gène du RGH augmente de manière significative au cours du développement postnatal chez les NZ et les nains, et non chez les géants. Une excellente corrélation existe entre le taux d'expression du gène du RGH et le taux de récepteurs membranaires.

L'analyse de l'expression du gène de l'IGF1, comme marqueur de la fonctionnalité du RGH dans le foie, a été réalisée par Northern blot en utilisant une sonde ADNc de l'IGF1 humain. Pour les trois races de lapins les taux d'ARNm d'IGF1 augmentent au cours du développement post-natal. Cependant, chez les lapins nains, ces taux restent significativement inférieurs à ceux des lapins NZ de réfé-

rence. Ce résultat est d'autant plus surprenant que les lapins nains possèdent un nombre élevé de RGH hépatiques.

En conclusion, chez le lapin en croissance, le taux de récepteurs hépatiques ainsi que celui de la protéine de liaison sérique sont une conséquence directe du niveau d'expression du gène du RGH. Ainsi, l'expression du gène du RGH au cours du développement est tout à fait dépendante de l'âge. Chez les lapins géants, nous observons une répression très marquée de la transcription du gène du RGH. Chez les lapins nains, la situation est inversée, la transcription du gène du RGH n'est pas soumise à cette régulation négative. Ces deux phénotypes extrêmes sont donc d'excellents modèles de régulation du gène du RGH.

Chez les lapins géants, l'axe somatotrope semble en état de veille et son implication dans le déterminisme de ce phénotype est difficile à définir. Chez les lapins nains, le RGH est présent, capable de lier l'hormone et de transduire le message hormonal puisqu'une synthèse d'IGF1 dépendante de la GH est observée. Toutefois, cette synthèse est réduite comparativement au lapin de référence (NZ) au vu des taux respectifs des récepteurs membranaires et pourrait provenir d'une efficacité médiocre dans la cascade de phosphorylations intracellulaires impliquées dans le mécanisme transductionnel. Cette dernière hypothèse est à explorer.

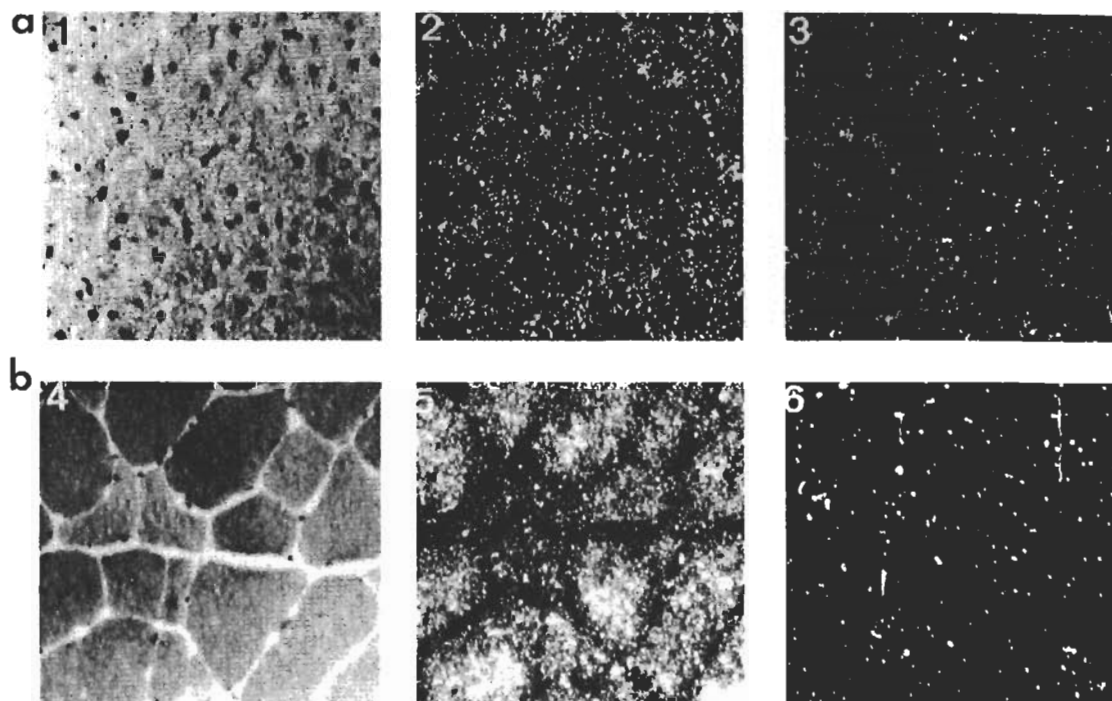
Les lapins de petit format atteignent plus rapidement l'état final de maturation musculaire, c'est-à-dire prédominance des fibres rapides et réduction des fibres lentes, que les lapins de grand format. L'implication de la GH dans ce processus est à démontrer. Dans ce cadre, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression du gène du RGH dans le muscle long dorsal au cours du développement post-natal avec des intensités différentes selon le type de lapins étudié. Cette expression est corrélée à celle du gène de l'IGF1. Toutefois, la liaison de l' ^{125}I -bGH sur des préparations de membranes musculaires reste difficilement détectable et cela malgré l'utilisation d'une technique de purification de fractions de membranes cytoplasmiques plus efficace (Mickelson et Louis 1985). Il reste à déterminer le rôle de la GH et de son récepteur dans la maturation musculaire en fonction du type de lapins et pour les trois stades étudiés.

Ontogénie de l'expression du RGH au cours de la gestation dans le muscle fœtal bovin (Charolais) normal et culard

(en collaboration avec A. Listrat, B. Picard et J. Robelin, INRA Croissance et Métabolismes des Herbivores)

L'ontogénie de l'expression du gène du RGH et sa localisation dans le muscle fœtal bovin

Figure 2. Localisation par hybridation *in situ* des ARNm spécifiques du récepteur de l'hormone de croissance dans le foie (série a) et dans le muscle adulte (série b). En 1 et 4 : coupes histologiques de foie et de muscle ; en 2 et 5 : mise en évidence des signaux spécifiques d'hybridation *in situ* en fond noir, en utilisant une sonde antisens ARN de RGH marquée au ^{35}S ; en 3 et 6 : contrôle de l'hybridation non spécifique en utilisant une sonde sens ARN de RGH marquée au ^{35}S . Agrandissement $\times 13$.



ont été réalisées par Northern blot et hybridation *in situ*, en utilisant une sonde ARN antisens issue du clonage du RGH bovin. La présence de l'ARNm RGH est détectée à tous les stades analysés. L'hybridation *in situ* démontre sa localisation à l'intérieur des fibres musculaires (figure 2). Au cours de la gestation, le taux d'ARNm augmente graduellement et double entre les 130^e et 210^e jours de gestation. De manière surprenante, l'expression du gène du RGH est plus précoce chez les fœtus culards que chez les normaux et d'une intensité plus forte. A l'opposé, la mise en place de l'actine musculaire semble plus précoce chez les fœtus normaux, suggérant un retard de différenciation des fibres musculaires chez les fœtus culards. Ceci serait en faveur d'une prolifération cellulaire plus importante, se poursuivant sur une période plus longue chez ces fœtus et qui pourrait être sous le contrôle de la GH. Des résultats concernant l'expression des différentes isoformes de myosines et l'expression du gène de l'IGF-II chez les fœtus culards renforcent cette hypothèse (cf. texte de Picard *et al* dans ce dossier).

Recherche de séquences régulatrices du gène RGH

(en collaboration avec P. Rubtsov, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscou)

L'utilisation de différents promoteurs pour la transcription d'un gène est un mécanisme

efficace dans la régulation de l'expression de celui-ci. Ceci, en association avec les mécanismes d'épissage alternatif, donne naissance à des ARNm se distinguant par leur séquences 5' non codantes. Le gène du RGH est certainement soumis à ce type de régulation. Par des expériences de protection à la RNase, il a été possible de démontrer l'existence d'au moins 5 séquences différentes chez l'homme (Leung *et al* 1987), 2 chez l'ovine (O'Mahoney *et al* 1994) et 2 chez le rat (Baumbach *et al* 1989). Une amplification enzymatique des séquences 5' non codantes (5'RACE system) permet une détermination exacte du nombre de séquences différentes, de leur composition nucléotidique et de leur représentation dans un tissu donné à un stade particulier. Ainsi P. Rubtsov et ses collaborateurs ont mis en évidence 8 variants en 5' non codant chez l'homme avec une représentativité allant de 47 % à 1 %. Un des variants conserve une partie d'un intron et chaque variant présente plusieurs codons ATG, rendant ainsi possible une régulation à un niveau traductionnel. Chez le rat, 2 variants ont été mis en évidence, dont l'un est spécifique de la femelle et certainement responsable de l'augmentation des ARNm du RGH au cours de la gestation. Chez l'ovine, Adams (1995) a décrit un variant spécifique d'un tissu, le foie.

Nous avons entrepris le même type d'études dans les modèles lapin et bovin définis précédemment, afin de tenter de répondre aux questions suivantes :

- Existe-t-il une spécificité tissulaire de l'expression du gène du RGH dans le foie, la glande mammaire et le muscle chez le lapin ?

- Les régulations de l'expression observées chez les lapins de différents formats ou chez les fœtus bovins normaux et culards sont-elles dues à la mise en œuvre de promoteurs spécifiques ?

- De la même façon, peut-on distinguer le stade fœtal du post-natal par une intervention de promoteurs différents ?

En conclusion, l'expression du gène du RGH peut constituer dans l'espèce bovine un marqueur de la variabilité des capacités de croissance entre types génétiques. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces phénotypes et, en particulier, le rôle de la GH dans la prolifération et la différenciation des cellules musculaires embryonnaires restent à élucider.

Références bibliographiques

Adams T.E., 1995. Differential expression of growth hormone receptor messenger RNA from a second promoter. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 108, 23-33.

Baumbach W.R., Horner D., Logan J.S., 1989. The growth hormone-binding protein in rat serum is an alternatively spliced form of the rat growth hormone receptor. *Genes and Dev.*, 3, 1199-1205.

Garcia-Aragon J., Lobie P.E., Muscat G.E.O., Gobius K.S., Norstedt G., Waters M.J., 1992. Prenatal expression of growth hormone (GH) receptor / binding protein in the rat : a role for GH in embryonic and fetal development. *Development*, 114, 869-876.

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. Growth hormone receptor and serum binding protein : purification, cloning and expression. *Nature*, 330, 537-543.

Mickelson J.R., Louis C.F., 1985. Components of purified sarcolemma from porcine skeletal muscle. *Acad. Press. Inc.*, 242, 112-126.

O'Mahoney J.V., Brandon M.R., Adams T.E., 1994. Identification of a liver-specific promoter for the ovine growth hormone receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 101, 129-139.