

## MÉTABOLISME DE LA THYMININE DANS LA GLANDE SÉRICIGÈNE DU VER A SOIE

I. — LES PRINCIPALES VOIES SUIVIES PAR LE PRÉCURSEUR  
DANS LA GLANDE INCUBÉE « IN VITRO »

J. DAILLIE

*Section de Biologie générale et appliquée,  
Laboratoire associé au C. N. R. S.,  
Faculté des Sciences de Lyon, 69 - Villeurbanne*

---

### SOMMAIRE

La glande séricigène (tube sécréteur) du Ver à soie est maintenue en survie, *in vitro*, pendant quelques heures. Dans ces conditions, on a analysé les principales voies du métabolisme de la thymidine radioactive dans l'organe.

1. Le nucléoside pénètre avec facilité dans les cellules glandulaires où il se transforme en nucléotides. Les processus cataboliques sont négligeables.

2. La quantité totale de nucléotides accumulée croît jusqu'à un maximum atteint après 30 minutes. Celui-ci se maintient durant encore 30 minutes au moins. Les nucléotides formés dans les cellules regagnent en partie le milieu d'incubation.

La glande séricigène contient, avant toute fourniture de thymidine, les kinases phosphorylatives nécessaires pour transformer la thymidine en TMP, TDP et TTP. La répartition de la radioactivité entre les divers thymidine-phosphates évolue de manière compliquée au cours de la première demi-heure.

3. Le précurseur s'incorpore dans l'ADN avec une vitesse constante. Ainsi le marquage de l'ADN ne paraît guère sensible ni aux fluctuations de la quantité de TTP, ni à l'augmentation de la quantité des nucléotides radioactifs.

Diverses hypothèses rendant compte de ces résultats sont examinées.

---

### INTRODUCTION

La glande séricigène du Ver à soie se caractérise par plusieurs traits originaux.

— Les cellules sécrétrices ne se divisent jamais et atteignent ainsi un grand développement. La forme plurilobée de leur noyau est singulière ; elle pourrait, selon

ALLEGRET (1956), assurer une surface d'échange optimum avec le cytoplasme.

— Dans deux régions distinctes, constituant chacune un tissu homogène, elle sécrète deux types de protéines définies (fibroïne et séricine) qui, associées, composent le fil de soie (LÉGAY, 1960).

C'est au cours du dernier stade larvaire que s'accomplit une synthèse massive de fibroïne et de séricine (FRAISSE, 1958 ; LÉGAY, 1960). La sécrétion est précédée d'une période liminaire pendant laquelle la glande produit sa propre matière, y compris les acides nucléiques (DAILLIE, 1965). Cette croissance peut se comprendre comme une multiplication des structures cellulaires qui assureront ensuite la synthèse des protéines soyeuses.

Grâce à ces caractéristiques, la glande séricigène offre un vaste champ de recherches dans le domaine de la physiologie cellulaire ; en particulier, les cellules de chacune des deux parties de l'organe, orientées vers la synthèse abondante d'une protéine définie, devraient permettre d'aborder, par une méthode de comparaison relativement simple, l'analyse expérimentale des mécanismes qui conduisent à la différenciation protéique.

Une théorie désormais classique attribuée à l'acide désoxyribonucléique (ADN) une position-clé dans la production des protéines spécifiques. Il transmettrait, par l'intermédiaire des acides ribonucléiques (ARN), l'information nécessaire aux structures de synthèse. La différenciation cellulaire, dans cette optique, se définirait comme l'expression limitée des informations détenues par la cellule.

Au sujet de la glande séricigène, cette théorie générale ne peut être considérée que comme une hypothèse de travail intéressante, qui suppose des vérifications, à de nombreux niveaux, des structures et des métabolismes concernés. Dans cet esprit, plusieurs études convergentes ont été effectuées ou sont en cours : structure et synthèse de l'ADN (DAILLIE, 1960 ; NIGON et coll., 1961 ; NEULAT, 1966), des ARN, des protéines, etc.

J'exposerai ici les résultats d'un ensemble d'études qui vise d'une part à créer une méthodologie générale applicable à ce matériel, d'autre part à utiliser ces méthodes pour préciser des aspects encore inconnus du métabolisme de l'ADN dans la glande séricigène.

L'emploi de précurseurs radioactifs, nécessaire pour détecter la synthèse d'ADN, implique qu'on est en mesure d'établir une correspondance entre la quantité de traceur incorporée et la quantité d'ADN produite. C'est tout le problème des rapports dynamiques et quantitatifs entre précurseurs endogènes et exogènes qui se trouve alors posé. En outre, dans un animal entier, le précurseur fourni est distribué entre les divers organes et les excréta. Aucun bilan précis ne peut être dressé de façon commode, d'où la nécessité de porter l'expérience sur l'organe explanté, maintenu en survie *in vitro*.

J'ai donc été conduit à poursuivre des études comparatives sur le matériel en survie et sur l'animal entier. J'ai analysé ainsi le métabolisme de la thymidine dans les glandes séricigènes depuis la pénétration du précurseur jusqu'à son incorporation dans l'ADN. Les résultats obtenus seront exposés dans une série de quatre publications. Ce premier article est consacré aux méthodes mises en œuvre et à l'étude des principales voies suivies par la thymidine dans la glande incubée *in vitro*.

## I. — MATÉRIEL, ET TECHNIQUES

A — *Matériel biologique*

J'ai constamment employé l'hybride des races européennes 200 et 300 qui offre une bonne stabilité de ses caractères physiologiques (LEGAY, 1955).

La température maintenue au cours du cinquième âge est de 21-22°C. Le nombre des repas distribués chaque jour est de quatre. Dans ces conditions, pour les élevages de printemps, la montée s'effectue à la fin du 9<sup>e</sup> jour. En été et en automne, la durée du développement tend à s'accroître et le poids atteint par les chenilles à se réduire. Ces variations s'accompagnent d'une plus grande hétérogénéité au sein de chaque lot (LEGAY, 1955; FRAISSE, 1958); dans certains cas, ces variations rendent délicate la comparaison de résultats obtenus à des périodes différentes de l'année.

Le travail porte exclusivement sur des glandes prélevées au cours du cinquième âge. Le stade physiologique étudié est défini par l'âge. Celui-ci est compté en jours à dater du premier repas qui suit la 4<sup>e</sup> mue.

La dissection s'effectue dans une solution physiologique identique au milieu utilisé pour l'incubation des glandes (cf. techniques d'incubation), moins l'extrait d'hémolymphe.

Seule la partie postérieure (tube sécréteur) de la glande est conservée. Ce choix permet d'expérimenter sur un tissu relativement homogène dont la sécrétion principale est la fibroïne. Il permet également d'éviter les désagréments qu'entraîne, lors du fractionnement, l'importante quantité de soie dont est gonflée la partie moyenne de la glande (ou réservoir).

B — *Techniques d'incubation*

La solution physiologique dans laquelle les glandes sont incubées à 30°C dérive des milieux élaborés par WYATT (1956) et JONES et CUNNINGHAM (1961). Elle contient, en mg pour 100 cm<sup>3</sup> d'eau distillée :

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	110
MgCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O .....	304
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O .....	370
KCl .....	298
Glucose .....	100
Fructose .....	50
CaCl <sub>2</sub> .....	81

Le pH est ajusté à 6,6 par la potasse.

Cette solution, additionnée (10 p. 100 en volume) d'hémolymphe chauffée à 60° et centrifugée (WYATT, 1956), est stérilisée sur filtre Millipore (0,45 μ).

Afin de réduire l'influence de la variabilité individuelle, les essais portent sur un ensemble de tubes sécréteurs provenant de plusieurs animaux (5 à 8). Les glandes sont recueillies rapidement, découpées en fragments de quelques millimètres, et lavées abondamment (avec la solution d'incubation dépourvue d'hémolymphe) sur filtre Millipore (5 μ); par découpage du filtre on obtient facilement 4 lots relativement homogènes.

L'incubation s'effectue sous agitation (80 cycles/minute) dans des fioles coniques de 25 ml contenant 2 ml de milieu.

La thymidine radioactive employée est marquée par le tritium sur le groupement méthyle (*New England Nuclear Corp.*; 6 700 mCi/mM).

A la fin de l'expérience, les tissus sont rapidement lavés (trois fois) dans quelques ml de la solution d'incubation (sans hémolymphe), puis aussitôt congelés dans la glace carbonique et conservés à — 20°C.

C — *Techniques d'analyse*1. *Le fractionnement.*

La méthode adoptée, simple et rapide, permettant la préparation de nombreux échantillons, dérive de la technique de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945). Elle comprend les étapes suivantes :

— homogénéisation dans l'alcool éthylique 95°, froid, suivie d'un lavage dans le même solvant. La centrifugation donne un surnageant, (= fraction « alcool »).

— extraction, à 0°C, par l'acide trichloracétique à 10 p. 100 (dans le cas où les nucléotides sont recherchés par chromatographie, l'acide perchlorique à 5 p. 100 remplace l'acide trichloracétique. Cette substitution permet d'éliminer l'acide sous forme de perchlorate de potassium et, ainsi, d'opérer la réduction des volumes en milieu neutre). La centrifugation donne une fraction acido-soluble.

— hydrolyse du culot par la potasse N/3 à 37°C (1 h 30).

— précipitation de l'ADN : la solution alcaline, maintenue au froid, est amenée à pH 1 par HCl et reçoit un volume d'éthanol absolu.

— hydrolyse du précipité (contenant l'ADN) par l'acide perchlorique à 5 p. 100 (80°C pendant 15 minutes).

On dispose ainsi de trois fractions radioactives :

a) la fraction « alcool » qui contient la thymidine et, éventuellement, des dérivés non phosphorylés de celle-ci (thymine entre autres).

b) la fraction trichloracétique « acido-soluble » où se trouvent les nucléotides thymidylques (TMP, TDP, TTP).

c) la fraction perchlorique (APC) qui renferme l'ADN hydrolysé.

## 2. Comptages et dosages : expression des résultats.

Les comptages sont effectués à l'aide d'un spectromètre à scintillation en phase liquide (Packard) dans la solution scintillante de FIELD et coll. (1961).

La quantité d'ADN contenue dans l'extrait APC est évaluée selon BURTON (1956).

La radioactivité des fractions solubles est rapportée au contenu des glandes en ADN. Une analyse comparative est ainsi possible. En raison des faibles quantités de thymidine ou de ses dérivés contenues naturellement par les cellules ou résultant de l'apport du précurseur radioactif, il est en effet impossible d'évaluer l'activité spécifique des composés autres que l'ADN.

La fraction délaissée après l'hydrolyse alcaline (ARN et protéines) ne contient qu'une radioactivité insignifiante comparée à celle des autres fractions.

Cette technique fournit donc un bilan relativement complet de la répartition de la radioactivité incorporée par les cellules séricigènes.

On n'ignore pas, cependant, qu'une perte de produits radioactifs intracellulaires risque de se produire au cours des lavages qui suivent l'incubation : en effet, si un lavage insuffisant est susceptible de ne pas éliminer la totalité des précurseurs non absorbés, on s'expose, par un lavage très poussé, à favoriser la diffusion d'une partie des constituants de l'organe.

## 3. Détermination des composés radioactifs contenus dans les trois fractions isolées.

Dans certaines expériences, les composés marqués contenus dans les fractions solubles sont séparés par chromatographie sur papier et leur radioactivité est ensuite déterminée selon la méthode de NUNEZ et JACQUEMIN (1961). Afin d'en faciliter l'identification, des substances témoins, non radioactives, sont déposées sur le papier en même temps que le produit à analyser.

Sur papier Whatman n° 1, avec le système acétate d'éthyle-eau-acide formique (FINK et coll., 1956), on détecte, dans le milieu d'incubation et la fraction « alcool », outre la thymidine, de la thymine et deux composés non identifiés. Ils dérivent de la thymidine par catabolisme (FINK et coll., 1956) ou par radiolyse (EVANS et STANFORD, 1963). Ils se rencontrent, en effet, dans certains échantillons de thymidine radioactive avant toute utilisation.

Les nucléotides (TMP, rTDP, TTP) contenus dans la fraction acidosoluble ou le milieu d'incubation sont séparés sur papier Whatman n° 1 dans le système EDTA-eau-isobutyrate d'ammonium (TAKATS et SMELLIE, 1963) ou, avec plus de facilité, sur papier Whatman DE 81 selon la technique de IVES et coll. (1963).

La chromatographie de l'extrait APC, après hydrolyse par l'acide formique 88 p. 100, m'a toujours montré que parmi les bases de l'ADN la radioactivité se trouve exclusivement liée à la thymine.

## 4. Mise en évidence des kinases phosphorylatives de la thymidine.

La technique employée est inspirée de BIANCHI et coll., (1961), BOLLUM et POTTER (1958-1959), KEIR et SMELLIE (1959), WEISSMAN et coll. (1960) et IVES et coll., (1963).

L'extrait actif est obtenu par une centrifugation à 105 000 g (1 heure) après broyage des glandes

séricigènes dans une solution aqueuse à pH 7,7 contenant :

250  $\mu\text{M}$ /ml de saccharose,  
150  $\mu\text{M}$ /ml de KCl,  
200  $\mu\text{M}$ /ml de *tris*-hydroxyméthyl-amino-méthane.

L'activité enzymatique de l'extrait est testée à 37°C de la manière suivante :

A 1 ml d'extrait cellulaire contenant environ 15 mg de protéines totales (dosage selon LOWRY et coll., 1951), on ajoute en quantité équimoléculaire (10  $\mu\text{M}$ ), 3-phospho-glycérate, ATP et  $\text{MgCl}_2$ , puis 25  $\mu\text{Ci}$  de thymidine tritiée. Le volume final est de 1,8 ml. A des intervalles de temps réguliers, on prélève 0,2 ml du mélange, la réaction étant bloquée par chauffage au bain-marie bouillant pendant 2 minutes.

La thymidine et les nucléotides formés sont séparés par chromatographie et leur radioactivité évaluée, comme il a été décrit précédemment.

## II. — DONNÉES PRÉLIMINAIRES SUR LA SURVIE DE LA GLANDE « IN VITRO »

Le milieu employé a une composition que l'on peut qualifier de minimale. Dans quelle mesure est-il capable d'assurer la survie des glandes explantées ou du moins de maintenir la structure et l'activité des cellules dans un état convenable? J'ai effectué, sur ce point, quelques vérifications avant d'entreprendre mes expériences.

Les critères choisis sont au nombre de quatre :

- persistance d'une structure nucléaire apparemment normale ;
- absence de dégradation de l'ADN ;
- conservation de l'aptitude à incorporer la thymidine dans l'ADN ;
- conservation des kinases phosphorylatives de la thymidine.

Les examens effectués apportent les informations suivantes :

1. Après fixation et coloration selon Feulgen, on constate que, dans des glandes incubées *plus de 6 heures*, il apparaît dans les noyaux des condensations de chromatine traduisant une altération de type pycnotique.

TABLEAU I

### *Conservation du marquage de l'ADN dans des glandes incubées*

Une injection de thymidine tritiée (5  $\mu\text{Ci}$ ) dans l'hémocoèle de chenilles est pratiquée 4 heures (expérience I) ou 24 heures (expérience II) avant l'expérience. Les glandes séricigènes sont prélevées au début du 4<sup>e</sup> jour du dernier stade larvaire. On réalise à partir de 6 paires de tubes sécréteurs 4 lots comparables ; l'un sert de témoin, les autres sont incubés respectivement 1, 2 et 4 heures.

Durée de l'incubation <i>in vitro</i> après marquage des glandes <i>in situ</i>		Témoin	1 heure	2 heures	4 heures
Radioactivité de l'ADN en dpm/ $\mu\text{g}$ (résultat moyen $\pm$ erreur standard)	Expérience I	178 $\pm$ 27	161 $\pm$ 28	168 $\pm$ 19	193 $\pm$ 25
	Expérience II	708 $\pm$ 48	663 $\pm$ 65	616 $\pm$ 84	640 $\pm$ 79

2. L'ADN des glandes, marqué *in vivo* 4 ou 24 heures avant le début de l'incubation, conserve son marquage pendant au moins 4 heures (tabl. 1).

3. Des glandes ayant subi une préincubation plus ou moins longue reçoivent pendant 30 minutes une même quantité de thymidine tritiée : le tableau 2 montre que, lorsque la préincubation se prolonge de 2 à 6 heures, l'incorporation qui s'effectue en une demi-heure tend plutôt à s'élever qu'à décroître ; c'est seulement après 8 heures qu'une dépression très nette se manifeste.

4. L'incubation des glandes semble provoquer une diminution de l'activité des enzymes responsables de la phosphorylation de la thymidine. Cependant, comme le

TABLEAU 2

*Incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN par demi-heure  
après des durées croissantes d'incubation sans thymidine*

A partir de 6 paires de sécréteurs (prélevés sur des chenilles au 4<sup>e</sup> jour) on prépare 4 lots homogènes. Avant d'ajouter le traceur, ils sont incubés respectivement 2, 4, 6 et 8 heures (4 répétitions).

Durée de l'incubation avant la fourniture de thymidine tritiée	2 heures	4 heures	6 heures	8 heures
Radioactivité de l'ADN en dpm/ $\mu$ g, 30 minutes après l'addition de 2 $\mu$ Ci de thymidine (résultat moyen $\pm$ erreur standard)	1 115 $\pm$ 25	1 208 $\pm$ 39	1 303 $\pm$ 114	771 $\pm$ 206

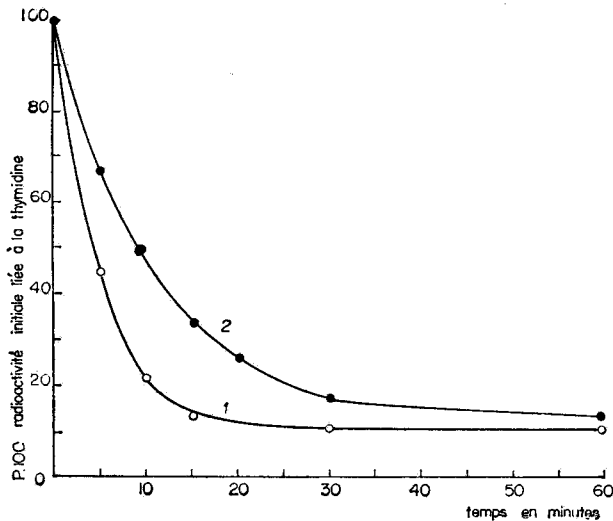


FIG. 1. — Disparition de la thymidine tritiée en présence d'extraits cellulaires  
Les extraits actifs sont préparés à partir de glandes fraîches (1)  
ou incubées pendant 3 h 30 (2). (cf. techniques).

montrent les résultats (fig. 1), des glandes incubées pendant près de 4 heures conservent une part encore importante de leurs kinases. Lorsque l'extrait enzymatique est préparé à partir de glandes fraîchement prélevées, on constate que 85 p. 100 de la thymidine fournie est phosphorylée en 15 minutes. Il faut 30 minutes pour obtenir le même résultat lorsque les glandes ont été incubées *in vitro* durant 3 h 30; par ailleurs, TTP et TDP sont légèrement plus abondants dans le premier cas que dans le second, ce qui laisse supposer que les TMP et TDP-kinases souffrent davantage des conditions de l'incubation que la thymidine-kinase.

Il est donc apparu que les glandes se maintiennent dans un état convenable et conservent les mécanismes qui assurent l'incorporation de la thymidine pendant environ 6 heures. D'autres travaux réalisés par la suite (DAILLIE et PRUDHOMME, 1965; PRUDHOMME, 1966) ont d'ailleurs confirmé, grâce à la comparaison de divers milieux, que celui que j'ai constamment utilisé entretient l'incorporation de la thymidine dans l'ADN avec une bonne stabilité. En limitant la durée des expériences à 2 heures, compte tenu d'une préincubation de 30 minutes toujours pratiquée, je m'assurais une sécurité satisfaisante. Dans quelques cas, seulement, j'ai dû prolonger l'incubation pendant près de 4 heures.

### III. — MÉTABOLISME DE LA THYMININE DANS LES GLANDES SÉRIGÈNES PRÉLEVÉES AU 4<sup>e</sup> JOUR DU CINQUIÈME AGE

#### A — *Dynamique générale du processus*

La figure 2 représente la cinétique de l'incorporation dans les trois fractions extraites. Les différentes expériences réalisées concordent et permettent de dégager les particularités suivantes :

1. La thymidine entrée est métabolisée à bref délai. En effet, la fraction « alcool » ne représente à chaque instant qu'une part minime (au plus 10 p. 100) de la radioactivité recueillie dans les glandes (fig. 2, courbe 1).

2. La phosphorylation du nucléoside se déroule de manière très active. La fraction acido-soluble (nucléotides) contient la plus grande partie de la radioactivité intracellulaire. Durant la première demi-heure, les nucléotides marqués s'accumulent dans un pool dont l'activité ne croît plus pendant au moins 30 minutes supplémentaires (fig. 2, courbe 3).

3. Une relative indépendance se manifeste entre la quantité des nucléotides accumulés et leur incorporation dans l'ADN. En effet, la radioactivité spécifique de l'acide nucléique croît comme une fonction linéaire du temps. En outre, elle reste pendant une heure inférieure à l'activité des nucléotides thymidyliques (fig. 2, courbe 2)

Ainsi, à partir de la thymidine fournie, les cellules glandulaires produisent, avec un rendement élevé, des nucléotides radioactifs. Ceux-ci s'incorporent dans l'ADN. La cinétique de cette incorporation révèle l'établissement de relations complexes

entre les précurseurs radioactifs et la synthèse de l'ADN. L'analyse de ces relations exigeait que soient examinées pas à pas les voies métaboliques dans lesquelles la thymidine se trouve engagée.

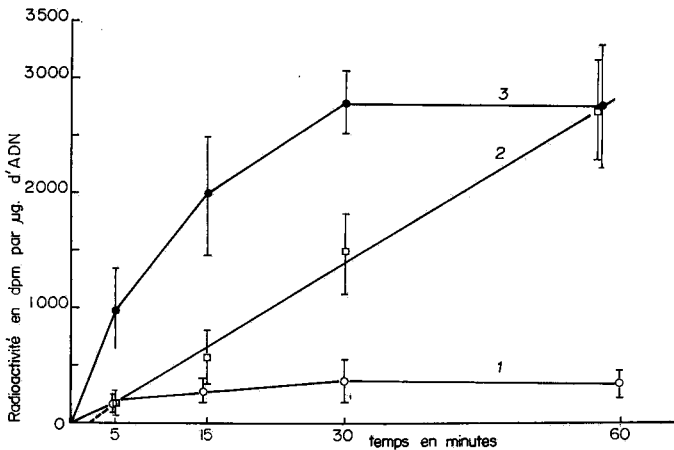


FIG. 2. — Cinétique de l'incorporation de la thymidine-3H au 4<sup>e</sup> jour

A partir de 6 paires de tubes sécréteurs, on prépare 4 lots (360 µg d'ADN par lot). Ces lots sont incubés respectivement 5, 15, 30 et 60 minutes en présence de thymidine méthyle tritiée (3 µCi). L'expérience est répétée 4 fois. (Résultats moyens accompagnés de leur intervalle de confiance pour un risque de 5 p. 100).

Courbe 1 : fraction « alcool » ;  
 Courbe 2 : ADN ;  
 Courbe 3 : acido-soluble.

## B — Les composés radioactifs contenus dans les fractions solubles et dans le milieu d'incubation

### I. La fraction acido-soluble : étude de la phosphorylation de la thymidine.

Par analyse radiochromatographique de la fraction acido-soluble, j'ai cherché à préciser l'évolution des dérivés phosphorylés de la thymidine dans les glandes en incubation. Trois séries d'expériences m'ont permis de couvrir une durée d'incubation de 90 minutes après l'addition du traceur (tabl. 3).

a) Dans une première expérience (tabl. 3, I), j'ai suivi le déroulement de la phosphorylation pendant 20 minutes. Dès les premières minutes, plus de 80 p. 100 de la thymidine phosphorylée se trouvent à l'état de di- et tri-phosphates.

Mais la situation évolue de manière curieuse : tandis que la radioactivité acido-soluble totale continue à s'élever, la quantité de TTP se stabilise puis décroît. Parallèlement, la vitesse à laquelle s'accumule le TDP reste à peu près régulière pendant 20 minutes, et la proportion de la radioactivité liée au TMP s'élève lorsque le TTP atteint son plus faible niveau.

b) Un second essai (tabl. 3, II) confirme les observations précédentes, et précise, en outre, qu'entre 15 et 30 minutes, la synthèse du TTP reprend à nouveau, de sorte que l'on note un fléchissement dans l'accumulation du TDP et surtout du TMP.

c) Au-delà de 30 minutes (tabl. 3, III) la répartition de la radioactivité entre les trois nucléotides tend à se stabiliser.



TABLEAU 3

*Cinétique des nucléotides marqués dans les glandes (4<sup>e</sup> jour) incubées en présence de thymidine tritiée*

Des lots homogènes sont constitués à partir de 6 à 8 paires de tubes sécréteurs et incubés, pendant les temps indiqués, avec la thymidine tritiée.

Exp. I : 10  $\mu$ Ci de thymidine, 180  $\mu$ g d'ADN par lot

Exp. II et III : 2,5  $\mu$ Ci ; 200 et 220  $\mu$ g d'ADN par lot

La part de la radioactivité contenue dans la fraction acido-soluble revenant à chacun des nucléotides est évaluée après chromatographie sur papier (cf. Techniques).

	Temps écoulé après l'addition de thymidine (minutes)	Radioactivité de l'acido-soluble (dpm/ $\mu$ g d'ADN)	Radioactivité de chacun des nucléotides		
			TMP	TDP	TTP
Exp. I	5	4 658	792	1 677	2 189
	10	7 496	1 274	2 848	3 373
	15	9 306	1 675	4 281	3 350
	20	11 652	3 496	5 243	2 913
Exp. II	5	1 360	163	462	735
	15	2 549	612	1 351	586
	30	3 579	429	1 503	1 647
Exp. III	15	2 952	502	1 594	856
	30	4 160	333	2 413	1 414
	60	3 657	439	1 975	1 243
	90	3 887	466	2 177	1 244

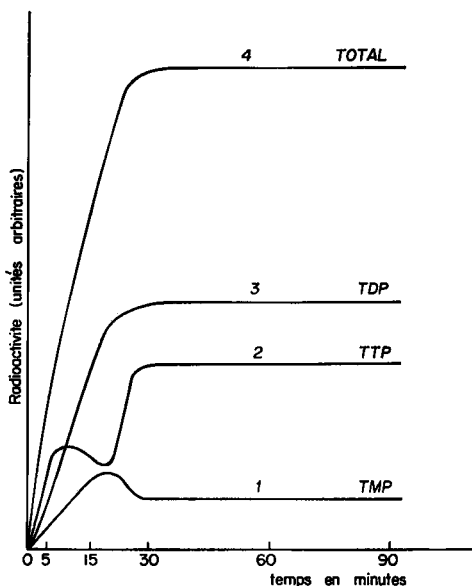


FIG. 3. — Évolution de la radioactivité liée au TMP, au TDP et au TTP, après la fourniture de thymidine tritiée à des glandes séricigères incubées (courbes moyennes tracées à partir des résultats du tableau 3)

En définitive, la figure 3, tracée en utilisant ces trois groupes de données, fournit une première approximation de la cinétique, dans le contenu cellulaire, du TMP, du TDP et du TTP radioactifs formés à partir de la thymidine fournie.

### 2. Les composés radioactifs solubles dans l'alcool

La radioactivité de la fraction « alcool » étant faible, il s'est avéré impossible de faire une estimation chiffrée de la part du marquage qui revient à chacun des constituants isolés : thymidine, thymine et les deux composés non identifiés (cf. Techniques).

### 3. Les composés radioactifs du milieu

Le tableau 4 résume les résultats des analyses entreprises pour déterminer la nature et la proportion des divers produits marqués présents dans le milieu d'incubation. Dans cette expérience, la moitié de la radioactivité totale introduite disparaît du milieu en 60 minutes. Dans le même laps de temps, les nucléotides qui regagnent le milieu représentent environ 15 p. 100 de la radioactivité initiale. On en conclura :

- a) que la thymidine subit une métabolisation rapide (plus de 80 p. 100 en une heure).
- b) que le milieu se charge de nucléotides (rencontrés surtout comme TMP) principalement pendant la première demi-heure.
- c) que la voie catabolique de la thymidine se situe à un niveau très faible puisque :  
— le précurseur fourni renferme déjà dans ce cas 5 p. 100 d'impuretés (tabl. 4),

TABLEAU 4

*Répartition de la radioactivité entre les différents composés marqués, dans le milieu, en cours d'incubation*

4 lots homogènes de tubes sécréteurs prélevés au 4<sup>e</sup> jour (220 µg d'ADN par lot) sont incubés 15, 30, 60 ou 90 minutes après addition de thymidine tritiée (2,5 µCi). Le milieu d'incubation est conservé et on procède à son analyse, sur des aliquotes, par radiochromatographie (cf. Techniques). La moitié de la radioactivité fournie disparaît du milieu en une heure.

	Analyse de la thymidine employée	Distribution (%) de la radioactivité subsistant dans le milieu après			
		15 minutes	30 minutes	60 minutes	90 minutes
Thymidine .....	95	7	65	32	32
Nucléotides.....	—	14	25	38	36
Thymine et dérivés ....	5	12	10	30	32

— la fraction « alcool », qui contient les produits du catabolisme cellulaire, présente toujours une radioactivité réduite (fig. 2).

J'ai procédé à quelques essais afin de déterminer si le milieu d'incubation est

capable d'assurer la phosphorylation de la thymidine. Pour ce faire, j'ai comparé l'effet du milieu « neuf » et celui du milieu ayant contenu des glandes. Une première expérience m'a montré que la thymidine ne subit aucune transformation lorsqu'elle est mise en contact avec le milieu « neuf ». Dans un second essai, j'ai ajouté le nucléoside à du milieu dans lequel des glandes ont séjourné durant 30 minutes, dans des conditions habituelles. Après une incubation supplémentaire d'une heure avec la thymidine, j'ai constaté que ce milieu :

- ne contient pas de thymine nouvellement formée,
- renferme une quantité de TMP qui représente 2 à 3 p. 100 de la quantité de thymidine fournie.

Bien qu'un doute puisse subsister, il semble que la majeure partie de la thymidine soit métabolisée à l'intérieur des cellules. Une fraction des nucléotides formés regagnerait ensuite le milieu.

#### IV. — DISCUSSION

La plupart des observations que nous venons de rapporter soulèvent des problèmes plus ou moins difficiles qui seront discutés successivement.

##### A — *Les processus cataboliques*

Je n'ai pu démontrer, de façon certaine, l'existence d'une activité catabolique notable vis-à-vis de la thymidine. La glande séricigène incubée *in vitro* se distinguerait donc de la plupart des cellules et tissus étudiés.

En effet, divers auteurs ont constaté que la thymidine administrée à des cellules en cultures se transforme rapidement en thymine. Notamment JACQUEZ (1962), avec des cellules de Mammifères, HOLLDFORD et RIEGE (1964) avec des bactéries, observent l'apparition de thymine, en proportion élevée, dans le milieu d'incubation. Ils attribuent cette dégradation à l'activité, dans les cellules, de la thymidine phosphorylase.

Par ailleurs, la formation d'autres composés, dérivant de la thymine par oxydation ou réduction, a été démontrée par FINK et coll. (1956), EVANS et AXELROD (1961), TAKATS et SMELLE (1963). La possibilité, pour ces composés, d'être à l'origine de marquages parasites est envisagée par plusieurs auteurs ; TAKATS et SMELLE, 1963 ; GIRGIS et VIEUCHANGE, 1964 ; MILTON et COOPER, 1964 ; BRYANT, 1966.

##### B — *Les échanges entre milieu et cellules*

La perméabilité des parois cellulaires vis-à-vis de la thymidine est très élevée. D'autres résultats, apportés dans un prochain article (DAILLIE, 1967, *b*) préciseront les facteurs qui règlent la pénétration de la thymidine. Remarquons dès à présent que si un équilibre s'établit de part et d'autre de la membrane cellulaire, il se trouvera immédiatement déplacé en faveur de l'entrée en raison de la phosphorylation du nucléoside et du transfert d'une partie des nucléotides vers le milieu d'incubation.

La sortie des nucléotides, à ma connaissance, n'a jamais été mentionnée. Il paraît vraisemblable que, dans les glandes séricigènes explantées, ce rejet traduise une altération des propriétés de la membrane cellulaire. Il apparaît alors comme la conséquence d'un ajustement imparfait de la composition du milieu d'incubation.

### C — La phosphorylation

La thymidine, mise en présence d'une fraction cellulaire préparée à partir de glandes fraîchement prélevées ou incubées au préalable, est rapidement transformée en thymidine mono-, di- et triphosphate (fig. 1). Les cellules sécrétrices, avant toute addition de nucléoside, possèdent donc l'équipement enzymatique nécessaire à ces transformations.

Dans les glandes incubées, les étapes ultimes de la phosphorylation (TDP, TTP) sont atteintes en l'espace de 5 minutes. On admet généralement que la thymidine parvient à l'état de triphosphate en passant par le mono- puis le di-phosphate (WEISSMAN et coll., 1960 ; SMELLIE, 1963 ; CANELLAKIS, 1962) grâce à l'intervention des trois kinases correspondantes (GRAV et SMELLIE, 1965).

L'apparition très rapide du TTP aussi bien dans les glandes incubées qu'en milieu acellulaire ne va pas, semble-t-il, à l'encontre de cette opinion. Elle indique simplement que la succession des réactions est très rapide. Du reste, l'analyse des résultats publiés sur cette question montre que, s'il est des cas où di- et triphosphates sont en plus faible quantité que le TMP (POTTER et NYGAARD, 1963), le TTP domine le plus souvent, dès les premières minutes (BIANCHI et coll., 1961 ; BROOKES et WILLIAMS, 1965 ; BROOKES, 1966 ; CLEAVER et HOLFORD, 1965).

L'équilibre des réactions enzymatiques se modifie au cours de l'incubation. En effet, bien que la quantité totale des nucléotides continue à s'élever, la proportion relative de TTP varie de façon sensible au cours de l'incubation. Le TDP ne subit que faiblement le contrecoup de ces fluctuations tandis que le TMP les accuse plus nettement. Tout se passe comme si, après cinq ou dix minutes, la phosphorylation, qui se développait jusque-là en faveur du TDP et du TTP, se trouvait bloquée aux étapes inférieures. Peut-être même une partie du triphosphate précédemment formé est-elle reconvertie en TDP, puis en TMP. Au cours du second quart d'heure d'incubation, la production de TTP reprend jusqu'à l'équilibre du pool acido-soluble qui paraît s'établir vers 30 minutes.

Il devient classique, en présence de processus analogues, de faire intervenir une régulation par *feed-back*. Dans ce cas particulier, un rétro-contrôle paraît difficile à envisager dans la mesure où le second maximum atteint est supérieur au premier. D'autre part, si de nombreux auteurs (MALEY et MALEY, 1962 ; BREITMAN, 1963 ; IVES et coll., 1963 ; DELAMORE et PRUSOFF, 1964 ; POTTER, 1963) ont démontré que, dans diverses cellules, le TTP contrôle par *feed-back* sa propre production, c'est en inhibant l'activité de la thymidine-kinase. Or, de toute évidence, la phosphorylation de la thymidine se poursuit au moment où l'on note un blocage de la synthèse de TTP.

### D — Le marquage de l'ADN

La vitesse à laquelle le précurseur atteint l'ADN n'est modifiée ni par l'accumulation des nucléotides marqués pendant la première phase de l'expérience, ni par les variations de niveau du TTP.

Nous supposons que les précurseurs marqués entrent en compétition avec les précurseurs endogènes de même nature. Dans ce cas, l'activité spécifique de l'ensemble des précurseurs disponibles ( $y$ ) est donnée par la relation

$$y = \frac{xr}{a + x}$$

dans laquelle  $x$  est la quantité, mêlée au pool endogène, de précurseurs exogènes d'activité spécifique  $r$ , et  $a$  la taille du pool endogène.

Il est clair que lorsque  $x$  croît,  $y$  va augmenter, en fonction de  $x$ , soit de façon linéaire si  $(a + x)$  est constant, soit vers l'asymptote  $r$  si  $a$  est constant.

Reportons-nous à la figure 2. Si les précurseurs endogènes et exogènes se trouvent mêlés de manière simple, et si la synthèse d'ADN s'opère de façon constante dans le temps, l'acide nucléique devrait se marquer avec une vitesse croissante tant que la radioactivité de l'acido-soluble n'a pas atteint son maximum. Or, la vitesse d'incorporation est constante. Cette observation peut s'expliquer de deux manières différentes au moins :

- ou bien,  $x$  est d'emblée très grand par rapport à  $a$  ;
- ou bien, une fraction seulement de l'acido-soluble cellulaire forme le pool d'utilisation.

Nous nous trouvons ainsi devant deux catégories d'hypothèses. Dans l'une, les précurseurs radioactifs saturent le pool endogène. Dans l'autre, le pool endogène ne peut être négligé par rapport aux quantités de nucléotides marqués accumulés dans les glandes. Dans le premier cas, les précurseurs radioactifs incorporés dans l'ADN représenteraient à eux seuls toute la synthèse d'ADN. Étant donné les niveaux d'incorporation, cette synthèse, dans les glandes incubées, serait insignifiante : en effet, la quantité de thymidine radioactive incorporée dans l'ADN en une heure (fig. 2) représente une synthèse de 0,02 p. 100 de l'ADN total ; *in situ*, pour des animaux du même âge, cette synthèse horaire avoisine 1 p. 100. Il faudrait en conclure que les conditions d'incubation assurent aux organes une survie des plus sommaire.

Dans la seconde hypothèse, la synthèse d'ADN n'est pas nécessairement faible. Cependant, cette hypothèse implique que les précurseurs exogènes n'entrent pas en rapport simple avec les précurseurs naturels. Elle conduit à supposer l'existence, au sein du pool radioactif, d'un système d'échanges comprenant au moins deux compartiments, chargés à des vitesses différentes. Dans ce cadre, les modifications des équilibres réactionnels au niveau de la phosphorylation apparaîtront comme une résultante de cette cinétique complexe.

L'impossibilité momentanée d'effectuer un choix entre ces hypothèses repose essentiellement sur notre ignorance de la grandeur du pool endogène, dont la mesure reste pour l'instant hors des possibilités techniques (BRUNEL, 1965).

Nous verrons, dans la seconde partie de ce travail (DAILLIE, 1967, b), comment de nouvelles expériences apportent des arguments en faveur de la seconde hypothèse.

## SUMMARY

## THYMIDINE METABOLISM IN THE SILK GLAND OF THE SILKWORM

## I. THE MAIN PATHWAYS OF THE PRECURSOR IN THE « IN VITRO » INCUBATED GLAND

The silk gland (secretory tube) of the silkworm was incubated *in vitro* for a few hours. Under these experimental conditions, the metabolic pathways of radioactive thymidine were analyzed in the gland.

1. The nucleoside easily penetrates into the glandular cells where it converts to nucleotides. Catabolic reactions are negligible.

2. The total amount of nucleotides increases to a maximum reached within 30 minutes and maintained for at least 30 minutes. The nucleotides formed in the cells partly turn back to the incubation medium.

The silk gland contains, previous to the incorporation of thymidine, the phosphorylating kinases required to convert thymidine, to TMP, TDP and TTP. The evolution of the distribution of radioactivity between these thymidine-phosphates is rather intricate during the first half-hour.

3. The precursor incorporates into DNA at constant speed thus, the DNA labelling seems insensitive either to variations of the amount of TTP, or to the increase in the amount of radioactive nucleotides.

Various interpretations of these findings are discussed.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLEGRET P., 1956. Étude des glandes séricigènes des larves de Lépidoptères. Leur rôle dans la physiologie du développement. *Ann. Inst. Nat. Agr.*, **62**, 1-345.
- BIANCHI P. A., BUTLER J. A. V., CRATHORN A. R., SHOOTER K. V., 1961. The thymidine phosphorylating kinases. *Biochim. Biophys. Acta*, **53**, 123.
- BOLLUM F. J., POTTER Van R., 1958. Incorporation of thymidine into deoxyribonucleic acid by enzymes from Rat tissues. *J. Biol. Chem.*, **233**, 478.
- BOLLUM F. J., POTTER Van R., 1959. Nucleic acid metabolism in regenerating Rat liver. VI. Soluble enzymes which convert thymidine to thymidine phosphates and DNA. *Cancer Research*, **39**, 561.
- BREITMAN T. R., 1963. The feedback inhibition of thymidine kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 153-155.
- BROOKES V. J., 1966. Thymidine kinase and thymidylate kinase in the Silkworm *Antheraea pernyi*. *Biochim. Biophys. Acta*, **339**, 268-276.
- BROOKES V. J., WILLIAMS C. M., 1965. Thymidine kinase and thymidylate kinase in relation to the endocrin control of insect diapause and development. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **53**, 770-777.
- BRUNEL C., 1965. *Analyse de quelques dérivés puriques et pyrimidiques acido-solubles dans les glandes séricigènes chez Bombyx mori*. Thèse, 3<sup>e</sup> Cycle, Lyon.
- BRYANT B. J., 1966. The incorporation of tritium from thymidine into proteins of the Mouse. *J. Cell. Biol.*, **20**, 29-36.
- BURTON K., 1956. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimations of DNA. *Biochem. J.*, **62**, 315-322.
- CANELLAKIS E. S., 1962. Metabolism of nucleic acids. *Ann. Rev. Biochem.*, **31**, 271-300.
- CLEAVER J. E., HOLFORD R. M., 1965. Investigations into the incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine into DNA in *L.* strain cells and the formation of a pool of phosphorylated derivatives during pulse labelling. *Biochim. Biophys. Acta*, **103**, 654-672.
- DAILLIE J., 1960. Incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN des glandes séricigènes chez le Ver à soie. *C. R. Acad. Sci.*, **250**, 3053-3054.
- DAILLIE J., 1965. Croissance cellulaire et sécrétion de la soie dans la glande séricigène chez le Ver à soie au dernier stade larvaire. *C. R. Acad. Sci.*, **261**, 4872-4875.
- DAILLIE J., 1967 *b*. Métabolisme de la thymidine dans la glande séricigène du Ver à soie. II. Utilisation des nucléotides radioactifs pour la synthèse d'ADN dans la glande incubée *in vitro* au 4<sup>e</sup> jour du 5<sup>e</sup> âge. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* (sous presse).

- DAILLIE J., PRUDHOMME J. C., 1965. Survie de la glande séricigène du Ver à soie *in vitro*. *Ann. Nut. Alim.*, **20**, 353-360.
- DELAMORE I. W., PRUSOFF W. H., 1964. Effect of deoxycytidine on the rate of biosynthesis of phosphorylated derivatives of thymidine. *Biochim. Biophys. Acta*, **80**, 220-229.
- EVANS W. R., AXELROD B., 1961. Pyrimidine metabolim in germinating seedlings. *Plant Physiol.*, **36**, 9-13.
- EVANS E. A., STANFORD F. G., 1963. Stability of thymidine labelled with tritium or C<sup>14</sup>. *Nature*, **199**, 762.
- FIELD E. O., KRISS J. P., TUNG L. A., 1961. Turnover of thymidine in the DNA of marrow and intestinal mucosa in Mice and its response to administration of 5-fluorouracil. *Cancer Res.*, **21**, 2-8.
- FINK K., CLINE R. E., HENDERSON R. B., FINK R. M., 1956. Metabolism of thymine methyl C<sup>14</sup> or 2-C<sup>14</sup> by rat liver *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **221**, 425.
- FRAISSE R., 1958. *Alimentation et croissance de la larve chez Bombyx mori*. Thèse, Lyon.
- GIRGIS A., VIEUCHANGE J., 1964. Incorporation de thymidine radioactive dans des cellules de mammifère cultivées *in vitro*. *Ann. Inst. Pasteur*, **106**, 29-47.
- GRAV H. J., SMELLIE R. M. S., 1965. Fractionation of thymidine phosphokinase, thymidine 5-monophosphate phosphokinase and thymidine 5-diphosphate phosphokinase in extracts of Landschutz ascites-tumour cells. *Biochem. J.*, **95**, 518-524.
- HOLLDORF A., RIEGE E., 1964. Réactions métaboliques de la thymidine chez *Escherichia coli*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **46**, 187.
- IVES D. H., MORSE P. A., POTTER V. R., 1963. Feedback inhibition of thymidine kinase by thymidine triphosphate. *J. Biol. Chem.*, **238**, 1467-1474.
- JACQUEZ J. A., 1962. Transport and enzymic splitting of pyrimidine nucleosides in Ehrlich cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 265-277.
- JONES B. M., CUNNINGHAM I., 1961. Growth by cell division in insect tissue culture. *Exptl. Cell Res.*, **23**, 386.
- KEIR H. M., SMELLIE R. M. S., 1959. Studies on the biosynthesis of DNA in extracts of mammalian cells. II. The enzymic formation of deoxyribonucleoside triphosphates. *Biochim. Biophys. Acta*, **35**, 405.
- LEGAY J.-M., 1955. *La prise de nourriture chez le Ver à soie*. Thèse. I.N.R.A. Éd. 1957.
- LEGAY J.-M., 1960. *Physiologie du Ver à soie*. I.N.R.A. Éd., 1960.
- LOWRY C. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
- MALEY F., MALEY G. F., 1962. On the nature of a sparing effect by thymidine on the utilization of deoxycytidine. *Biochemistry*, **1**, 847-851.
- MILTON J. D., COOPER E. H., 1964. Metabolism of thymidine and deoxycytidine 5'-monophosphate by leucocytes *in vitro*. *Biochem. J.*, **93**, 14.
- NEULAT M. M., 1966. Caractérisation de l'acide désoxyribonucléique des glandes séricigènes du *Bombyx mori* L. *Biochim. Biophys. Acta*, **115**, 95-99.
- NIGON V., LEGAY J.-M., NONNENMACHER J., 1961. L'incorporation de thymidine tritiée dans les glandes séricigènes de *Bombyx mori*. *Bull. Biol. Fr. et Belg.*, **95**, 128-133.
- NUNEZ J., JACQUEMIN Cl., 1961. Comptage de radiochromatogrammes par scintillation liquide. *J. Chromatogr.*, **5**, 271-272.
- POTTER Van R., 1963. Feedback inhibition of thymidine kinase by thymidine triphosphate. *Exptl. Cell Res.*, suppl., **9**, 259-261.
- POTTER R. L., NYGAARD O. F., 1963. The conversion of thymidine to thymine nucleotides and deoxyribonucleic acid *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **238**, 2150.
- PRUDHOMME J. C., 1966. *Contribution à l'étude du métabolisme des glandes séricigènes de Bombyx mori, incubées in vitro*. Thèse 3<sup>e</sup> Cycle, Lyon.
- SCHMIDT C., THANNHAUSER S. J., 1945. A method for the determination of DNA, RNA and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **161**, 83.
- SMELLIE R. M. S., 1963. Some studies on the enzymes of DNA biosynthesis. *Exptl. Cell Res.*, suppl., **2**, 245-258.
- TAKATS S. T., SMELLIE R. M. S., 1963. Thymidine degradation products in plant tissues labelled with tritiated thymidine. *J. Cell. Biol.*, **17**, 59.
- WEISSMAN S. M., SMELLIE R. M. S., PAUL J., 1960. Studies on the biosynthesis of deoxyribonucleic acid by extracts of mammalian cells. IV. The phosphorylation of thymidine. *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 101-110.
- WYATT S. S., 1956. Culture *in vitro* of tissue from silkworm *Bombyx mori* L. *J. Gen. Physiol.*, **39**, 841.