

15

CONTROLE DE L'EXPRESSION DES GENES DE DIFFERENCIATION ADIPOCYTAIRE : CYCLE CELLULAIRE ET HORMONES.

Grimaldi P., UPR 57 CNRS, Parc Valrose 06034 Nice

La différenciation adipocytaire se traduit par l'activation de nombreux gènes et est contrôlée par différents facteurs adipogéniques et mitogéniques. L'utilisation de modèles cellulaires a conduit à la distinction de plusieurs étapes dans la conversion du préadipocyte en adipocyte, à la caractérisation des événements cellulaires et moléculaires impliqués dans ces étapes et à la description du mode d'action de diverses hormones adipogéniques. L'arrêt prolongé du préadipocyte dans la phase G1/S du cycle cellulaire provoque l'activation d'une série de gènes (pOb24, lipoprotéine lipase,....). L'expression des gènes de différenciation terminale et en particulier de ceux codant pour les enzymes de la lipogénèse, est plus tardive et nécessite d'une part le traitement des cellules par des hormones "permissives" (hormone somatotrope, triiodothyronine) et d'autre part des mitoses spécifiques aux cellules ayant déjà exprimé la première partie du programme de différenciation. L'insuline exerce dans les cellules différenciées, un effet modulateur sur l'expression des gènes de différenciation terminale.

In vivo, une distinction entre événements précoces et tardifs lors de la conversion adipocytaire peut également être proposée. Une phase de prolifération initiale conduirait à la création d'un pool de préadipocytes exprimant uniquement les marqueurs précoces de différenciation (ARNm pOb24, lipoprotéine lipase). Certaines de ces cellules effectuaient des mitoses puis exprimeraient le programme de différenciation terminale; d'autres préadipocytes resteraient présents même à l'âge adulte, et pourraient entrer en phase de différenciation terminale sous l'influence de stimuli mitogéniques et adipogéniques non encore identifiés.

16

DES STRUCTURES SECONDAIRES ET DES FACTEURS AGISSANT EN TRANS CONTROLENT L'EPISSAGE ALTERNATIF DU GENE β TROPOMYOSINE

Libri D.¹, Marie J.², Goux-Pelletan M.², Brody F.², Fizman M.Y.¹

¹Département de Biologie Moléculaire, Institut Pasteur, Paris. ²C.G.M., Bât.24,CNRS, Gif/Yvette.

Un fragment du gène β tropomyosine contenant les deux exons alternatifs encadrés par deux exons communs a été placé sous le contrôle du promoteur précoce de SV40. Cette construction a été utilisée pour transfecter des cellules musculaires de caille. Des transfectants stables ont été isolés et nous avons analysé la nature des transcrits selon que les cellules sont différenciées ou non. En utilisant une méthode d'extension contrôlée d'amorce, nous avons pu montrer que les myoblastes accumulent des transcrits contenant les séquences de type non musculaire (exon 6A) alors que les myotubes accumulent des transcrits contenant les séquences spécifiques de muscle (exon 6B). Ceci démontre donc que le fragment de gène que nous avons utilisé contient toutes les informations nécessaires pour un contrôle efficace de l'épissage alternatif. Nos résultats démontrent également que des facteurs agissant en trans doivent également être impliqués.

L'utilisation de programme informatique pour analyser la structure secondaire des transcrits nous a permis de repérer des séquences de l'exon 6B capables de former une structure en tige et boucle. Nous avons modifié la séquence d'un des brins de la tige en la remplaçant par son complémentaire (mutant 16). Par ailleurs, nous avons observé que l'intron qui précède l'exon 6B contient en 3' un pourcentage très important de pyrimidine, tel qu'on ne retrouve pas de point de branchement potentiel à la position normale (-30 à -40nt du site accepteur d'épissage) Nous avons donc réalisé une délétion d'environ 30 pyrimidines en introduisant en plus une séquence canonique de site de branchement (mutant 14). Enfin nous avons également modifié une séquence dans l'intron qui suit l'exon 6B (mutant 15). Ces trois mutants ont été utilisés pour transfecter soit des cellules musculaires soit des cellules non musculaires (cellules HeLa). Les résultats obtenus peuvent être résumés de la manière suivante: 1) le mutant 15 n'a aucun effet et se comporte comme la construction d'origine; 2) les mutants 14 et 16 se comportent de manière presque identique et sont caractérisés par l'utilisation de l'exon 6B dans toutes les cellules. Toutefois, le transcrit obtenu avec le mutant 14 présente une anomalie puisque l'exon 6B ne commence pas à son site normale d'épissage mais commence 30 nucléotides en amont du fait de l'utilisation d'une séquence AG introduite dans la mutation. L'ensemble de ces résultats sont compatibles avec l'idée que des structures secondaires pourraient masquer l'exon 6B dans des cellules non musculaires et le rôle des facteurs agissant en trans serait de reconnaître ces structures pour permettre l'utilisation de l'exon 6B par l'appareil d'épissage.