

Hormone de croissance 22K et 20K : corrélation entre liaison au récepteur et effet biologique direct sur adipocyte de rat

J. SMAL, J. CLOSSET, G. HENNEN, P. DE MEYTS (*)

*Endocrinologie expérimentale et clinique,
Université de Liège, C.H.U. B23, B-4000 Liège, Belgique.*
(*) *Hormone and Metabolic Research, I.C.P.,
Université de Louvain, B-1200 Bruxelles, Belgique.*

Summary. The 20K variant of native (22K) hGH is a full agonist for the growth promoting and lactogenic properties of the hormone *in vivo*, but has been reported to have reduced or no insulin-like properties. To explore whether these differences could be explained at the receptor level, we compared the binding of 22K and 20K hGH to receptors in isolated rat adipocytes, a target for the insulin-like effects of the hormone. We compared then the biological insulin-like effects of both hormones using a sensitive assay based on the stimulation of lipogenesis in isolated rat adipocytes. The 20K variant was only 3 % as potent as 22K hGH for binding and bioactivity, demonstrating that rat adipocyte receptors are different from those promoting the growth effect.

La forme majoritaire de l'hormone de croissance humaine (22K hGH) est un polypeptide de 191 acides aminés. Un variant naturel du 22K hGH, synthétisé à partir du même gène à la suite d'un épissage alternatif de son ARNm, a récemment été découvert. Ce variant, le 20K hGH, possède exactement la même séquence que le 22K hGH, à l'exception d'une délétion des acides aminés 32 à 46 (1). Malgré des structures très proches, les deux molécules ne présentent pas le même profil d'activités biologiques. Si le variant hGH 20K possède la même activité somatogénique et lactogénique que l'hormone de croissance, il a néanmoins perdu l'essentiel de son activité métabolique directe de type insulinique (2).

Après avoir purifié les deux formes 22K et 20K de l'hGH, nous avons examiné leurs caractéristiques de liaison à différents récepteurs de l'hormone de croissance pour voir si les différences dans les profils d'activité des deux molécules pouvaient s'expliquer au niveau de leur interaction avec leurs récepteurs. Nous avons ainsi pu montrer que le variant 20K se comporte comme un agoniste de haute affinité (50-100 %) du 22K hGH vis-à-vis des récepteurs à GH du foie de lapine gestante et du lymphocyte humain IM-9 (3) qui sont liés à l'activité lactogénique et somatogénique de l'hormone de croissance.

Nous avons ensuite comparé la liaison du 22K hGH et du 20K hGH aux récepteurs de l'adipocyte de rat, modèle généralement utilisé pour mesurer l'activité de type insulinique du 22K hGH *in vitro*. Les rats utilisés sont des Wistar mâles, de 120 à 150 g. Ils sont sacrifiés par dislocation cervicale et le tissu adipeux épидidymaire et rétro-péritonéal est directement prélevé et digéré à la collagénase (1 mg/ml) dans un milieu Krebs-Ringer-Hepes (KRH) 3,5 % BSA (P/P) à 37 °C pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite lavées à 5 reprises et leur concentration est ajustée à 20 % (V/V). Les expériences de liaison sont réalisées dans le même milieu KRH, avec 5 % BSA (P/P). La cinétique d'association du 22K hGH et du 20K hGH à leurs récepteurs est rapide : l'équilibre est atteint après 75 minutes à 37 °C. Le 22K hGH se lie à ses récepteurs avec une haute affinité

($K_a = 4.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) et l'analyse de Scatchard des données de liaison suggère l'existence d'une classe unique de récepteurs. Le 22K hGH et le 20K hGH sont capables d'inhiber totalement la liaison du traceur ^{125}I -22K hGH à ses récepteurs mais il faut des concentrations 30 fois plus élevées de 20K hGH que de 22K hGH non marqués pour obtenir le même déplacement : le 20K hGH se comporte donc comme un agoniste de faible affinité (3 %) du 22K hGH sur les récepteurs de l'adipocyte de rat, contrairement à ce que nous avons observé sur lymphocyte IM-9 et foie de lapine gestante (4).

Nous avons examiné en parallèle l'activité insulinique des deux molécules sur des adipocytes de rat isolés à la collagénase en utilisant un test de stimulation de la lipogénèse. Les conditions d'incubation sont identiques à celles utilisées pour les expériences de liaison, à l'exception de la concentration en adipocytes, qui est ramenée à 1 % (V/V). Les adipocytes sont préalablement incubés dans un milieu dépourvu d'hGH pour les carencer en GH endogène et abolir leur résistance à cette hormone. Ils sont ensuite soumis pendant 2 h à des doses croissantes d'hGH 22K ou d'hGH 20K et l'incorporation du glucose tritié dans les lipides est mesurée. La stimulation de la lipogénèse par le 22K hGH apparaît progressivement en fonction de la durée de la préincubation sans hormone. Après 4 h, la stimulation maximale de la lipogénèse de base est de 200 à 250 %. Les courbes dose-réponse obtenues pour les deux formes d'hGH sont parallèles et atteignent le même maximum mais il faut des doses 30 fois plus élevées de 20K hGH que de 22K hGH pour obtenir la même réponse biologique : l'activité relative du 20K hGH est de 2 à 6 % de celle du 22K hGH, en excellente corrélation avec les données de liaison (5).

En *conclusion*, les données de liaison obtenues sur les différents récepteurs de l'hormone de croissance que nous avons étudiés montrent que la différence entre les activités insulinique du 22K hGH et du 20K hGH n'est liée ni à l'existence de récepteurs distincts pour les deux hormones, ni à un phénomène post récepteur. Elle s'explique par l'affinité nettement plus faible du variant 20K hGH pour les récepteurs associés à l'activité insulinique de l'hormone de croissance. Cette constatation implique donc que les récepteurs de l'hormone de croissance sont différents en fonction de la spécialisation de la cellule-cible, expliquant les profils d'activité biologique différents du 22K hGH et du 20K hGH. En outre, l'adipocyte de rat se révèle être un modèle sensible pour étudier les relations structure-activité des effets métaboliques directs de l'hormone de croissance.

- (1) Lewis U. J., Singh R. N. P., Tutwiler G. F., Sigel M. B., Vanderlaan W. P., 1980. *Rec. prog. Horm. Res.*, **36**, 477-508.
 - (2) Frigeri L. J., Peterson S. M., Lewis U. J., 1979. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 778-779.
 - (3) Smal J., Closset J., Hennen G., De Meyts P., 1985. *Biochem. J.*, **225**, 283-289.
 - (4) Smal J., Closset J., Hennen G., De Meyts P., 1986. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **134**, 159-165.
 - (5) Smal J., Closset J., Hennen G., De Meyts P., 1986. The Endoc. Soc., 68th Annu. Meet., Anaheim (USA), Abstr. 365, p. 122.
-