

## Modulation de l'ARN messenger de la chymotrypsine pancréatique au cours du développement post-natal et du sevrage chez le veau

I Le Huerou<sup>1</sup>, C Wicker<sup>2</sup>, P Guilloteau<sup>1</sup>, R Toullec<sup>1</sup>, A Puigserver<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire du Jeune Ruminant, INRA, 65, rue de St-Brieuc, 35042 Rennes Cedex;

<sup>2</sup> Centre de Biochimie et de Biologie Moléculaire, CNRS, BP 71, 13402 Marseille Cedex 9, France

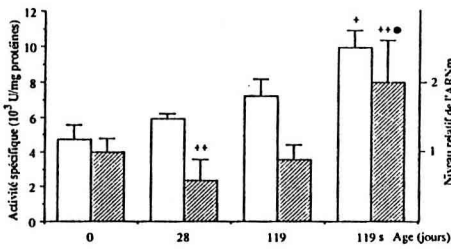
**Summary** — Levels of chymotrypsin mRNA in the pancreatic tissue of preruminant calves were significantly decreased on d 28 and to a lesser extent on d 119 as compared to those of newborns. Enzymic activity regularly increased during the same period. By contrast, both chymotrypsin-specific activity and the mRNA level in the ruminant animals were enhanced on d 119 (1.4- and 2.3-fold, respectively), suggesting that some pretranslational regulation of the chymotrypsin gene was induced by weaning.

**Introduction** — De nombreux travaux ont mis en évidence un effet de l'âge et du sevrage sur les activités des protéases pancréatiques chez plusieurs espèces animales (Guilloteau *et al*, 1983; Robberecht *et al*, 1971). Chez le rat, le niveau de ces hydrolases au cours du développement dépend de celui de leurs ARN messagers (ARNm) spécifiques (Han *et al*, 1986). A cet égard, le veau représente un modèle expérimental de choix pour dissocier les effets de l'âge et du sevrage sur la biosynthèse des enzymes digestives pancréatiques.

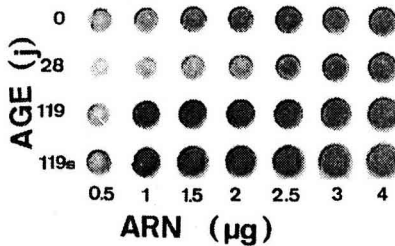
l'ARNm correspondant, les ARNs totaux ont été purifiés après homogénéisation du tissu en présence de thiocyanate de guanidinium et plusieurs extractions en présence de chlorure de guanidine (Chirgwin *et al*, 1979). L'ARNm de la chymotrypsine a été quantifié après hybridation des ARN totaux à une sonde ADN complémentaire (ADNc) spécifique marqué à l'aide de [<sup>32</sup>P]dCTP. Les spots radioactifs correspondant aux diverses concentrations d'ARN déposés ont été découpés et la radioactivité déterminée après comptage en milieu scintillant. La sonde de 660 paires de bases, a été obtenue à partir d'une banque d'ADNc de pancréas de bœuf et sa séquence partielle établie par la méthode de Sanger.

**Matériel et Méthodes** — Vingt veaux mâles *Holstein* sont répartis en 4 lots. Les animaux du premier groupe sont sacrifiés dans l'heure qui suit leur naissance, alors que ceux du deuxième et du troisième groupes sont au préalable respectivement maintenus au stade préruminant pendant 28 et 119 j. Les veaux du quatrième groupe sont sevrés entre le 28<sup>e</sup> et le 56<sup>e</sup> j et abattus à l'âge de 119 j. L'activité spécifique de la chymotrypsine dans chaque pancréas a été déterminée par spectrophotométrie avec du *N*- $\alpha$ -benzoyl-L-tyrosine *p*-nitroanilide comme substrat (Bundy, 1963). Pour évaluer le taux de

**Résultats et Discussion** — Chez les veaux préruminants de 28 j, l'activité spécifique de la chymotrypsine est déjà plus élevée qu'au j 0. Sa valeur à 119 j atteint 1,5 fois celle à la naissance (fig 1). Par contre, le niveau de l'ARNm correspondant diminue de 44% ( $P < 0,001$ ) au j 28 pour retrouver au j 119 une valeur proche de celle observée chez les nouveau-nés (fig 2). L'évolution différente du niveau relatif de l'ARNm et de l'activité spécifique



**Fig 1.** Activité spécifique de la chymotrypsine ( ) et niveau relatif de l'ARNm correspondant (▨) chez le veau au stade préruminant ou ruminant. Les niveaux d'ARNm sont normalisés par rapport aux valeurs obtenues au j 0. La lettre s concerne les animaux sevrés. Les valeurs de *P*, calculées à partir d'un test-*t* de Student, comparant les différents groupes d'animaux aux nouveau-nés sont < 0,01(+) et < 0,001(++); celle comparant les animaux sevrés aux préruminants de même âge est < 0,001(●). Les autres valeurs ne sont pas significativement différentes.



**Fig 2.** Autoradiographie d'une hybridation de l'ARNm pancréatique total avec l'ADNc de la chymotrypsine («dot-blot»). L'ARN total dénaturé est fixé sur un filtre de nitrocellulose puis hybridé (20 h, 42°C) avec l'ADNc marqué par «nick-translation» au [<sup>32</sup>P]dCTP (1 x 10<sup>7</sup> cpm/ml de milieu d'hybridation). L'activité spécifique de la sonde est de 0,2 – 1 x 10<sup>9</sup> cpm/µg.

de la chymotrypsine au cours du développement est intéressante. La biosynthèse de cette protéase à sérine serait donc modulée au niveau transcriptionnel et/ou par la stabilité de l'ARNm spécifique puisque

son taux varie, mais également au niveau traductionnel et/ou post-traductionnel, par activation différentielle de la chymotrypsine, car l'augmentation de l'activité enzymatique dans le tissu ne s'accompagne pas d'une variation parallèle de son ARNm.

Chez les veaux sevrés âgés de 119 j, l'activité spécifique de la chymotrypsine et la quantité d'ARNm sont augmentées respectivement de 38% (NS) et 133% (*P* < 0,001) par rapport aux animaux préruminants de même âge et sensiblement de la même valeur par rapport aux nouveau-nés. Une régulation au niveau pré-traductionnel semble donc, en grande partie, responsable de la modification de l'expression de la chymotrypsine qui accompagne le sevrage.

Cette étude préliminaire met en évidence l'existence d'au moins deux mécanismes impliqués dans la régulation de la biosynthèse d'une enzyme digestive pancréatique au cours des quatre premiers mois du développement chez le veau. Le sevrage, qui se situe dans cette période, s'accompagne de modifications anatomiques et physiologiques importantes et d'une modulation de l'expression des gènes de certaines enzymes pancréatiques. On peut raisonnablement penser qu'un ou plusieurs relais hormonaux interviennent dans ces régulations en raison de la multiplicité des mécanismes impliqués.

- Bundy HF (1963) *Arch Biochem Biophys* 102, 416-422
- Chirgwin JM, Przybyla AE, McDonald RJ, Rutter WJ (1979) *Biochemistry* 18, 5294-5299
- Guilloteau P, Corring T, Toullec R, Robelin J (1983) In: *Protein Metabolism and Nutrition, II*. (Arnal M, Pion R, Bonin D, eds) INRA Publications, Versailles, 350-355
- Han JH, Rall L, Rutter WJ (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 110-114
- Robberecht P, Deschodt-Lanckman M, Camus J, Bruylants J, Christophe J (1971) *Am J Physiol* 221, 376-381