

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

II. — UTILISATION DES NUCLÉOTIDES RADIOACTIFS
POUR LA SYNTHÈSE DE L'ADN DANS LA GLANDE INCUBÉE « IN VITRO »
AU 4^e JOUR DU 5^e STADE

J. DAILLIE

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

SOMMAIRE

1. Une partie des nucléotides thymidyliques marqués accumulés dans les glandes séricigènes incubées *in vitro* s'échange facilement avec le milieu d'incubation. L'utilisation relative des nucléotides subit une diminution marquée dans les premières minutes de l'incubation en présence de thymidine radioactive. Cependant le marquage de l'ADN s'effectue à vitesse constante. Ces faits suggèrent qu'une partie seulement des précurseurs, après phosphorylation, est directement disponible pour la synthèse d'ADN. La radioactivité de ce compartiment actif atteindrait en quelques minutes un niveau élevé, maintenu ensuite à peu près stable.

2. La quantité de thymidine présente dans le milieu au début de l'expérience retentit sur la taille du pool radioactif et sur sa participation à la synthèse d'ADN, ce qui conduit à admettre que le compartiment actif entre en compétition avec les précurseurs endogènes.

3. La synthèse horaire d'ADN qui se produit dans l'organe explanté est comprise entre 0,20 et 0,40 p. 100 de son contenu en acide nucléique, c'est-à-dire entre 1/5 et 1/3 de la quantité d'ADN produit *in situ*. Le pool endogène permanent représente environ la quantité de nucléotides nécessaire pour assurer la synthèse d'ADN pendant une demi-heure.

Différents modèles capables de rendre compte des échanges entre les compartiments sont discutés.

INTRODUCTION

Dans la première partie de ce travail (DAILLIE, 1967 a), j'ai montré qu'*in vitro* la thymidine radioactive pénètre avec facilité dans les glandes séricigènes (tube sécréteur) prélevées au 4^e jour du dernier stade larvaire. Le nucléoside se transforme en TMP, TDP et TTP et, à un bien moindre degré, en thymine et dérivés de celle-ci. C'est seulement 30 minutes après l'addition du précurseur dans le milieu d'incubation qu'un équilibre paraît s'établir au sein de la fraction acido-soluble. Au cours de la

période précédente, on observe d'importantes fluctuations dans la répartition de la radioactivité entre les différents nucléotides thymidyliques. Ces variations touchent notamment le TTP, précurseur direct de l'ADN. Pourtant, dès le début de l'expérience, l'acide nucléique incorpore la thymidine exogène à un taux régulier.

Le marquage de l'ADN se révèle donc, dans une large mesure, indépendant aussi bien de l'accroissement du pool radioactif dans son ensemble, que des fluctuations qui touchent ses constituants.

Cette dynamique de l'incorporation, assez inattendue, s'explique différemment selon l'importance attribuée au pool des précurseurs naturels. J'ai retenu deux hypothèses possibles :

1. Si les précurseurs endogènes se trouvent à un niveau négligeable par rapport à la quantité de nucléotides radioactifs produits, ceux-ci sont rapidement en excès pour la synthèse d'ADN. Le marquage de ce dernier refléterait alors une synthèse régulière d'ADN. Étant donné les quantités incorporées, il faudrait en conclure que la production d'ADN dans les glandes incubées est insignifiante.

2. Si au contraire la quantité des précurseurs endogènes n'est pas très faible, c'est qu'une partie seulement du pool radioactif se mêle, très rapidement et à un niveau qui se maintient ensuite stable, au pool endogène. Dans ce cas, bien entendu, la synthèse d'ADN dans les glandes *in vitro* n'est pas nécessairement très faible.

Les résultats exposés précédemment ne permettaient pas de choisir l'une de ces explications. J'ai donc entrepris une analyse expérimentale complémentaire dont l'exposé et l'interprétation des résultats font l'objet du présent article.

Pour la clarté de l'exposé, il est utile d'annoncer dès à présent certains résultats :

1. Les modalités de l'utilisation sont compatibles avec la seconde hypothèse. L'ADN puiserait dans un compartiment actif tandis que le reste des nucléotides constituerait un compartiment de réserve échangeable avec le milieu d'incubation.

2. Il s'avère que l'incorporation dans l'ADN du précurseur exogène dépend de sa concentration dans le milieu d'incubation. Il faudrait en conclure que les nucléotides radioactifs concurrencent les précurseurs endogènes.

RÉSULTATS

Les techniques mises en jeu ont été décrites précédemment (DAILLIE, 1967 a). Un exposé succinct des conditions expérimentales pratiquées accompagne les tableaux ou figures. La thymidine-méthyle-³H (6 700 mCi/mM) de *New England Nuclear Corp.* a été constamment employée.

A — Cinétique de l'utilisation des nucléotides marqués pour la synthèse d'ADN

I. Résultats obtenus en phase de décharge.

Expérience I (fig. 1).

Les glandes restent en contact pendant cinq minutes avec la thymidine tritiée. Après quoi elles sont lavées et incubées pendant une heure en l'absence de thymidine.

La radioactivité soluble dans l'alcool (= nucléoside) se situe d'emblée à un niveau très faible (fig. 1). Ainsi les nucléotides synthétisés en l'espace de cinq minutes constituent la seule source de précurseurs radioactifs dont dispose l'ADN.

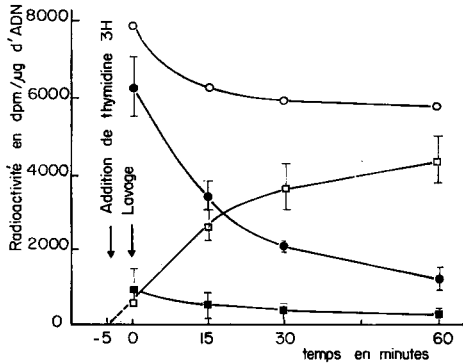


FIG. 1. — Cinétique en décharge, au 4^e jour, après une période de marquage de 5 minutes par la thymidine-³H

(En pointillé, phase de charge).

7 paires de tubes sécréteurs contenant en moyenne 1 200 μg d'ADN, sont incubées 5 minutes en présence de thymidine ³H (25 μCi). Après un lavage rapide, les glandes sont partagées en 4 lots homogènes. L'un de ces lots sert de témoin (temps 0), les 3 autres sont incubés à nouveau, sans thymidine, respectivement 15, 30 et 60 minutes supplémentaires. L'expérience est répétée 4 fois. (Résultats moyens accompagnés de leur intervalle de confiance pour un risque de 5 p. 100).

- fraction alcool ;
- acido-soluble ;
- ADN ;
- radioactivité cellulaire totale.

Cette réserve tend à s'épuiser. Entre 0 et 30 minutes, la radioactivité acido-soluble perdue ne se retrouve pas en totalité dans l'acide nucléique. Une fraction de l'acido-soluble est donc échangeable avec le milieu ; elle représente près de 35 p. 100

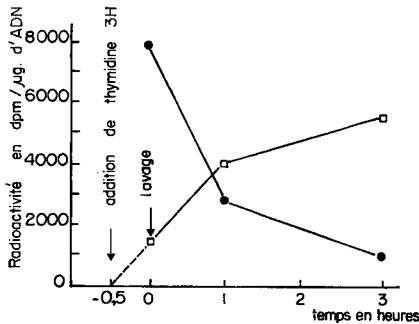


FIG. 2. — Cinétique en décharge, au 4^e jour, après une période de marquage de 30 minutes par la thymidine-³H

(En pointillé, phase de charge).

Modalités expérimentales identiques à celles pratiquées dans le cas de la figure 1 (5 paires de tubes sécréteurs, contenant 700 μg d'ADN ; 12,5 μCi de thymidine-³H)

- : ADN
- : acido-soluble.

des nucléotides présents au début de l'expérience. Entre 30 et 60 minutes, au contraire, la radioactivité perdue par l'acido-soluble passe intégralement dans l'ADN.

Expérience II (fig. 2).

Le contact des glandes avec le milieu radioactif est prolongé pendant une demi-heure. Dans ces conditions, la réserve des nucléotides radioactifs n'est pas complètement épuisée après trois heures d'incubation supplémentaires en l'absence de thymidine. On constate à nouveau la perte d'environ 30 p. 100 de la radioactivité acido-soluble initiale, pendant la première heure.

2. *Résultats obtenus en phase de charge.*

La relation :

$$D_m = \frac{AS_{t_1} + AS_{t_2}}{2} + \frac{ADN_{t_2} - ADN_{t_1}}{2}$$

définit la quantité moyenne de nucléotides radioactifs disponibles (D_m) durant l'intervalle de temps $t_2 - t_1$, en fonction des radioactivités contenues dans la fraction acido-soluble (AS) et ADN aux temps t_1 et t_2 .

Les calculs effectués à partir des résultats exprimés dans la figure 3 montrent que, pour des intervalles de temps successifs, la valeur de D_m augmente tandis que la vitesse d'incorporation du traceur dans l'ADN reste constante. C'est donc que l'utilisation relative :

$$U_r = \frac{\text{incorporation dans l'ADN par minute}}{D_m} \times 100$$

décroit dans le temps.

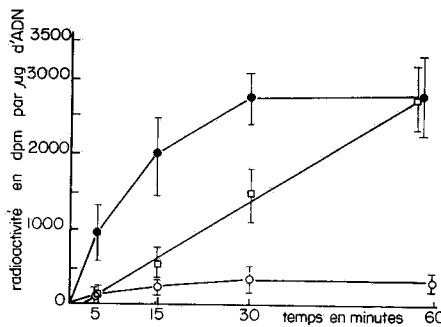


FIG. 3. — *Cinétique de l'incorporation de la thymidine-³H au 4^e jour*

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).

- fraction « alcool » ;
- ADN ;
- acido-soluble.

L'examen de la figure 4 qui représente cette évolution, révèle que les nucléotides marqués sont incorporés de manière très active durant les cinq premières minutes de l'incubation. Un fléchissement accentué se manifeste dans les dix minutes suivantes.

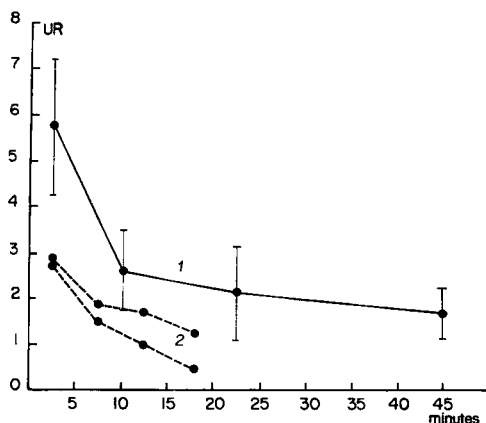


FIG. 4. — Utilisation relative (U_R) des nucléotides radioactifs pour la synthèse de l'ADN en fonction du temps, par des glandes prélevées au 4^e jour (cf. texte)

1. En trait plein : moyenne de 4 expériences (cf. fig. 3) ;
2. En pointillé : expérience répétée 2 fois — 6 paires de tubes sécréteurs partagées en 4 lots ; 180 μ g d'ADN par lot ; 10 μ Ci de thymidine.

B — Influence de la concentration du milieu en thymidine

L'incubation des glandes dure une demi-heure (tabl. I). Le domaine des concentrations explorées est compris entre $1,8 \cdot 10^{-4}$ et $5 \cdot 10^{-2}$ μ M de thymidine par ml de milieu. Pour obtenir ce résultat, la même dose de thymidine radioactive a été

TABLEAU I

Influence de la concentration du milieu en thymidine au 4^e jour
(Résultats moyens accompagnés de l'erreur standard)

Quatre lots préparés à partir de 6 paires de tubes sécréteurs (en moyenne, 347 μ g d'ADN par lot) sont incubés avec 2,5 μ Ci de thymidine tritiée pendant 30 minutes. Pour trois des lots, on apporte, en même temps que le traceur, 10^{-3} , 10^{-2} ou 10^{-1} μ M de thymidine froide de façon à obtenir dans le milieu les concentrations désirées. L'expérience est répétée quatre fois.

Concentration du milieu en thymidine (en μ M/ml)	Quantité de thymidine incorporée dans les fractions cellulaires en 30 minutes ($\times 10^{-6}$ μ M)		
	fraction alcool	acido-soluble	ADN
$1,87 \cdot 10^{-4}$	5,6 \pm 1,6	67 \pm 6	29 \pm 3
$6,87 \cdot 10^{-4}$	19 \pm 4,6	207 \pm 15	65 \pm 9
$5,19 \cdot 10^{-3}$	132 \pm 27	698 \pm 28	148 \pm 13
$5,02 \cdot 10^{-2}$	993 \pm 121	1 402 \pm 162	260 \pm 21

diluée par des quantités croissantes de thymidine froide. Les résultats sont donc exprimés en quantité de thymidine et non en radioactivité.

L'augmentation dans le milieu de la quantité de précurseur détermine une incorporation par demi-heure plus élevée dans les trois fractions isolées.

TABLEAU 2

Synthèse d'ADN, à partir de la thymidine exogène, dans les glandes séricigènes incubées (cf. tabl. 1).

On compte, en première approximation, 10 p. 100 (en poids) de thymine dans l'ADN.

Concentration du milieu en thymidine radioactive	Quantité de thymidine incorporée dans l'ADN en 30 minutes pour l'essai total	Quantité d'ADN radioactif produit		Synthèse d'ADN au 4 ^e jour <i>in situ</i> (DAILLIE, 1965) à l'heure, en p. 100 de l'ADN préexistant
		en 30 minutes pour l'essai total	à l'heure, en p. 100 de l'ADN préexistant	
$1,87 \cdot 10^{-4} \mu\text{M/ml}$	$29 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$	0,037 μg	0,021	1
$5,02 \cdot 10^{-2} \mu\text{M/ml}$	$260 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$	0,33 μg	0,19	

La synthèse d'ADN qui s'effectue à partir des précurseurs marqués n'est pas négligeable puisque la valeur obtenue pour la concentration la plus élevée correspond au 1/5 de la quantité d'acide nucléique produite *in situ* dans la glande au même âge (tabl. 2).

On remarque par ailleurs que la quantité de précurseur accumulée dans les fractions solubles s'accroît plus rapidement (tabl. 1) que l'incorporation dans l'ADN.

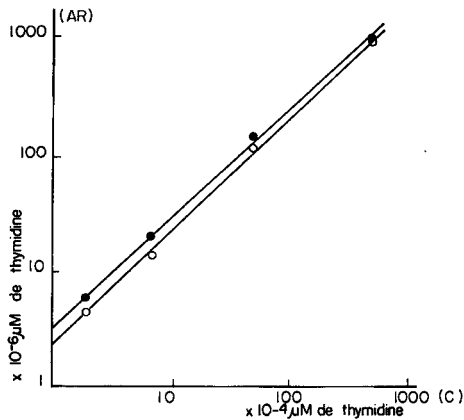


FIG. 5. — Évolution de (A_T) en fonction de $[C]$

$[A_T]$: quantité de thymidine accumulée dans la fraction alcool après 30 minutes d'incubation
 $[C]$: concentration de la thymidine dans le milieu au début de l'expérience.

● — Glandes prélevées au 4^e jour (cf. tabl. 1).

○ — Expériences identiques réalisées avec des glandes prélevées au 5^e jour.

La croissance de la fraction « alcool » (= $[A_r]$) en fonction de la concentration (= $[C]$) du milieu en thymidine peut être considérée comme linéaire puisque la droite obtenue en coordonnées logarithmiques (fig. 5) a une pente très proche de 1 (0,95). On peut donc admettre l'existence d'une relation de la forme

$$[A_r] = a[C]$$

Au contraire, aucune proportionnalité ne se manifeste entre, d'une part, la quantité du précurseur incorporée dans la fraction acido-soluble ou dans l'ADN et, d'autre part, la dose de thymidine fournie.

INTERPRÉTATION ET DISCUSSION

A — Signification du marquage

L'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN des glandes incubées représente jusqu'au cinquième de la synthèse qui se produit *in situ*, au même âge (tabl. 2). Un marquage d'une telle ampleur peut difficilement être imputé à des échanges de tritium labile entre composés solubles et molécules d'ADN ou à l'incorporation de restes thymine en position terminale.

D'autres résultats viennent à l'appui de cette thèse : l'actinomycine D (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et moins) bloque immédiatement l'incorporation de la thymidine dans les glandes en survie, sans que la phosphorylation du précurseur se trouve touchée (PRUDHOMME et coll., 1967). Par ailleurs, l'analyse des oligonucléotides pyrimidiques après hydrolyse (NEULAT, 1966) d'un ADN marqué *in vitro* par la thymidine tritiée confirme que la thymine présente la même activité spécifique dans les différentes séquences (1).

Ajoutons enfin que les observations recueillies par NIGON et coll. (1961) et par GILLOT (1967), grâce à l'emploi de l'autoradiographie, ne laissent planer aucun doute sur la signification de l'incorporation de la thymidine dans les glandes séricigènes : il s'agit bien d'une synthèse d'ADN.

B — Mouvements du précurseur

I. Pénétration de la thymidine.

L'entrée du nucléoside dans la glande est un processus rapide. L'accroissement de la quantité de précurseur dans la fraction « alcool » en fonction de la dose de thymidine introduite dans le milieu s'effectue selon la relation :

$$[A_r] = a[C].$$

Aucune preuve directe ne permet d'affirmer que la fraction « alcool » ne contient que de la thymidine. On pourrait même supposer que contrairement aux observations que j'ai faites pour de faibles concentrations (DAILLIE, 1967 a), la destruction catabolique de la thymidine s'accroisse pour les doses élevées. Cependant, dans une

(1) NEULAT (M.-M.). — Communication personnelle.

expérience similaire conduite avec des glandes prélevées au 6^e jour, la relation trouvée entre quantité de précurseur recueillie dans la fraction « alcool » et dose administrée est la même qu'au 4^e jour (fig. 5). Au contraire, nous observons qu'à ce stade la phosphorylation et l'incorporation dans l'ADN sont fortement réduites (DAILLIE, 1967 c).

Il paraît donc logique de supposer que la relation observée traduit un équilibre de diffusion relativement simple, et constant quel que soit l'âge, entre les concentrations de thymidine radioactive dans le milieu d'incubation d'une part, dans les cellules d'autre part.

Notons que la pente de la droite obtenue figure 5 est légèrement inférieure à 1 : ce fait peut indiquer qu'on n'atteint jamais complètement l'équilibre puisque la thymidine entrée est transformée à mesure en nucléotides.

2. Existence de compartiments dans l'acido-soluble radioactif.

a) Les preuves.

Les données fournies par l'analyse des cinétiques en charge et en décharge sont compatibles avec l'existence, au sein du pool acido-soluble radioactif, de deux compartiments, dont l'un seulement serait directement accessible pour la synthèse de l'ADN.

Les expériences de décharge révèlent la présence d'une fraction nucléotidique échangeable avec le milieu. Elle tend à disparaître lorsqu'on remplace le milieu marqué par du milieu neuf, en diffusant dans celui-ci.

Le marquage de l'ADN en charge est régulier. Si la synthèse de l'acide nucléique est constante, la diminution du rendement d'utilisation des précurseurs marqués peut s'expliquer de deux façons :

— ou bien la charge du pool radioactif dépasse les possibilités de son utilisation pour la synthèse d'ADN ;

— ou bien il existe au sein des nucléotides marqués une division et la cinétique totale de l'acido-soluble représente en fait la somme de ces compartiments.

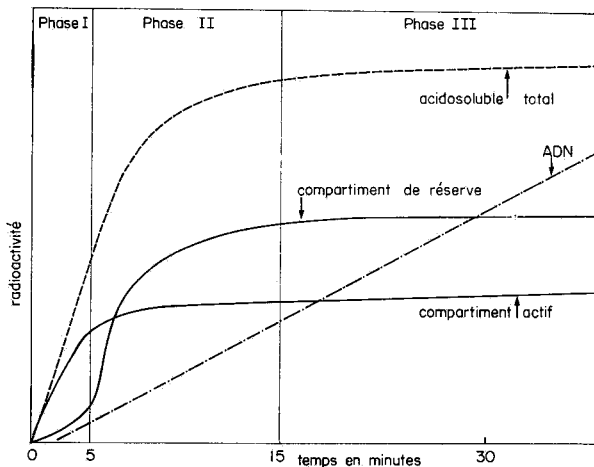


FIG. 6. — Charge des divers compartiments cellulaires

La première supposition doit être exclue puisque l'augmentation de la quantité de thymidine exogène provoque une élévation de l'incorporation dans l'ADN.

C'est donc la deuxième hypothèse que nous retiendrons. Dans ce cas, il faut supposer que le compartiment actif ($= P_a$) dans lequel puise l'ADN s'établit en quelques minutes (fig. 6, phase I), à un niveau qui par la suite reste stable (fig. 6, phase II). L'excès de nucléotides s'accumule alors dans un compartiment de réserve ($= P_r$) et dans le milieu d'incubation jusqu'à l'établissement d'un état d'équilibre (fig. 6, phase III).

Dans ce cadre, l'évolution curieuse des différentes catégories de nucléotides (DAILLIE, 1967 a) pourrait correspondre à des modifications de la vitesse et de l'équilibre des réactions de phosphorylation lors du passage d'une phase à une autre. Un premier état caractériserait la période de charge du compartiment actif ; un second état correspondrait à l'accumulation des nucléotides dans le compartiment de réserve. Une dernière situation définirait la période d'équilibre.

b) *Grandeur des compartiments radioactifs.*

L'évaluation exacte de la taille de chacun de ces compartiments est impossible à l'aide des résultats dont nous disposons pour l'instant. Cependant, à partir des expériences de décharge réalisées, j'ai procédé à une première approximation. On constate en effet que :

— le marquage de l'ADN ne se ralentit nettement que lorsque la sortie des nucléotides vers le milieu d'incubation s'annule (fig. 1 et 2) ;

— au début de la post-incubation, l'incorporation dans l'ADN ne faiblit pas de manière sensible par rapport à celle qui s'accomplit au cours de la phase de charge qui précède (fig. 1 et 2).

Il en résulte que, pendant ce temps, le compartiment actif se renouvelle, à partir du compartiment de réserve, à un taux à peu près équivalent à celui du marquage de l'ADN. Dans ces conditions, la part du marquage acido-soluble qui gagne le compartiment actif pendant la première phase de la décharge doit correspondre à peu près à l'augmentation de la radioactivité de l'ADN, soit 25 à 30 p. 100 du pool acido-soluble initial. Cette valeur, ajoutée à celle de la sortie dans le milieu (30 à 35 p. 100) donne un ordre de grandeur du compartiment de réserve. A la fin de la phase de charge, il représente 60 p. 100 du pool radioactif total ($= P_r$). On aurait donc $P_a \neq 0,4 P_r$.

c) *Nature des compartiments.*

Il serait logique d'identifier l'un des constituants du pool acido-soluble — en premier lieu le TTP — au compartiment actif. J'ai cependant observé (DAILLIE, 1967 a) qu'aucun de ces composés ne se maintient à un niveau stable avant une demi-heure d'incubation. La quantité de TTP, notamment, accuse des fluctuations marquées.

Devant l'impossibilité d'établir une correspondance entre l'un des composés marqués solubles et le compartiment actif, on est conduit à accorder à ce dernier une signification topographique au sein de la cellule et on songe tout naturellement au noyau.

A l'appui d'une telle hypothèse, citons quelques travaux qui indiquent que :
 — après administration de thymidine tritiée, la radioactivité soluble s'accumulerait de préférence dans le noyau (MILLER, 1963 ; FEINENDEGEN et BOND, 1962) ;
 — la réserve des composés désoxyribosidiques se situerait également dans le noyau (BEHKI et SCHNEIDER, 1962).

On retiendra donc comme plausible l'hypothèse d'une localisation intranucléaire pour le compartiment actif. Les constituants du compartiment de réserve se trouveraient alors dans le cytoplasme.

3. *Mouvement des précurseurs exogènes dans d'autres types cellulaires, in vitro.*

Parmi les nombreux travaux qui traitent de l'incorporation de la thymidine dans l'ADN, aucune situation analogue à celle qu'on a trouvée dans la glande séricigène n'a été signalée. Il est vrai que les travaux entrepris pour définir la cinétique du marquage et sa signification par rapport à la synthèse de l'ADN dans les cellules ou tissus, *in vitro*, sont extrêmement rares. CLEAVER et HOLFORD (1965) apportent, cependant, en ce domaine, des résultats importants.

Après addition de thymidine tritiée à des cellules de Souris en culture, le pool acido-soluble marqué s'équilibre avec le précurseur externe en l'espace de cinq minutes. L'absence d'une sortie des nucléotides vers le milieu d'incubation permettrait l'établissement rapide de cet équilibre. Il se pourrait aussi que les deux compartiments ne soient pas décelables ; il suffit, en effet, que l'un d'entre eux soit disproportionné par rapport à l'autre. Dans une telle situation, on comprend fort bien que l'incorporation dans l'acide nucléique s'effectue de manière linéaire pendant plus d'une heure étant donné que le milieu conserve un excès de thymidine.

C — *Synthèse d'ADN marqué et synthèse totale*

Un point important qu'il convient d'examiner maintenant concerne les relations du compartiment actif avec un éventuel pool endogène. C'est en fait toute la question de la mesure de la synthèse d'ADN grâce à l'incorporation d'un précurseur spécifique qui se trouve posée.

1. *Arguments pour une réserve de précurseurs endogènes.*

Lorsque la thymidine est administrée en faible quantité, l'incorporation dans l'ADN ne représente qu'une synthèse minimale. Si l'on supposait que les précurseurs radioactifs n'étaient pas dilués par des composés endogènes, il faudrait conclure qu'*in vitro*, la synthèse d'ADN dans les glandes est insignifiante. L'augmentation de l'incorporation enregistrée lorsqu'on élève la fourniture de thymidine, témoignerait d'une incapacité des glandes incubées à assurer la synthèse des précurseurs thymidyliques, tandis que les autres précurseurs de l'ADN resteraient disponibles.

Dans cette perspective, on comprendrait difficilement :

— pourquoi, en présence de petites quantités de thymidine, l'utilisation des nucléotides radioactifs fournis en abondance est aussi lente ;

— comment, après 6 ou 10 heures de survie en l'absence de thymidine, la glande séricigène pourrait conserver encore intacte son aptitude à incorporer la thymidine

alors que toute synthèse d'ADN aurait été absente pendant ce temps (DAILLIE, 1967 a ; DAILLIE et PRUDHOMME, 1965 ; PRUDHOMME, 1966).

Aussi, l'hypothèse d'une synthèse réduite *in vitro* comme conséquence d'une incapacité des glandes à produire leurs propres précurseurs paraissait-elle peu réaliste. Il n'y avait pas lieu de négliger les processus endogènes en regard des nucléotides radioactifs.

La proportion relative des participations exogène et interne dans la synthèse d'ADN peut prendre n'importe quelle valeur. Cependant, à l'aide des résultats obtenus il est possible de procéder à des calculs approchés.

2. Calculs approchés.

La cinétique en phase de charge (fig. 3) nous indique que le pool des nucléotides radioactifs ($= P_r$) est stable entre 30 et 60 minutes : il équivaut alors à 50 fois la quantité de précurseur exogène qui, chaque minute, atteint l'ADN ($= S_r$).

$$\frac{P_r}{S_r} = 50 \text{ et, comme } P_a \neq 0,4 P_r, \frac{P_a}{S_r} \neq 20$$

On peut écrire qu'à l'équilibre

$$\frac{S_r}{P_a} = \frac{S_t}{P_e + P_a} \left\{ \begin{array}{l} S_t = \text{synthèse totale d'ADN} \\ P_e = \text{pool endogène permanent.} \end{array} \right.$$

En admettant que, dans cette expérience, P_a est négligeable devant P_e , $\frac{P_e}{S_t} \neq 20$.

Selon cette estimation, le pool endogène permanent assurerait environ 20 minutes de synthèse d'ADN.

Ce calcul ne conduit pas à une évaluation de P_e puisque je n'ai pu mesurer directement S_t dans les glandes maintenues en survie. Il est dangereux de se rapporter au taux de la synthèse qui se déroule dans les glandes en place car, si la production d'ADN dans l'organe incubé n'est pas négligeable, elle risque cependant d'y être affaiblie. On peut cependant considérer que la valeur de S_r obtenue avec la plus forte concentration essayée (tabl. I) nous apporte une estimation minimale de S_t , soit une synthèse d'ADN équivalant à l'incorporation de $260 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ de thymidine en 30 minutes pour l'essai total. En reportant cette estimation de S_t , ainsi que les valeurs de P_r et de S_r trouvées pour les faibles concentrations (tabl. I) dans l'expression définie ci-dessus, il vient : $P_e = 230 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ de thymidine pour l'essai total, soit un peu moins de 1 p. 1 000 de la thymine contenue dans l'ADN des glandes.

Cette approximation permet de fixer une limite inférieure à P_e . Remarquons qu'une telle quantité de précurseurs endogènes équivaut à environ 25 minutes de synthèse, valeur très proche de l'estimation précédente.

Pour aller plus loin, il devient indispensable de faire des hypothèses quant aux relations qui s'établissent entre les divers compartiments considérés.

3. Hypothèses sur les relations entre les compartiments.

Diverses catégories de modèles pourraient être envisagées. Comme il s'agit avant tout d'hypothèses de travail, j'en examinerai seulement deux :

a) *Premier modèle proposé* (fig. 7).

Dans ce système, le compartiment de réserve (= P_R) occupe une position intermédiaire entre la thymidine non phosphorylée et le compartiment actif (= P_a) qui se mélange au pool endogène (= P_e). L'ADN puise pour sa synthèse dans l'ensemble $P_e + P_a$. La participation des nucléotides exogènes (= S_r) à la synthèse totale d'ADN (= S_t) résultera donc d'une dilution de P_e par les nucléotides marqués selon la relation déjà employée

$$\frac{S_r}{P_a} = \frac{S_t}{P_e + P_a}$$

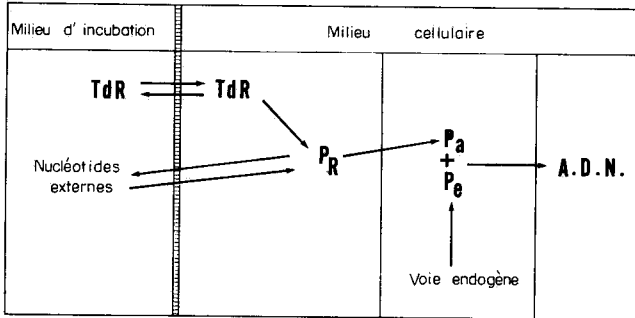


FIG. 7. — *Premier modèle proposé sur les relations entre compartiments*

TdR : thymidine ; P_R : nucléotides du compartiment de réserve ; P_a : nucléotides du compartiment actif ; P_e : nucléotides du pool endogène.

Si l'on pose $P_a = kP_r$ et $P_e = \text{constante}$, dans les limites de concentrations essayées, il vient :

$$S_r = \frac{kP_r S_t}{kP_r + P_e}$$

S_r est une fonction homographique de P_r qui sous la forme

$$\frac{I}{S_r} = \frac{P_e}{kS_t} \cdot \frac{I}{P_r} + \frac{I}{S_t}$$

définit une droite.

La figure 8 montre que les résultats obtenus (tabl. I) sont compatibles avec cette hypothèse.

Le calcul de la droite de régression, effectué par une méthode applicable lorsque les deux variables considérées sont aléatoires (JOLICŒUR, 1965), fournit l'équation

$$\frac{I}{S_r} = 2,486 \frac{I}{P_r} + 0,0019$$

Cette relation conduit au calcul de S_t et de $\frac{P_e}{k}$:

— $S_t = \frac{I}{0,0019} = 526 (\times 10^{-6} \mu\text{M de thymidine})$ en 30 minutes pour l'essai total.

Cette valeur, comparée à la quantité d'ADN contenue dans la glande, représente une production de 0,38 p. 100 à l'heure, soit un peu plus du tiers de la synthèse mesurée dans l'organe en place (DAILLIE, 1965).

$$-\frac{P_e}{k} = \frac{2,486}{0,0019} = 1\,308 \text{ (} \times 10^{-6} \text{ } \mu\text{M de thymidine).}$$

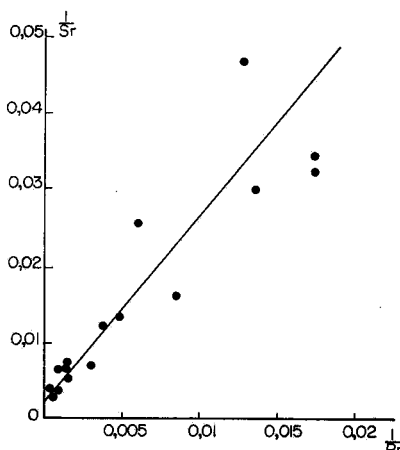


FIG. 8. — Évolution de S_r en fonction de P_r au 4^e jour

S_r : quantité de nucléotides marqués incorporés dans l'ADN ;

P_r : quantité de nucléotides marqués présents dans le pool acido-soluble à la fin de l'expérience.

Ce nombre serait la valeur maximale de P_e (si $k = 1$). Si $k = 0,4$, $P_e = 523 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ de thymidine pour l'essai total, c'est-à-dire 2 p. 1 000 de la thymine contenue dans l'acide nucléique des glandes. Dans cette hypothèse, le pool endogène assurerait donc une demi-heure de synthèse d'ADN, estimation compatible avec les valeurs trouvées précédemment grâce à des calculs approchés.

b) Deuxième modèle proposé.

Dans ce modèle, représenté par la figure 9, la thymidine atteint directement le compartiment d'utilisation P ($= P_e + P_a$) à la vitesse V_a , tandis que P_e se renouvelle à la vitesse V_e .

On a vu que la quantité de nucléoside contenue dans la cellule est proportionnelle à la concentration $[C]$ du milieu en thymidine (fig. 5).

$$\text{On écrit donc : } V_a = \frac{V_m [C]}{[C] + K_m}.$$

L'excédent de nucléotides formés s'évacue dans le compartiment de réserve et le milieu d'incubation.

Si la vitesse de renouvellement de P est assez rapide, on doit avoir

$$\frac{P_e}{P_a} = \frac{V_e}{V_a} = \frac{V_e([C] + K_m)}{V_m [C]}.$$

D'après la relation

$$\frac{S_r}{P_a} = \frac{S_t}{P_e + P_a}$$

il vient :

$$\frac{S_t}{S_r} = \frac{P_a + P_e}{P_a} = 1 + \frac{P_e}{P_a} = 1 + \frac{V_e}{V_a} = 1 + \frac{V_e([C] + K_m)}{V_m [C]}$$

et

$$\frac{1}{S_r} = \frac{1}{S_t} \left(1 + \frac{V_e}{V_m} \right) + \frac{V_e K_m}{S_t V_m} \times \frac{1}{[C]}$$

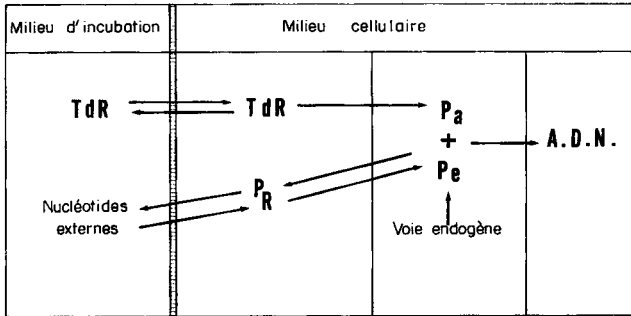


FIG. 9. — Deuxième modèle proposé sur les relations entre compartiments

TdR : thymidine ; P_R : nucléotides du compartiment de réserve ; P_a : nucléotides du compartiment actif ; P_e : nucléotides du pool endogène.

La figure 10 montre que nos résultats (tabl. 1) permettent également d'établir une relation linéaire entre $\frac{1}{S_r}$ et $\frac{1}{[C]}$ dont l'équation, calculée par la méthode des moindres carrés, est :

$$\frac{1}{S_r} = 5,76 \frac{1}{[C]} + 0,0056.$$

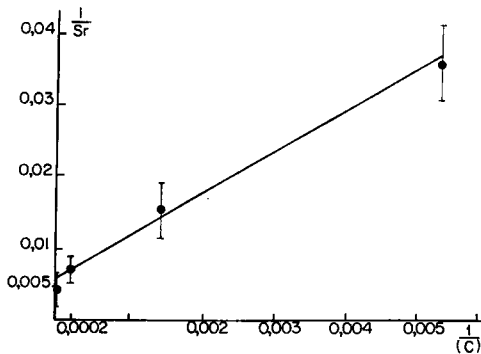


FIG. 10. — Évolution de $\frac{1}{S_r}$ en fonction de $\frac{1}{[C]}$ au 4^e jour

S_r : quantité de nucléotides marqués incorporés dans l'ADN en 30 minutes.
[C] : concentration de la thymidine dans le milieu au début de l'incubation (cf. tabl. 1).

On peut alors considérer :

$$\frac{1}{S_i} \left(1 + \frac{V_e}{V_m} \right) = \text{constante.}$$

Sa valeur est comprise entre $\frac{1}{S_i}$ et $\frac{2}{S_i}$ puisqu'on doit admettre que $V_m \geq V_e$.

Par le calcul, il vient :

$$178 < S_i < 356 \text{ (} 10^{-6} \text{ } \mu\text{M de thymidine en 30 minutes).}$$

La plus forte incorporation de thymidine exogène obtenue par l'expérience (tabl. 1), soit $260 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ par demi-heure, est comprise dans ces limites : elle représente la valeur minimum de S_i .

D'après ce modèle, la participation de la thymidine administrée à la synthèse d'ADN serait limitée par des processus enzymatiques. Ceux-ci sont nécessairement très complexes, puisque la sortie des nucléotides du compartiment d'utilisation vers le compartiment de réserve, porte à la fois sur les nucléotides exogènes et internes. Pour cette raison, l'hypothèse ne peut conduire à une évaluation de P_e .

En définitive, on trouve dans les données de l'expérience des arguments favorables à chacun des modèles envisagés. Ils permettent de concevoir des prolongements à nos recherches, qui pourraient aboutir à la vérification de l'un d'eux et du même coup à une évaluation de la synthèse vraie d'ADN par l'emploi d'un précurseur marqué.

Dès à présent, il apparaît que les estimations de cette synthèse, quoique différentes selon le modèle envisagé, ne sont pas incompatibles avec nos résultats. Le taux de synthèse horaire se trouve compris entre 0,19 et 0,38 p. 100 du contenu en ADN, ce taux étant de 1 p. 100 dans l'organe en place (DAILLIE, 1965). On n'atteint donc pas dans la glande explantée le niveau d'activité qui caractérise l'organe *in situ*. Cependant, cette activité n'est pas négligeable et implique, pour les doses faibles de thymidine, que l'incorporation du précurseur exogène ne représente pas, à elle seule, la synthèse d'ADN qui se produit.

Le précurseur radioactif entre donc en compétition avec un pool endogène qui assure, environ, la synthèse d'ADN pendant une demi-heure et représente 1 à 2 p. 100 de la thymine contenue dans l'ADN. Cette évaluation est compatible avec les mesures directes effectuées dans les glandes séricigènes : BRUNEL (1965) a isolé et identifié les principaux ribonucléotides sans trouver trace de déoxyribotides, même après incorporation d'acide orotique marqué. Compte tenu de la sensibilité de la méthode employée, on peut estimer que les désoxynucléotides thymidyliques auraient été détectés s'ils constituaient une réserve permanente supérieure à 1 p. 100 de la thymine contenue dans l'ADN (c'est-à-dire supérieure à l'équivalent d'une heure de synthèse au 4^e jour).

Cette évaluation est également conforme à celles qui ont été publiées par d'autres auteurs (LARK, 1963). On estime en effet que le pool des désoxypyrimidines est compris, selon les types cellulaires, entre 0,2 et 5 p. 100 des pyrimidines contenues dans l'ADN. L'opinion qui prévaut est que les réserves intracellulaires ne contiennent qu'une quantité minime de précurseurs immédiats de l'ADN. En réalité, cette réserve n'est petite qu'en regard des quantités de ribonucléotides rencontrées. Il serait dangereux de la négliger lorsqu'on emploie des traceurs.

CONCLUSION

Ce travail prolonge l'étude du métabolisme de la thymidine dans la glande séricigène en survie, au 4^e jour du 5^e âge (DAILLIE, 1967 *a*). Il m'a permis d'approfondir la connaissance des mécanismes de la participation du précurseur exogène à la synthèse d'ADN.

Il s'avère que les nucléotides produits ne sont pas accessibles en totalité dans le compartiment d'utilisation. Il se crée un compartiment de réserve intracellulaire qui communique lui-même avec le milieu d'incubation. Ce mécanisme est à l'origine d'une cinétique complexe de l'ensemble du pool acido-soluble radioactif. Mais la charge rapide puis la stabilité du compartiment actif expliquent que le marquage de l'ADN soit régulier pendant au moins une heure.

Certes, la compréhension de certains processus présente encore un caractère spéculatif. Divers modèles d'échanges entre les compartiments cellulaires sont compatibles avec les données de l'expérience. Ils constituent des hypothèses de travail qui permettront de prolonger l'analyse.

Les limites que j'ai pu définir indiquent que les glandes isolées de l'animal conservent, bien qu'affaiblies, leur capacité à produire l'ADN et les précurseurs nécessaires. Cette conclusion permet d'envisager l'analyse, dans la glande maintenue en survie, des mécanismes responsables de la différenciation protéique.

Reçu pour publication en mars 1967.

SUMMARY

THYMIDINE METABOLISM IN THE SILK GLAND OF « BOMBYX MORI »

II. UTILIZATION OF THE RADIOACTIVE NUCLEOTIDES IN THE DNA SYNTHESIS OF THE « IN VITRO »-INCUBATED GLAND AT THE 4TH DAY OF THE 5TH STAGE

1. Part of the thymidine nucleotides stored in the *in vitro*-incubated silk gland easily exchanges with the incubation medium. The utilization of nucleotides markedly decreases for the first minutes of incubation in presence of radioactive thymidine. However, the rate of DNA labelling is constant. These facts incline to think that only a part of the phosphorylated precursors is directly available for DNA synthesis. Radioactivity in this active compartment would reach a high rate within a few minutes, and be then kept almost constant.

2. The amount of thymidine in the medium when the experiment begins has a strong influence on the importance of the radioactive pool and the rate of its participation to DNA synthesis ; which leads us to the conclusion that this active compartment concurs into the synthesis with the endogenous precursors.

3. The DNA synthesis carried out in the *in vitro* organ amounts per hour to 0.20 to 0.40 per cent of its content of nucleic acid, that is to say 1/5 to 1/3 of the DNA synthesized *in situ*. The permanent endogenous pool approximately represents the amount of nucleotides required by the DNA synthesis for half an hour.

Various patterns accounting for the exchanges between compartments are discussed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BEHKI R. M., SCHNEIDER W. C., 1962. Intracellular distribution of deoxyribosidic compounds in normal and regenerating liver and in Novikoff hepatoma. *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 663-667.
- BRUNEL C., 1965. *Analyse de quelques dérivés puriques et pyrimidiques acidolubles dans les glandes séricigènes chez Bombyx mori*. Thèse 3^e Cycle, Lyon.
- CLEAVER J. C., HOLFORD R. M., 1965. Investigation into the incorporation of ³H-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., 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 a. Métabolisme de la thymidine dans la glande séricigène du Ver à soie. I. Les principales voies suivies par le précurseur dans la glande incubée *in vitro*. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* **7** (2) 115-128.
- DAILLIE J., 1967 c. Métabolisme de la thymidine dans la glande séricigène du Ver à soie. III. Incorporation de la thymidine radioactive dans la glande séricigène prélevée au 6^e jour du 5^e âge et incubée *in vitro*. *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. Nutrition et Alimentation*, **20**, 353-360.
- FEINENDEGEN L. E., BOND V. P., 1962. Differential uptake of ³H-thymidine into the soluble fraction of single bone marrow cells, determined by autoradiography. *Exptl. Cell Res.*, **27**, 474-484.
- GILLOT S., 1967. (En préparation).
- JOLICŒUR P., 1965. Calcul d'un intervalle de confiance pour la pente de l'axe majeur de la distribution normale de deux variables. *Biométrie-Praximétrie*, **6**, 31-35.
- LARK K. G., 1963. Cellular control of DNA biosynthesis in TAYLOR J. H., *Molecular Genetics*, Part. I. pp. 153-206.
- MILLER O. L., 1963. Autoradiography of soluble ³H-thymidine derivatives in single cells. *J. Cell Biol.* **10**, 50 A.
- NEULAT M.-M., 1966. Caractérisation de l'acide désoxyribonucléique des glandes séricigènes de *Bombyx mori* L. *Biochim. Biophys. Acta*, **114**, 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.
- PRUDHOMME J.-C., 1966. *Contribution à l'étude du métabolisme des glandes séricigènes de Bombyx mori, incubées in vitro*. Thèse 3^e Cycle, Lyon.
- PRUDHOMME J.-C., GILLOT S., DAILLIE J., 1967. Effets de l'actinomycine D sur la synthèse de l'ADN et de l'ARN dans la glande séricigène de *Bombyx mori* L. *Exptl. Cell Res.* (sous presse).
-