

35

DIFFERENCIATION FONCTIONNELLE DE LIGNEES PRIMAIRES ET PERMANENTES DE GRANULOSA DE BREBIS ET DE TRUIE

Mulsant P., Haley F., Bonnet A., Benne F., Gasser F.

INRA Toulouse, Laboratoire de Génétique Cellulaire, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan Cédex.

Nous abordons les mécanismes hormonodépendants contrôlant le développement du follicule ovarien par l'étude *in vitro* de cellules de la granulosa. Les réponses fonctionnelles de primocultures de brebis ou de truie et de lignées de brebis pérennisées par les gènes précoces de SV40 ont été comparées. Les effets des hormones gonadotropes (FSH, LH, PMSG) et d'agents mimétiques (dibutyryl AMP cyclique, forskoline, toxine cholérique) ont été testés à confluence, en milieu chimiquement défini. Pour la production de progestérone (dosage par HPLC ou RIA dans le milieu de culture), les primocultures de brebis sont fortement stimulées par l'AMPc et les activateurs de l'adenylate cyclase (X10 - X100) alors que pour la truie on observe également un haut niveau de sensibilité aux hormones gonadotropes (X20 - X100). Les lignées pérennisées de brebis subissent une forte extinction fonctionnelle, de 100 fois ou plus, de la production basale de la progestérone mais restent inductibles pour ce critère par l'AMPc.

La synthèse des protéines a été analysée, après marquage à la méthionine ³⁵S, par électrophorèse monodimensionnelle. Les protéines intracellulaires des primocultures et des clones pérennisés de brebis sont modifiées en réponse à l'AMPc et à la forskoline (notamment, induction d'une bande à 40 kd environ et répression à 25 kd environ). Certaines protéines sécrétées dans le milieu de culture par les clones pérennisés sont induites par les mêmes effecteurs (à environ 80 et 130 kd). Chez la truie, les mêmes types de réponse sont également observés pour les protéines intracellulaires, après traitement aux hormones gonadotropes.

En conclusion, on observe un parallélisme dans les réponses aux effecteurs utilisés en ce qui concerne les deux indicateurs fonctionnels étudiés chez la brebis et la truie. La granulosa de brebis présente *in vitro* une sensibilité aux hormones gonadotropes beaucoup plus faible que celle de truie. Nous montrons aussi l'intérêt des lignées pérennisées dans cette étude puisqu'elles conservent certaines caractéristiques fonctionnelles des cellules d'origine.

36

MODULATION DE L'EXPRESSION DE GENES DE COLLAGÈNE DANS DES CHONDROCYTES ÉPIPHYSAIRES DE LAPIN EN CULTURE

Nataf V., Tsagris L., Bonaventure J.*, Corvol M.T.

INSERM U.30, *INSERM U.12, Hôpital des Enfants-Malades, 75015 PARIS.

Des chondrocytes de cartilage épiphysaire de lapin prépubère mis en culture primaire dans un milieu Dulbecco-10 % sérum se développent en colonies multicouches, synthétisent et sécrètent des protéoglycanes et plusieurs types de collagène mesurés respectivement après incorporation de ³⁵S-sulfure et de ³H-Proline, et analysés par électrophorèse en gel d'acrylamide. Les protéoglycanes sont de type "cartilage" par comparaison avec les molécules extraites de fragments cartilagineux. Les collagènes analysés sont de plusieurs types : plus de 85 % des protéines collagéniques sont de type α_1 II avec 3 % de type α_1 I- α_2 II et 10 % de type α_1 III. Lorsque les cellules sont incubées pendant 2 cycles cellulaires supplémentaires dans un milieu défini contenant FGF (10 ng/ml, on note une diminution significative de la synthèse protéique totale avec réduction de 60 à 70 % des protéoglycanes et de 80 % des protéines collagéniques néosynthétisées. L'addition d'insuline (1-5 μ g/ml) ou IGF₁ (1-20 ng/ml) stimule les synthèses protéiques qui atteignent alors un niveau similaire à celui observé en présence de sérum. L'étude des RNA totaux cellulaires réalisée par Slot blot et Northern blot à l'aide de sonde cDNA spécifiques des gènes de collagène de type II, I et III montre sous l'effet de FGF seul une réduction significative du taux de mRNA des chaînes de type II et de type I alors que le taux des chaînes de type III est maintenu et même un peu augmenté. Après addition d'IGF₁, il y a augmentation préférentielle des mRNA correspondant aux chaînes de type II alors que l'insuline stimule de façon uniforme les mRNA des différentes chaînes collagéniques.

En conclusion FGF, insuline et IGF agissent de façon différente sur la croissance et la différenciation de chondrocytes *in vitro*. Seul IGF₁ stimule préférentiellement l'expression du phénotype différencié.