ÉTUDE DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE *IN VIVO* : MESURE DE L'ACTIVITÉ ANABOLISANTE DE DIVERS TISSUS DU RAT EN CROISSANCE A L'AIDE DE LA L-LYSINE ^{14}C (U)

M. ARNAL, G. FAUCONNEAU et Renée PECH
avec la collaboration technique d'Éveline AUROUSSEAU

*Laboratoire d'Étude des Métabolismes,
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, I. N. R. A.,
63 - Saint-Genès-Champagnelle*

RÉSUMÉ

Des rats à croissance rapide (6 g/j) reçoivent 10 μCi de L-lysine- ^{14}C par injection intrapéritonéale. Les animaux sont disséqués en 6 compartiments : le sang, les muscles des membres postérieurs, l'appareil digestif, le contenu digestif, la peau et la carcasse. La radioactivité de la L-lysine- ^{14}C est mesurée dans les fractions acides aminés libres et protéiques de chacun des compartiments.

Pendant les 2 premières heures suivant l'injection, le muscle constitue une réserve de L-lysine- ^{14}C libre qui disparaît ensuite pendant les deux heures suivantes au profit d'autres compartiments de l'organisme.

Les protéines du muscle incorporent la L-lysine- ^{14}C pendant 8 heures environ. Des échanges de lysine ont pu être mis en évidence entre les divers compartiments.

La radioactivité du contenu digestif atteint un maximum 4 heures après l'injection.

La décroissance de la radioactivité spécifique de la L-lysine- ^{14}C libre est d'autant plus rapide que l'activité anabolisante du compartiment est élevée.

Les temps de renouvellement obtenus pour les divers compartiments sont dans l'ordre croissant : l'appareil digestif 1,06 jour, la peau 2,6 jours, le muscle 7,5 jours et le sang 9,1 jours.

La quantité de protéines synthétisées (obtenue par extrapolation) des différents compartiments correspondant à 78 p. 100 du poids vif est de 32 g/kg/j.

INTRODUCTION

SCHOENHEIMER (1942) a observé que la quantité d'acide aminé marqué incorporée dans les protéines varie beaucoup en fonction du tissu considéré dans l'heure qui suit l'administration du traceur radioactif.

Il est à présent bien établi que dans les cellules des Mammifères, les protéines sont continuellement dégradées et resynthétisées à des vitesses différentes selon

la protéine, d'où le concept de « turnover » couramment utilisé. Dans un état métabolique stationnaire la vitesse de renouvellement des protéines est égale à la vitesse de synthèse ou de dégradation de ces protéines.

Or dans le cas d'animaux en croissance, la vitesse de dégradation est légèrement plus faible. La mesure du catabolisme protéique à partir d'une courbe de décroissance d'une protéine marquée en fonction du temps n'est valable que dans le cas où il n'y a pas de recyclage du précurseur, et il est souvent bien difficile de connaître l'intensité de ce phénomène. En revanche, l'anabolisme protéique obtenu par la mesure de la vitesse d'incorporation du précurseur dans les protéines est plus facile à apprécier.

Il est intéressant de connaître les potentiels anabolisants de divers tissus lors de la synthèse protéique liée à la croissance et notamment en fonction des facteurs qui lui sont nécessaires : l'alimentation en particulier.

Le présent travail effectué avec des animaux nourris *ad libitum* a déjà fait l'objet de plusieurs notes (ARNAL et FAUCONNEAU, 1968-1969-1970) ; il constitue la première partie d'une étude de l'influence de divers facteurs nutritionnels : énergie de la ration, taux protéique, acides aminés indispensables.

Par des méthodes analogues, WATERLOW et STEPHEN (1968) ont étudié l'effet de repas à faible niveau protéique sur le « turnover » de divers tissus du rat, VANDERMEERS et VANDERMEERS-PIRET (1967) ont montré que des carences en lysine et en thréonine entraînaient une augmentation des synthèses protéiques de près de 100 p. 100 dans le pancréas du rat.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — *Matériel animal*

Les rats mâles de souche *Wistar* élevés dans des locaux éclairés pendant 12 h, maintenus à 22° et à un degré hygrométrique contrôlé (60 p. 100), sont sevrés vers 70 g : poids à partir duquel ils reçoivent jusqu'à 110-120 g l'aliment pour rat « Sanders ».

2. — *Régime*

A partir de ce poids ils sont nourris *ad libitum* jusqu'à l'abattage avec le régime décrit sur le tableau 1 contenant 14 p. 100 MA ($N \times 6,25$) par rapport à la matière sèche. La croissance moyenne obtenue est de 6 g/j.

TABLEAU 1

Composition du régime (g. matière sèche/kg)

Amidon de blé	462
Farine de poisson de Norvège	177
Saccharose	220
Agar-Agar	20
Mélange minéral	50
Mélange vitaminique	10
Huile d'arachide	60
Méthionine	1,5

3. — *Méthode expérimentale*

Au poids de 200 g, correspondant à l'âge de 50-52 j, les rats reçoivent une injection intrapéritonéale de 10 μ Ci de L-lysine- 14 C (U) (activité spécifique 128,4 mCi/mM) soit 11,4 μ g de L-lysine.

Les sujets sont ensuite sacrifiés à des temps variables après l'injection selon le schéma du tableau 2 à raison de 3 animaux par points expérimentaux.

TABLEAU 2
Temps d'abattage après l'injection

30 mn	1 100 mn = 18 h 20
60 = 1 h	1 500 = 25 h
120 = 2 h	2 100 = 35 h = 1 j, 11 h
240 = 4 h	3 000 = 50 h = 2 j, 2 h
480 = 8 h	5 640 = 94 h = 3 j, 22 h
700 = 11 h 40	7 000 = 116 h 40 = 4 j, 20 h 40
900 = 15 h	9 000 = 150 h = 6 j, 6 h

Trois autres lots de 3 rats servent à la mesure de la radioactivité excrétée dans l'urine et le gaz carbonique, le dernier lot ne reçoit pas de radioactivité.

Pour les temps longs, supérieurs à 240 mn, les animaux reçoivent *ad libitum* le régime expérimental ; la croissance des rats ayant reçu une injection d'acides aminés radioactifs n'était plus que de 4,2 g/j en moyenne entre le moment de l'injection et celui de l'abattage. Il semble que ce soit la climatisation du laboratoire où a lieu l'expérimentation, moins bien contrôlée que celle de la raterie, qui soit en partie responsable de cette diminution de la vitesse de croissance.

4. — *Abattage et prélèvement*

Un quart d'heure avant l'abattage l'animal est anesthésié au nembutal, le sang est ensuite prélevé par ponction intra cardiaque, et mis aussitôt dans 7 fois son volume d'éthanol 95° froid (— 10°C).

La cavité abdominale est ouverte, le tube digestif (du cardia au rectum) est prélevé et lavé par 100 ml d'acide trichloracétique 10 p. 100 froid. Le contenu digestif ainsi obtenu est conservé à — 20°C. Le reste de l'appareil digestif est enlevé de la cavité abdominale ainsi que les reins. Ces derniers, le foie et la rate sont morcelés dans du sérum physiologique à 0°C afin d'éliminer le maximum de sang. Foie, rein, tube digestif et glandes annexes sont plongés dans l'azote liquide et constituent le compartiment « appareil digestif vide ».

L'animal est entièrement dépouillé, les muscles des membres postérieurs sont disséqués. Il reste alors un compartiment que nous appelons « carcasse ».

Nous constituons ainsi 6 compartiments : le sang, l'appareil digestif, le contenu digestif, la musculature des membres postérieurs, la peau et la carcasse.

Chaque compartiment (excepté le sang et le contenu digestif) est congelé dans l'azote liquide et conservé en sachet plastique à — 20°C.

Les poids frais de peau et de carcasse sont supérieurs à 100 g ; nous avons dû effectuer un traitement préalable.

La peau est congelée dans l'azote liquide et hachée très finement dans un broyeur « Scharfen » refroidi lui-même à l'azote liquide. La poudre obtenue est reçue directement dans un sachet en matière plastique contenant de l'azote liquide et suspendu à l'extrémité de la vis sans fin du broyeur.

La carcasse est broyée au robot-coupe refroidi à l'azote liquide.

5. — *Méthodes analytiques*

Les traitements des divers compartiments visent à séparer la fraction L-lysine- 14 C libre de celle où cet acide aminé se trouve incorporé dans les protéines. Les agents d'extractions des acides aminés libres sont l'éthanol 82° pour le sang et l'acide trichloracétique 10 p. 100 (ATC 10 p. 100 pour les autres tissus.

a) *Extraction des acides aminés libres.*

Sang. — Les acides aminés libres sont extraits par l'éthanol 82° selon une technique d'épuisements successifs (PAWLAK et PION, 1968).

Autres compartiments. — Un poids connu est mis dans le pot du broyeur (Turmix ou Blendor) en présence d'un volume d'ATC 10 p. 100 à 0°C égal à 40 fois le poids de matière sèche soit 8 fois environ le poids de matière fraîche de l'échantillon. Le temps de broyage est de 3 fois 1 mn, avec refroidissement entre chaque opération de sorte que la température ne dépasse pas 3°C. L'extrait est séparé du résidu par centrifugation à froid (0-2°) à 1 600 g. Le résidu est repris et l'ensemble des opérations est répété 3 fois.

Les différents extraits sont filtrés et rassemblés. L'ATC 10 p. 100 est éliminé à l'aide de 3 extractions successives à l'éther sulfurique 65° (— 15°C) volume à volume. L'éther solubilisé est ensuite éliminé par barbotage d'air dans la solution.

b) *Résidus protéiques.*

Sang. — C'est le résidu sanguin total obtenu après extraction par l'éthanol 82°.

Autres compartiments. — Les résidus de l'extraction par ATC 10 p. 100 sont neutralisés par le méthanol-acétate de sodium N pH 7. Les matières grasses sont extraites par le méthanol-chloroforme (I V-2 V) pH 7, $\frac{P}{V} = \frac{1}{50}$. Les résidus ainsi obtenus sont ensuite placés sur filtre Buchner, lavés à l'éthanol 100° puis à l'éther sulfurique. Après séchage sous vide au dessiccateur ils sont homogénéisés au broyeur à billes « Danguemeau ». On obtient ainsi des poudres qui contiennent les protéines, les acides nucléiques et une partie des sels minéraux, elles sont conservées à — 25°C.

c) *Séparation et dosages des acides aminés.*

— Les extraits contenant les acides aminés libres sont d'abord purifiés par passage sur résine échangeuse de cations (Amberlite IR 120).

— Les acides aminés des résidus « protéiques » secs et dégraissés sont libérés par hydrolyse acide (HCl 6 N, 120°C, 24 h).

— Les acides aminés sont séparés et dosés sur un analyseur automatique selon une version accélérée de la méthode de MOORE, SPACKMANN et STEIN (1958).

6. — *Mesure de la radioactivité*

Les mesures radiochromatographiques de la L-lysine ¹⁴C sont effectuées dès la sortie de colonne de l'analyseur automatique grâce à un spectromètre à cellule d'anthracène (Packard Flow Detector) ; toutes les autres mesures de radioactivité sont faites par scintillation liquide au moyen d'un spectromètre Packard Tricarb 3375.

a) *Mesure de la radioactivité des extraits.*

Le mélange scintillant utilisé est celui décrit par PATTERSON et GREENE (1965) ; il contient du Triton X 100. L'addition d'eau provoque après agitation un gel blanchâtre qui maintient l'homogénéité du milieu de comptage.

b) *Mesure de la radioactivité des poudres.*

Les poudres sont préalablement solubilisées à l'aide de l'hydroxyde d'Hyamine 10 X pendant 15 heures à 60°C (40 à 120 mg de poudre dans 2 ml d'hydroxyde d'Hyamine 10 X). Selon la coloration obtenue, la solution est diluée 3 à 6 fois par du dioxane (DULCINO *et al* 1963). Un ml de ce mélange est ajouté à 17 ml de scintillateur constitué par : 500 ml de dioxane, 500 ml de xylène, 80 g de naphthalène, 4 g de PPO (2-5 diphényl oxazole) et 500 mg de diméthyl POPOP (1,4 bis-2-(4-méthyl-5-phényloxazolyl)-benzene).

c) *Rendements de comptage.*

Ils sont de l'ordre de 60 à 70 p. 100 ; les corrections de quenching sont effectuées à l'aide d'un standard externe, et des contrôles périodiques ont été effectués avec un étalon interne (fourni par le Commissariat à l'Énergie atomique). Quelques précautions particulières doivent être prises dans le cas de la mesure de la radioactivité des poudres : en effet les préparations dans les flacons de comptage doivent séjourner deux ou trois jours à l'obscurité, afin d'éliminer les phénomènes de « chimiluminescence » (DULCINO *et al.*, 1963).

7. — Mesure du $^{14}\text{CO}_2$

L'animal est placé dans une chambre d'un litre de volume balayée par un courant d'air assurant une concentration en gaz carbonique dans l'enceinte inférieure à 1 p. 100. La quantité de gaz carbonique expiré par l'animal est mesurée par un analyseur à infrarouge Hartmann-Braun et recueillie ensuite dans une solution de soude 0,8 N. La radioactivité d'une fraction de cette solution est mesurée par scintillation liquide à l'aide du scintillateur contenant le triton X 100.

8. — Récolte de l'urine

Les animaux sont placés dans des cages à métabolisme et l'urine de 24 h est recueillie au froid (0°C) sur HCl 0,1 N.

La radioactivité totale est mesurée aussi à l'aide du scintillateur au Triton X 100.

9. — Expression des résultats

Trois modes d'expression ont été utilisés pour les fractions de chacun des compartiments :

— le pour cent de la dose injectée ;

— la formule de BLACK (1958) : rapport entre les désintégrations par minute par gramme de tissu frais et la radioactivité injectée par gramme de poids vif ($\frac{\text{DPM/gt}}{\text{RAI/gp}}$) qui nous permet de tenir compte de la variation de poids au cours de la période expérimentale et de la valeur de la dose injectée.

— la radioactivité spécifique (RAS) qui est le rapport entre la formule de BLACK et la teneur en lysine (mg/g) de la fraction considérée.

10. — Mesure des synthèses protéiques : calcul du temps de renouvellement des protéines

De nombreux auteurs (SCHIMKE, 1964 ; REBOUD *et al.*, 1966) s'accordent à penser que la vitesse de synthèse des protéines est d'ordre 0 alors que la vitesse de dégradation et d'exportation de la protéine est d'ordre 1.

Nous pouvons écrire que, dans un tissu :

$$\frac{dN}{dt} = K_s a(t) - K_{E+D} N \quad (1)$$

$\frac{dN}{dt}$ = variation instantanée de la radioactivité « protéique » d'un gramme de tissu exprimée en DPM/g ;

$a(t)$ = évolution de la radioactivité spécifique du précurseur (lysine libre) en DPM/mg, en fonction du temps ;

K_s = constante de vitesse d'incorporation du précurseur ;

K_{E+D} = constante de vitesse d'exportation et de dégradation.

Dans le cas où la durée t pendant laquelle l'on considère l'incorporation du précurseur est courte, la quantité des protéines dégradées ou exportées est très faible (voir discussion) et l'on peut considérer que le terme $K_{E+D}N$ de l'égalité (1) est négligeable, d'où la nouvelle égalité :

$$\frac{dN}{dt} = K_s a(t) \quad (2)$$

qui, considérée pendant un temps donné t court peut s'écrire :

$$N = K_s \int_0^t a(t) dt \quad (3)$$

d'où l'on tire :

$$K_s = \frac{N}{\int_0^t a(t) dt}$$

K_s = mg de lysine incorporée dans les protéines d'un gramme de tissu par unité de temps.

Connaissant la teneur en lysine des protéines du tissu il est aisé de connaître la quantité de protéine synthétisée. La quantité totale de protéines du tissu rapportée à la quantité synthétisée par unité de temps nous donne le temps de renouvellement.

TABLEAU 3
Évolution de la radioactivité totale des différents compartiments de l'organisme exprimée par la formule de BLACK ($\times 10^3$)

Temps (mn)		30	60	120	240	480	700	900	1 100	1 500	2 100	3 000	5 640	7 000	9 000
Sang	Éthanol-soluble.....	41,8	24,5	14,7	31,6	17,5	16,8	9,8	10,9	15,0	21,6				
	Insoluble.....	14,0	37,3	40,4	53,6	64,9	63,8	91,3	62,3	66,2	76,8	70,3	7,6	4,1	6,1
	Total.....	55,8	61,8	55,1	85,2	82,4	80,6	101,1	73,2	81,2	98,4		92,6	85,7	88,7
Muscle	Acido-soluble.....	72,5	65,5	43,6	7,2	4,0	2,2	3,1	4,7	5,1	3,4	3,8	2,7	1,9	1,6
	Insoluble.....	10,6	18,7	30,1	37,2	58,0	63,1	57,5	64,1	70,9	69,3	77,2	73,1	66,9	80,5
	Total.....	83,1	84,2	73,7	44,4	62,0	65,3	60,6	68,8	76,0	72,7	81,0	75,8	68,8	82,1
Appareil digestif	Acido-soluble.....	38,5	16,8	19,0	10,2	4,3	7,0	2,5	2,2	1,4	1,9	1,3			
	Insoluble.....	109,8	137,3	152,6	101,6	127,9	131,1	132,2	152,2	95,0	134,8	101,4			
	Total.....	148,3	154,1	171,6	111,8	132,2	138,7	134,7	154,4	96,4	136,4	102,7			
Peau	Acido-soluble.....	31,0		15,6	6,9	5,6		2,5	1,4	1,1			0,9		
	Insoluble.....	24,9		47,3	42,6	53,7		44,6	54,1	49,0			44,6		
	Total.....	55,9		62,9	49,5	59,3	60,9	47,1	55,5	50,1	59,1	49,0	45,5	40,1	52,8
Carcasse	Total.....				57,7	59,3			61,4	65,3		57,7	60,2		59,0

RÉSULTATS

1. — *Évolution de la radioactivité des fractions éthanolo et acido-solubles des divers compartiments*a) *Évolution de la radioactivité totale (tabl. 3).*

Les décroissances de la radioactivité globale des fractions éthanolo-solubles du sang, acido-solubles de l'appareil digestif et de la peau, exprimée par la formule de BLACK, sont voisines jusqu'au temps 480 mn après l'injection. Il est à noter qu'à ce temps les radioactivités des fractions solubles des 3 tissus cités ci-dessus ainsi que celle du tissu musculaire sont approximativement égales. Par la suite, les radioactivités acido-soluble de la peau et de l'appareil digestif continuent à décroître tandis que celles du sang et du muscle sont plus élevées : environ 5 et 2 fois plus fortes au point 3 000 mn après l'injection.

Dans la phase 0-120 mn après l'injection la radioactivité totale acido-soluble du tissu musculaire est très élevée ; la masse musculaire totale représente 26,2 p. 100 de la dose injectée 1 heure après l'injection contre 2,4 p. 100 pour le sang total et 2,1 p. 100 pour l'appareil digestif.

La radioactivité du contenu digestif reste toujours très faible, inférieure à 0,5 p. 100 de la dose injectée, excepté pour les points 30 et 240 mn pour lesquels elle atteint 0,8 à 1 p. 100.

b) *Évolution de la radioactivité incorporée dans la L-lysine-¹⁴C libre (fig. 1).*

La représentation semi-logarithmique de la radioactivité de la L-lysine-¹⁴C libre montre que dans le cas du sang et de la peau les variations observées obéissent sensiblement à des lois exponentielles.

Jusqu'au temps 240 mn après l'injection la radioactivité de la L-lysine-¹⁴C libre musculaire est plus élevée que celle du sang, 5 et 4 fois plus, respectivement pour les points 60 et 120 mn.

La décroissance de la radioactivité de la L-lysine-¹⁴C libre de l'appareil digestif est marquée par un accident au point 120 mn, ce phénomène a déjà été décrit par ailleurs (ARNAL et FAUCONNEAU, 1969) dans le cas de la radioactivité totale de ce compartiment.

c) *Radioactivité spécifique de la L-lysine-¹⁴C libre tissulaire (fig. 2).*

La L-lysine-¹⁴C disparaît très vite dans les fractions solubles des organes étudiés. Trente minutes après l'injection, les radioactivités spécifiques de la L-lysine-¹⁴C libre du sang et de l'appareil digestif sont les plus élevées. Elles sont supérieures de 30 p. 100 environ à celles du muscle et de la peau.

La décroissance de la RAS de la L-lysine-¹⁴C libre de l'appareil digestif est très rapide : 120 mn après l'injection, elle est 5 fois plus faible que celle de la peau et 16 fois plus faible que celle du sang. La diminution de la L-lysine-¹⁴C libre est moins rapide dans les autres tissus.

La RAS de la L-lysine-¹⁴C libre musculaire, inférieure à celle du sang, jusqu'au temps 120 mn, lui devient supérieure 240 mn après l'injection.

TABLEAU 4
Évolution de la radioactivité totale des différents compartiments de l'organisme exprimée en % de la dose injectée

Temps (mn)	30	60	120	240	480	700	900	1 100	1 500	2 100	3 000	5 640	7 000	9 000
Sang (¹)														
	4,2 1,4	2,4 3,7	1,5 4,0	3,2 5,3	1,8 6,5	1,7 6,4	1,0 9,1	1,1 6,2	1,5 6,6	2,2 7,7	— 7,0	0,8 8,5	0,4 8,2	0,6 8,3
Muscle (²)														
	5,6 29,0 4,3	6,1 26,2 7,5	5,5 17,4 12,0	8,5 2,9 14,8	8,3 1,6 23,2	8,1 0,9 25,2	10,1 1,2 23,0	7,3 1,9 25,6	8,1 2,0 28,3	9,9 1,4 27,7	— 1,5 30,9	9,3 1,1 29,2	8,6 0,8 26,4	8,9 0,6 32,4
Appareil digestif														
	33,3 4,7 13,4	33,7 2,1 16,9	29,4 2,1 17,2	17,7 1,2 12,0	24,8 0,5 14,2	26,1 0,8 15,3	24,2 0,3 16,2	27,5 0,3 19,9	30,3 0,2 11,2	29,1 0,2 15,9	32,4 0,2 12,0	30,3	27,2	33,0
Contenu digestif														
	18,1 0,8 0,2	19,0 0,3 0,3	19,3 0,3 0,2	13,2 1,0 3,2	14,7 0,3 0,6	16,1 0,2 0,8	16,5 0,1 0,6	20,2 0,2 0,6	11,4 0,1 0,3	16,1 0,1 0,3	12,2 0,1 0,2		0,1 0,4	0,05 0,2
Appareil + Contenu														
	1,0 5,5 13,6	0,6 2,4 17,2	0,5 2,4 17,4	4,2 2,2 15,2	0,9 0,8 14,8	1,0 1,0 16,1	0,7 0,4 16,8	0,8 0,5 20,5	0,4 0,3 11,5	0,4 0,3 16,2	0,3 0,3 12,2	0,6	0,5	0,25
Peau														
	19,1 5,3 4,2	19,6	19,8	17,4 1,2 7,2	15,6 1,0 9,1	17,1	17,2 0,4 7,6	21,0 0,3 9,2	11,8 0,2 8,3	16,5	12,5			
Carcasse (³)														
	9,5		10,7	8,4 31,6	10,1 30,3	31,4	8,0	9,5 31,6	8,5 34,6		8,3 30,5	7,8 32,5	6,7	9,0 30,5

(¹) Le volume sanguin peut représenter de 6 à 10,8 p. 100 du poids vif (HALL *et al.*, 1957), nous avons pris le chiffre de 10 p. 100.

(²) La masse totale des muscles est égale à 40 p. 100 du poids vif (WATERLOW et STEPHEN., 1966).

(³) Voir texte.

FIG. 1. — Évolution de la *L*-lysine-¹⁴C libre

○ — sang
 ● — muscle
 □ — peau
 △ — appareil digestif

FIG. 2. — Radioactivité spécifique de la *L*-lysine-¹⁴C libre

○ — muscle
 ● — sang
 □ — peau
 △ — appareil digestif

d) Catabolisme de la *L*-lysine-¹⁴C (U).

Catabolisme oxydatif.

Pendant la première heure suivant l'injection la quantité totale de ¹⁴CO₂ dégagée est environ 1,8 p. 100 de la dose injectée, elle atteint 7 p. 100 après 8 h. L'évolution de la quantité de gaz carbonique marqué semble parallèle à celle de la somme des radioactivités globales acido-solubles du muscle, du tube digestif et de la peau.

Radioactivité de l'urine.

La radioactivité retrouvée dans l'urine 24 h après l'injection est faible ; elle représente seulement 2,7 p. 100 de la dose injectée. Le profil radiochromatographique de l'urine met en évidence de nombreux composés radioactifs que nous n'avons pas identifiés. L'urine ne renferme que des traces de lysine non dosables.

FIG. 3. — Radioactivité spécifique de la *L*-lysine-¹⁴C des fractions insolubles de divers compartiments

○ — muscle
● — sang
□ — peau
△ — appareil digestif

2. — Incorporation de la *L*-lysine-¹⁴C (U) dans les protéines des divers compartiments (fig. 3)

Les compartiments incorporent des quantités de *L*-lysine-¹⁴C dans les protéines dans l'ordre croissant suivant : muscle, sang, peau et appareil digestif. Une heure après l'injection, l'incorporation de la *L*-lysine-¹⁴C dans les protéines de l'appareil digestif est 7 fois plus importante environ que dans celles du muscle.

Comme nous l'avons décrit précédemment (ARNAL et FAUCONNEAU, 1969), la RAS des protéines de l'appareil digestif subit d'importantes fluctuations : elle diminue de 25 p. 100 entre les points 120 et 240 mn après l'injection. Entre 120 et 240 mn la vitesse d'incorporation de la *L*-lysine-¹⁴C dans les protéines de l'appareil digestif, de la peau et du muscle semble ralentie, puis une nouvelle phase d'incorporation plus intense conduit aux premiers maxima d'incorporation (ARNAL et FAUCONNEAU, 1970). Pour le muscle, le sang et la peau, la RAS atteint, entre 480 et 700 mn, un plateau qui s'étend jusqu'à 9 000 mn.

La RAS de la *L*-lysine-¹⁴C libre des divers compartiments est considérablement plus élevée que celle des protéines jusqu'au temps 240 mn après l'injection.

L'évolution de la RAS des fractions acides aminés libres et liés montre que l'intersection de ces deux courbes doit se situer vers des temps longs plus grands que 2 100 mn après l'injection.

3. — *Temps de renouvellement* (tabl. 5)

Les temps de renouvellement des protéines des divers compartiments sont dans l'ordre croissant suivant : appareil digestif, peau, muscle, sang. Celui des protéines du muscle est 7 fois plus grand que celui des protéines de l'appareil digestif.

TABLEAU 5

Compartiment	Temps de renouvellement (jours)
Sang	9,1
Muscle	7,5
Appareil digestif	1,06
Peau	2,6

4. — *Quantités de protéines synthétisées* (tabl. 6)

La quantité de protéines synthétisées dans l'appareil digestif est près de 1,5 fois plus élevée que celles synthétisées dans le muscle alors que la quantité totale des protéines musculaires est 5,5 fois plus grande environ que celle de l'appareil digestif.

La peau apparaît chez le rat comme un organe très actif, elle fabrique autant de protéines que l'appareil digestif.

Le tableau 6 montre les écarts considérables qui existent entre les protéines apparemment fixées et celles réellement synthétisées.

DISCUSSION

1. — *Critique de la méthode*

a) *Mode d'injection.*

Dans le but de déterminer les vitesses relatives d'incorporation de la L-lysine-¹⁴C dans les protéines d'animaux recevant des régimes de composition variable, l'injection intrapéritonéale a été choisie ; s'agissant d'expériences de longue durée il n'était pas nécessaire d'injecter la L-lysine-¹⁴C par voie intraveineuse, ce qui de plus provoquerait un stress important chez l'animal (VANDERMEERS et VANDERMEERS-PIRET, 1967), enfin, l'injection intrapéritonéale a l'avantage d'être une méthode rapide et facile à mettre en œuvre.

TABLEAU 6
Quantité de protéines synthétisées dans divers compartiments du rat de 200 g

	Poids du corps (%)	Lysine incorporée/j (mg)	Protéines synthétisées/j (mg) (extrapolation)	Protéines fixées/j (synthèse apparente) ⁽²⁾	Protéines totales du compartiment (mg)	Protéines synthétisées/j Protéines fixées/j	Protéines synthétisées/j Protéines totales du compartiment (vitesse de remplacement)
Muscle	40 ⁽¹⁾	128	1 408	480	13 500	2,9	0,1
Peau	17	136	2 550	204	6 460	12,5	0,4
Appareil digestif vide + organes annexes...	11	176	2 200	132	2 420	17	0,9
Sang	10 ⁽²⁾	28,8	286	120	2 780	2,4	0,1
Total	78	353,6	6 444	936	25 160	7	0,25

⁽¹⁾ WATERLOW et STEPHEN., 1966.

⁽²⁾ Le volume sanguin peut représenter 6 à 10,8 p. 100 du poids vif (HALL *et al.*, 1957).

⁽³⁾ Valeur fournie par M. VERMOREL à partir de bilans énergétiques.

b) *Méthodes analytiques.*

Trente minutes après l'injection, 30 p. 100 seulement de la radioactivité totale de la fraction éthanolo-soluble du sang peut être imputée à la L-lysine-¹⁴C, la proportion est de 60 p. 100 environ pour les fractions acido-solubles du muscle et du tube digestif et de 90 p. 100 pour celle de la peau (tabl. 7). La quantité variable de

TABLEAU 7

Pourcentage de la radioactivité acido ou éthanolo-soluble incorporée dans la L-lysine ¹⁴C (U)

Temps (mn)	30	60	120	240	900	1 100	2 100	3 000
Sang	31,5	49,9	66	4,3	13,5	1,6	2,9	4,7
Muscle	57,2	85,6	84,4	100			34,1	45,1
Appareil digestif	59	44	43					
Peau	89,7		48,7	27				

L-lysine-¹⁴C libre dans les extraits solubles des différents compartiments est due, d'une part à la présence de « catabolites » et d'autre part à la lysine incorporée dans des composés solubles. Dans le cas du sang, l'importance relative des « catabolites » diminue progressivement jusqu'au temps 120 mn. Par la suite, la proportion de lysine libre devient très faible car, dans ce compartiment, l'éthanol 82° solubilise quelques peptides et protéines : en effet, dans le cas du point 2 100 mn l'hydrolyse préalable de l'extrait fait apparaître une quantité de lysine totale 14 fois supérieure à celle de la lysine libre. La proportion de lysine libre est plus importante pour les fractions acido-solubles des autres compartiments étudiés : les radiochromatogrammes présentent un ou deux « pics » parasites non identifiés ; dans le cas de l'extrait acido-soluble musculaire du point 240 mn le seul « catabolite » observé représente 12,8 p. 100 de la radioactivité du « pic » L-lysine-¹⁴C ; en revanche, dans le cas de la peau, au même temps, il apparaît 2 pics parasites qui représentent 50 p. 100 de la radioactivité du « pic » L-lysine-¹⁴C.

Nous avons vérifié que la radioactivité des résidus (contenant 90 p. 100 de protéines environ) est due à la L-lysine-¹⁴C : trois échantillons ont été choisis, peau et tube digestif 30 mn, muscle 700 mn ; l'hydrolyse préalable puis le passage sur colonne de ceux-ci n'a révélé aucun pic parasite et les radioactivités ainsi mesurées de la L-lysine-¹⁴C sont en bon accord avec celles obtenues par scintillation liquide après digestion des poudres par la Hyamine 10 X.

c) *Contamination locale par le précurseur radioactif.*

L'injection du précurseur radioactif dans la cavité abdominale provoque une contamination directe temporaire de la fraction libre des tissus avoisinant la zone injectée par du précurseur non résorbé. Dans ces conditions, si un lavage par une solution de NaCl 9 p. 1 000 (REBOUD *et al.*, 1966) n'est pas effectué, le calcul du temps de renouvellement donnerait des chiffres trop faibles. Trente mn après l'injection

(notre premier point expérimental) le risque n'existe plus : en effet, VANDERMEERS et VANDERMEERS-PIRET (1967) ont montré que 30 mn après l'injection intrapéritonéale de L-leucine- ^{14}C toute la radioactivité était passée dans la circulation sanguine.

Cependant une partie du compartiment appareil digestif que nous pouvons estimer à 1 p. 100 du poids vif (le compartiment total représente 11 p. 100 du poids vif), a reçu pendant les premières 20 mn de la L-lysine- ^{14}C par voie sanguine d'une part et par voie transpéritonéale d'autre part, donc directement dans l'espace extracellulaire, ce qui entraîne une valeur par excès du pourcentage de la radioactivité injectée reçue par ce compartiment. En revanche, le temps de renouvellement n'est pas erroné pour autant puisque le calcul fait intervenir la radioactivité spécifique de la L-lysine- ^{14}C libre du compartiment.

d) *Erreurs dues au catabolisme. Recyclage du précurseur.*

Dans les divers compartiments étudiés, les protéines des résidus ont des temps de renouvellement qui varient de quelques heures (enzymes) à quelques semaines (protéines de structure) ; nous pouvons considérer que la quantité de radioactivité incorporée dans ces compartiments 30 mn après l'injection peut être valablement employée pour le calcul d'anabolisme car les phénomènes de dégradation sont faibles et influencent peu la radioactivité du précurseur même dans le cas de l'appareil digestif.

D'ailleurs, VANDERMEERS et VANDERMEERS-PIRET (1967) trouvent que l'incorporation de L-leucine- ^{14}C dans les protéines du pancréas et du foie croît linéairement pendant 20 mn après l'injection, mais que, entre 20 et 30 mn l'incorporation est ralentie.

En outre, les erreurs dans le calcul du temps de renouvellement sont minimisées par le fait qu'on tient compte de la radioactivité spécifique de la L-lysine- ^{14}C libre.

e) *Erreurs dues aux exportations de protéines synthétisées (cas de l'appareil digestif).*

REBOUD *et al.* (1966) après injection intrapéritonéale de L-valine- ^{14}C à des rats porteurs d'une fistule du canal de Wirsung, retrouvent 0,3 p. 100 de la radioactivité injectée dans le suc pancréatique 30 mn après l'injection, mais la présence de la sonde dans le canal entraîne une stimulation permanente de la sécrétion et la vitesse d'exportation des enzymes pancréatiques doit être plus élevée que dans les conditions physiologiques normales.

Il doit y avoir d'autres modes d'exportations plus rapides car nous retrouvons dans le contenu digestif 1 p. 100 de la dose injectée (tabl. 4) 30 mn après l'injection, sous forme, d'une part de lysine incorporée dans les protéines endogènes digestives et, d'autre part, de L-lysine- ^{14}C libre ; il s'agit d'efflux (COMBE et ARNAL, 1967). La radioactivité des contenus représente 7 p. 100 de la radioactivité totale de la fraction insoluble du compartiment appareil digestif au même point expérimental. Dans ces conditions, la perte de radioactivité de l'appareil digestif dans la lumière intestinale (pendant les 30 mn suivant l'injection) n'est pas négligeable. A cette perte s'ajoute d'ailleurs la quantité de lysine- ^{14}C liée des protéines plasmatiques et des globules, fabriquées dans le foie, l'intestin grêle et la rate. Les temps de renouvellement de ce compartiment obtenus dans ces conditions sont donc un peu trop élevés.

f) *Radioactivité spécifique du précurseur.*

Les décroissances des radioactivités spécifiques de la L-lysine- ^{14}C libre dans les divers organes ou tissus étudiés exprimées en coordonnées semi-logarithmiques définissent une série d'exponentielles traduisant l'incorporation du traceur dans les diverses protéines spécifiques du compartiment mais aussi un recyclage du traceur et des échanges entre les compartiments. L'extrapolation utilisée pour obtenir la radioactivité spécifique de la L-lysine- ^{14}C au temps 15 mn donne un résultat par défaut, et le temps de renouvellement obtenu est lui aussi plus faible pour cette raison.

Une des principales hypothèses utilisée dans le calcul des « turnover » suppose que le pool du précurseur soit homogène. Or GAN et JEFFAY (1967) ont montré par infusion continue (après obtention de l'état d'équilibre) que 50 p. 100 de la valeur du pool acides aminés libres intracellulaires du foie étaient dus au catabolisme protéique ; pour le muscle cette contribution est plus faible (30 p. 100 environ).

La détermination de la radioactivité spécifique du précurseur est le point le plus critiquable de ces méthodes de mesure de vitesse de biosynthèse ; en effet, il faudrait pouvoir connaître la radioactivité spécifique aux sites de synthèses c'est-à-dire au niveau des acides aminés liés aux ARN de transferts (REBOUD *et al.*, 1966).

2. — *Pénétration de la L-lysine- ^{14}C
dans les fractions libres des divers compartiments*

a) *Appareil digestif.*

La valeur élevée de la RAS de la L-lysine- ^{14}C libre de l'appareil digestif, est partiellement due à l'injection intrapéritonéale du précurseur. VANDERMEERS et VANDERMEERS-PIRET (1967) ont d'ailleurs montré que la RAS de la L-leucine- ^{14}C libre des tissus bordant la zone injectée (pancréas) est près de 5 fois plus élevée que celle du plasma carotidien 5 mn après l'injection intrapéritonéale et qu'il faut attendre 30 mn pour que la RAS de la L-leucine- ^{14}C libre intra pancréatique devienne voisine de celle du plasma.

La très rapide disparition de la L-lysine- ^{14}C libre de l'appareil digestif entre 30 et 60 mn après l'injection est liée au fait que les organes de ce compartiment (le pancréas en particulier) mobilisent très rapidement les acides aminés (REBOUD *et al.*, 1966).

De 60 à 120 mn l'augmentation de la taille du pool acides aminés libres traduit une phase de catabolisme intense, qui provoque un apport de lysine dans le pool. Ce phénomène est à rapprocher de la perte de radioactivité des protéines de l'appareil digestif entre les temps 120 et 240 mn après l'injection.

b) *Muscle.*

Les résultats sont à rapprocher de la propriété de la lysine qui peut s'accumuler sous forme libre dans les muscles (PAWLAK et PION, 1968).

On admet que dans le liquide extracellulaire, la concentration en lysine est identique à celle du plasma ; connaissant le volume extracellulaire dans le cas du muscle, nous pouvons calculer la valeur du contenu intracellulaire en cet acide aminé. Les valeurs de l'espace extracellulaire du muscle fournies par divers auteurs (KOBAYASHI et YONEMURO, 1967 ; BARRATT et WALSER, 1968) varient beaucoup (8 à 20 p. 100) en fonction des substances employées soit chimiques soit isotopiques.

Les calculs effectués en considérant soit la concentration en lysine, soit la radioactivité de la L-lysine- ^{14}C montrent que seulement 5 p. 100 de la lysine sont extracellulaires dans le muscle. Ce résultat est une valeur maximum car nous avons analysé la lysine totale du sang et non celle du plasma. La lysine s'accumule donc très fortement dans l'espace intracellulaire du muscle.

De 120 mn à 240 mn après l'injection cette réserve de lysine libre diminue plus rapidement que n'augmente la quantité de L-lysine- ^{14}C incorporée dans les protéines musculaires. Il est difficile de faire un bilan quantitatif car nos expériences ont été réalisées par une méthode d'abattage et il ne s'agit donc pas des mêmes animaux. Cependant, le muscle a stocké pendant près de deux heures une grande quantité de lysine libre qui est ensuite utilisée par d'autres compartiments de l'organisme (ARNAL et FAUCONNEAU, 1968). D'ailleurs, HENRIQUES et HENRIQUES (1954), chez le lapin ont trouvé en utilisant de la glycine ^{14}C que les échanges entre le plasma et le muscle étaient plus lents que dans le foie.

Il est difficile de relier la réserve de lysine libre musculaire à une action de l'insuline ; en effet cette hormone est connue notamment pour son influence sur l'augmentation de l'utilisation des acides aminés pour la synthèse protéique dans le muscle, mais alors qu'elle accroît l'incorporation de tous les acides aminés, l'augmentation de l'accumulation n'est trouvée que pour quelques acides aminés (MANCHESTER, 1970) dont la lysine est exclue.

c) Sang et Peau.

L'extrapolation des courbes de la figure 2 au temps zéro semble indiquer que, excepté le sang, elles possèdent un point commun. La décroissance de la RAS de la L-lysine- ^{14}C est d'autant plus rapide que la vitesse de synthèse des protéines du tissu est plus élevée ; la peau a des capacités d'anabolisme intermédiaire entre l'appareil digestif et le muscle.

3. — Incorporation de la L-lysine- ^{14}C libre dans les protéines, temps de renouvellement

a) Appareil digestif.

Les importantes fluctuations de la radioactivité incorporée dans les protéines de cet organe sont en faveur d'un rôle régulateur important du métabolisme protéique assuré par certaines protéines à turnover rapide (FAUCONNEAU et MICHEL, 1968). Toutefois la radioactivité totale prélevée par le compartiment doit être un peu surestimée par le fait qu'il a reçu du précurseur radioactif par voie transpéritonéale. Le temps de renouvellement obtenu pour l'ensemble des protéines de ce compartiment est de 25,5 heures. VANDERMEERS et VANDERMEERS-PIRET (1967) trouvent pour le pancréas un temps de renouvellement de 34 heures et pour le foie 24 heures alors que WATERLOW et STEPHEN (1968) trouvent 2,9 jours pour ce même organe. REBOUD *et al.* (1966) utilisant la valine en injection intraveineuse trouvent que des rats adultes mis au régime « glucidique » synthétisent près de 260 mg de protéines par gramme de pancréas soit environ le 1/10 de la quantité totale de protéine fabriquée par jour par l'appareil digestif vide tel que nous l'avons défini par ailleurs. Les résultats obtenus semblent donc être du même ordre de grandeur.

Deux cent quarante minutes après l'injection l'augmentation importante de la

radioactivité du contenu digestif (tabl. 4) peut être reliée à la forte radioactivité des fractions éthanolo-soluble, acido-soluble et insoluble du contenu digestif obtenue par COMBE et ARNAL (1967) 260 mn après l'injection intrapéritonéale d'un mélange d'acide glutamique et de lysine marqués à des rats axéniques et traditionnels ; 4 heures plus tard (au temps 480 mn après l'injection) la radioactivité momentanément élevée des contenus digestifs (4,2 p. 100 de la dose injectée) a disparu. Les protéines endogènes ainsi libérées ont pu, d'une part être utilisées par la flore intestinale et, d'autre part constituer un apport de lysine à l'organisme après leur digestion.

b) *Muscle*.

WATERLOW et STEPHEN (1968) l'ont étudié chez des rats recevant une infusion continue de L-lysine-¹⁴C (U) : le temps de renouvellement des protéines musculaires diminue légèrement avec l'âge et est toujours plus faible chez les mâles que chez les femelles. Pour des rats de 200 g ce temps de renouvellement est de 5,7 jours. A l'aide d'infusion de glycine-¹⁴C, GARLICK (1969) trouve une durée de renouvellement des mêmes tissus de 10 jours.

La valeur obtenue dans ce travail (7,5 jours) est en bon accord avec les résultats obtenus par infusion continue.

Selon HIDER et FERN (1969), les acides aminés libres extracellulaires sont utilisés préférentiellement pour la synthèse protéique dans le muscle, le pool intracellulaire jouant plutôt le rôle d'un réservoir de stockage des acides aminés qui sont ensuite redistribués dans la circulation générale. Si nous considérons comme nous l'avons fait au début de cette discussion que l'équilibre des acides aminés entre le plasma et l'espace extracellulaire du muscle est très rapide, le calcul de la vitesse de renouvellement des protéines musculaires peut être effectué en prenant comme valeur de l'intégrale moyenne de la RAS du précurseur, la valeur de la RAS du sang au point 15 mn. Dans ces conditions, le temps de renouvellement obtenu est de 10,9 jours, donc une valeur qui est très voisine de celle obtenue par GARLICK (1969) avec la glycine. Le calcul devrait être effectué, pour être plus précis, avec le plasma.

Les protéines musculaires comme celles de la peau, d'ailleurs, présentent plusieurs phases d'incorporation de la L-lysine-¹⁴C. Le gain de radioactivité de la masse musculaire totale (+ 8,4 p. 100 de la dose injectée) entre 240 et 480 mn semble être dû à des échanges de L-lysine-¹⁴C entre divers compartiments de l'organisme, car la réserve de L-lysine-¹⁴C libre intracellulaire de ce tissu a été utilisée par d'autres tissus entre 120 et 240 mn après l'injection.

c) *Sang*.

Le temps de renouvellement des protéines du sang (comparé aux autres tissus) est très élevé (9,1 jours). WATERLOW et STEPHEN (1968) pour les protéines du sérum de rat ont trouvé le temps de 2,9 jours. Le résultat obtenu peut s'expliquer par le fait que les hématies ont une durée de vie très élevée : 63 jours (LARVOR, 1969).

La durée de ce temps de renouvellement n'a qu'une signification approchée car d'une part, le pool protéique est très hétérogène (globule, plasma), et d'autre part, les protéines sont synthétisées dans des sites très différents de l'organisme (foie, rate, moelle osseuse)....

d) *Peau.*

Ce tissu apparaît chez le rat comme un organe très actif puisque le temps moyen de renouvellement obtenu est de 2,6 jours : ce résultat est à rapprocher de la mobilisation très rapide de ce tissu dans le cas de carence énergétique (DURAND et FAUCONNEAU, 1969).

e) *Quantité de protéines synthétisées.*

La vitesse de renouvellement de toutes les protéines du rat (à l'exclusion de celles de l'os) peut être obtenue à partir des compartiments étudiés, ceux-ci représentent seulement 78 p. 100 environ du poids vif. La quantité de protéines synthétisées est au minimum de 6,5 g/j soit 32 g/kg/j, ce résultat se rapproche plus de celui obtenu par WATERLOW et STEPHEN (1967) (25 à 30 g/kg/j) que de celui de SPRINSON et RITTENBERG (1949) (6,3 g/kg/j).

Le tableau 6 fait apparaître le très important pouvoir anabolisant de l'appareil digestif qui synthétise environ 17 fois plus de protéines qu'il n'en fixe apparemment alors que le muscle n'en fabrique que 2,9 fois plus, la peau est un organe très actif et régulateur puisque le rapport entre l'anabolisme réel et l'anabolisme apparent est de 12,5. En ne considérant que les organes et tissus étudiés (78 p. 100 du poids vif), nous trouvons que le rat synthétise au minimum 7 fois plus de protéines environ qu'il n'en fixe réellement.

Si nous rapportons pour chaque compartiment les quantités de protéines synthétisées par jour aux protéines totales, l'appareil digestif fabrique 90 p. 100 environ de son pool protéique alors que dans le cas du muscle cette valeur n'est que de 10 p. 100 et, dans le cas de la peau, de 40 p. 100.

CONCLUSION

Les résultats obtenus ont permis de préciser l'activité anabolisante de divers compartiments de l'organisme du rat en croissance.

La mise en évidence des échanges de lysine entre divers compartiments notamment avec l'appareil digestif, permet de comprendre comment des repas discontinus dans la journée assurent un anabolisme apparent relativement continu.

Dans le cas de carences variées, la méthode que nous venons de développer devrait permettre de préciser d'une part l'activité de chaque compartiment et d'autre part les rôles respectifs des organes régulateurs.

Reçu pour publication en janvier 1971.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement R. PION et J. PRUGNAUD pour les analyses radiochromatographiques des acides aminés.

SUMMARY

PROTEIN SYNTHESIS IN VIVO
MEASUREMENT OF ANABOLIC ACTIVITY OF DIFFERENT TISSUES
OF GROWING RATS BY MEANS OF L-LYSINE-¹⁴C (U)

The technique of isotope labelling with L-lysine-¹⁴C was used to estimate true anabolism in different tissues of growing rats.

Rats were fed to appetite on a balanced diet with 14 p. 100 crude protein ($N \times 6.25$). They gained 6 g daily. At 200 g bodyweight they were given 10 μ Ci L-lysine-¹⁴C by intraperitoneal injection and were killed at different intervals thereafter (table 2). They were dissected into 6 compartments: blood, muscles of the hind limbs, digestive tract, contents of digestive tract; skin, carcass, made up of skinned, eviscerated animal without hind limbs. Carbon dioxide and urine were collected. Radioactivity from L-lysine-¹⁴C was estimated in the free amino acid and protein fractions of each compartment.

During the first two hours after injection the muscle constituted a reserve of free L-lysine-¹⁴C; this reserve of lysine then disappeared during the next two hours to the benefit of the other compartments (table 4).

Muscle protein incorporated L-lysine-¹⁴C during about 8 hours (table 3).

The decrease in specific activity of free L-lysine-¹⁴C was the more rapid as the anabolic activity of the compartment was higher (fig. 2).

Radio-activity of the digestive tract contents reached the highest value 4 hours after injection (table 4).

The renewal time obtained for the different compartments were in ascending order: digestive tract 1.06 days, skin 2.6 days, muscle 7.5 days and blood 9.1 days (table 5).

The amount of protein synthesized (obtained by extrapolation) of the different compartments corresponding to 78 p. 100 of live weight, was 32 g per kg per day (table 6).

While true anabolism can be correctly estimated, it is very difficult to estimate true catabolism.

The demonstration of exchange of lysine between different compartments, notably the digestive tract, allows a better understanding of how discontinuous feeding during the day assures apparently continuous anabolism.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARNAL M., FAUCONNEAU G., PECH R., 1968. Étude de l'anabolisme protéique dans le tissu musculaire de rats en croissance à l'aide de la L-lysine ¹⁴C. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **267**, 1016-1019.
- ARNAL M., FAUCONNEAU G., PECH R., 1969. Étude de l'activité métabolique de divers tissus du rat en croissance à l'aide de la L-lysine ¹⁴C. *C. R. Soc. Biol.*, **163**, 393-397.
- ARNAL M., FAUCONNEAU G., PECH R., 1970. L-lysine C¹⁴ (U) incorporation in various tissues of the growing rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (sous presse).
- BARRATT T. M., WALSER M. 1968. Extracellular volume in skeletal muscle of the rat and dog: a comparison of radio sulfate and radiobromine spaces. *Clin. Sci.*, **35**, 525-536.
- BLACK A. L., KLEIBER M., 1958. The transfer of carbon from propionate to amino acids in intact cows. *J. Biol. chem.*, **232**, 203-209.
- COMBE E., ARNAL M., SACQUET E., 1967. Étude à l'aide d'acides aminés marqués de l'origine des composés azotés contenus dans le cæcum des rats axéniques. *C. R. Soc. Biol.*, **161**, 1076-1081.
- DULCINO J., BOSCO R., VERLY W. G., MAISIN J. R. 1963. Assay of tritium and Carbon 14 in animal tissues by liquid scintillation. *Clin. Chim. Acta.*, **8**, 58-65.
- DURAND G., FAUCONNEAU G., PÉNOT E. 1969. Répartition des cellules entre les tissus du rat adulte préalablement soumis à une sous-nutrition énergétique temporaire à deux stades de la croissance. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **9**, 55-73.
- FAUCONNEAU G., MICHEL M.-C., 1968. Rôle du tractus digestif dans la régulation du métabolisme protéique. In *Mammalian Protein Metabolism*. (Éd. H. N. Munro), vol. IV (sous presse).
- GARLICK P. J. 1969. Turnover rate of muscle protein measured by constant intravenous infusion of C¹⁴ glycine. *Nature*, **223**, 61-62.

- GAN J. C., JEFFAY H., 1967. Origins and metabolism of the intracellular pool of amino acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **148**, 448-459.
- HALL C. E., NASH J. B., HALL O., 1957. Erythrocyte survival and blood volume in the rat as determined by labeling the red cells with Cr⁵¹. *Amer. J. Physiol.*, **190**, 327-329.
- HENRIQUES O. B., HENRIQUES S. B., NEUBERGER A., 1954. Quantitative aspects of glycine metabolism in the rabbit. *Biochem. J.*, **60**, 409-424.
- HIDER R. C., FERN E. B., LONDON D. R., 1969. Relationship between intracellular amino-acids and protein synthesis in the extensor *digitorum longus* muscle of rats. *Biochem. J.*, **114**, 171-178.
- KOBAYASHI N., YONEMURO K., 1967. The extracellular space in red and white muscles of the rat. *Jap. J. Physiol.*, **17**, 698-707.
- LARVOR P., 1969. Durée de vie des érythrocytes chez le rat au cours de la carence en magnésium. *J. Méd. Besançon*, **5**, 386-387.
- MANCHESTER K. L., 1970. The control by insulin of amino acid accumulation in muscle. *Biochem. J.*, **117**, 457-465.
- MOORE S., SPACKMANN D. H., STEIN H. H., 1958. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Analyt. chem.*, **30**, 1185-1190.
- PATTERSON M. S., GREENE R. C., 1965. Measurement of low energy beta emitters in aqueous solution by liquid scintillation counting of emulsions. *Anal. Chem.*, **37**, 854-857.
- PAWLAK M., PION R., 1968. Influence de la supplémentation des protéines de blé par des doses croissantes de lysine sur la teneur en acides aminés libres du sang et du muscle du rat en croissance. *Ann-Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **8**, 517-530.
- REBOUD J.-P., MARCHIS-MOUREN G., PASERO L., COZZONE A., DESNUELLE P., 1966. Adaptation de la vitesse de biosynthèse de l'amylase pancréatique et du chymotrypsinogène à des régimes riches en amidon ou en protéines. *Biochim. Biophys. Acta*, **117**, 351-367.
- SCHIMKE R. T., 1964. The importance of both synthesis and degradation in the control of arginase levels in rat liver. *J. Biol. chem.*, **239**, 3808-3817.
- SCHOENHEIMER R., 1942. *The dynamic state of body constituents*. Harvard Univ. Press. Cambridge.
- SPRINSON D. B., RITTENBERG D., 1949. The rate of interaction of the amino acid of the diet with the tissue proteins. *J. Biol. Chem.*, **180**, 715-727.
- VANDERMEERS A., VANDERMEERS-PIRET M. C., CHRISTOPHE J., 1967. Synthèses protéiques *in vivo* dans le pancréas et le foie du rat normal, carencé en lysine et en thréonine ou récupérant de cette carence. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **49**, 759-778.
- WATERLOW J. C., STEPHEN J. M., 1966. Adaptation of the rat to a low protein diet the effect of a reduced protein intake on the pattern of incorporation of L-lysine-C¹⁴. *Br. J. Nutr.*, **20**, 461-484.
- WATERLOW J. C., STEPHEN J. M., 1967. The measurement of total lysine turnover in the rat by intravenous infusion of L-lysine-C¹⁴ (U). *Clin. Sci.*, **33**, 489-506.
- WATERLOW J. C., STEPHEN J. M., 1968. The effect of low protein diets on the turnover rates of serum, liver and muscle proteins in the rat, measured by continuous infusion of L-lysine-C¹⁴. *Clin. Sci.*, **35**, 287-305.