

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

### III. — INCORPORATION DE LA THYMININE RADIOACTIVE DANS LA GLANDE SÉRICIGÈNE PRÉLEVÉE AU 6<sup>e</sup> JOUR DU 5<sup>e</sup> AGE ET INCUBÉE « IN VITRO »

J. DAILLIE

*Section de Biologie générale et appliquée,  
Faculté des Sciences de Lyon, 69 - Villeurbanne  
Laboratoire associé au Centre national de la Recherche scientifique*

---

#### SOMMAIRE

Bien que la synthèse de l'ADN soit réduite dans la glande séricigène au 6<sup>e</sup> jour du 5<sup>e</sup> âge larvaire, la thymidine fournie à l'organe incubé *in vitro* pénètre avec facilité par diffusion.

Mais l'activité des kinases qui assurent la phosphorylation du nucléoside se trouve affaiblie par rapport à ce qu'on a observé avec des glandes jeunes. La production des nucléotides dépasse toutefois les possibilités de leur utilisation par l'ADN. Ce dernier incorpore le précurseur à un taux très faible.

Lorsqu'on fait varier la concentration du milieu en thymidine, on atteint très vite, dans l'ADN, l'incorporation maximum du précurseur. Celle-ci représente, au plus, une synthèse d'acide nucléique de 0,5 p. 1 000 à l'heure.

On n'a pu évaluer avec précision la quantité de précurseurs thymidyliques endogènes disponible en permanence : cette réserve, qui ne paraît pas pouvoir assurer plus de 15 minutes de synthèse, représente environ 0,1 p. 1 000 de la quantité de thymine contenue dans l'ADN des glandes.

L'intervention éventuelle des kinases de la thymidine ou de la production des précurseurs endogènes dans la régulation de la synthèse d'ADN est discutée.

---

#### INTRODUCTION

Deux publications antérieures (DAILLIE, 1967 *a*, *b*) traitent du métabolisme de la thymidine radioactive dans la glande séricigène (tube sécréteur) explantée au début du 4<sup>e</sup> jour du 5<sup>e</sup> âge. A cette période, l'organe est encore le siège d'une synthèse d'ADN importante. Dans ces conditions, la thymidine pénètre facilement dans les cellules ; les nucléotides radioactifs, qui se forment en abondance, se répartissent de

manière compliquée entre le milieu d'incubation et deux compartiments cellulaires dont l'un seulement (compartiment actif) est accessible à la synthèse d'ADN. L'utilisation des nucléotides marqués pour produire l'ADN dépend de la quantité de thymidine ajoutée au milieu d'incubation ; elle est toutefois limitée, ce qui traduit soit un processus de dilution du pool endogène — dont l'importance ne peut être négligée — par les précurseurs exogènes, soit une limitation de nature enzymatique.

Au 6<sup>e</sup> jour du 5<sup>e</sup> âge, la synthèse de l'ADN se ralentit fortement dans la glande séricigène (DAILLIE, 1965). Avec ce matériel, il m'a paru intéressant de procéder à des expériences identiques à celles que j'ai réalisées sur la glande en voie de croissance. Les résultats obtenus sont exposés dans cet article. Il s'avère que les processus de base de l'incorporation du nucléoside se présentent au 6<sup>e</sup> jour de manière très semblable à ce qu'ils sont au 4<sup>e</sup> jour. Les principales modifications sont d'ordre quantitatif. La synthèse d'ADN étant très faible, l'utilisation du précurseur est rapidement saturée. Les répercussions sont moins marquées au niveau du métabolisme intermédiaire.

La discussion portera surtout sur la nature des facteurs qui contrôlent la synthèse d'ADN.

## I — RÉSULTATS

Les techniques mises en jeu ont été décrites dans des publications antérieures (DAILLIE, 1967 *a* et *b*). J'ai constamment utilisé pour ce travail la thymidine méthyle-tritiée de *New England Nuclear Corp.* (6 700 mCi/mM).

### A — Étude cinétique

#### I. Cinétique en phase de charge (fig. 1).

La comparaison avec les résultats obtenus dans les mêmes conditions dans le cas où les glandes sont prélevées au 4<sup>e</sup> jour (DAILLIE, 1967 *a* et *b*) conduit aux remarques suivantes :

*a*) la radioactivité spécifique de l'ADN croît lentement (fig. 1). L'accumulation des nucléotides marqués persiste à un taux élevé pendant toute la durée de

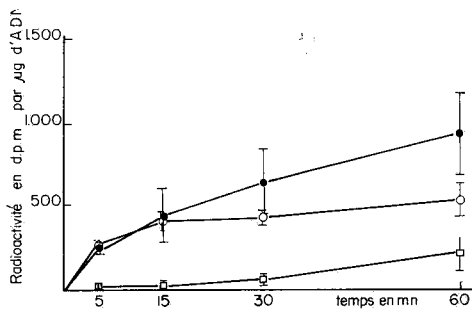


FIG. 1. — Cinétique de l'incorporation de la thymidine-<sup>3</sup>H au 6<sup>e</sup> jour

A partir de 5 paires de tubes sécréteurs, on prépare 4 lots (382 µg. d'ADN par lot) qui sont incubés respectivement 5, 15, 30 et 60 minutes en présence de thymidine tritiée (3 µCi). L'expérience est répétée 4 fois (Résultats moyens accompagnés de leur intervalle de confiance pour un risque de 5 p. 100).

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

l'expérience (1 heure). La fraction « alcool » contient une part importante de radioactivité cellulaire.

b) L'utilisation du pool acido-soluble pour la synthèse d'ADN s'effectue dans ce cas aussi avec un rendement plus élevé dans les premières minutes que par la suite.

c) Le vieillissement des chenilles détermine un affaiblissement marqué de l'incorporation du précurseur dans l'ADN. La réduction qui s'opère sur la radioactivité accumulée dans l'acido-soluble, bien que sensible, est moins accentuée (tabl. 1).

TABLEAU I

*Comparaison de l'incorporation de la thymidine tritiée dans les glandes séricigènes prélevées au 4<sup>e</sup> et au 6<sup>e</sup> jour du 5<sup>e</sup> âge*

(incubations d'une heure en présence de 3 $\mu$ Ci de thymidine tritiée)  
 Résultats tirés d'expériences comparables de cinétique en charge  
 (cf. DAILLIE, 1967 *b* et fig. 1 du présent article)

Radioactivité dans différentes fractions (en dpm/ $\mu$ g d'ADN)	Age des chenilles	
	4 <sup>e</sup> jour	6 <sup>e</sup> jour
Fraction « alcool » .....	320	540
Acido-soluble .....	2 720	930
ADN .....	2 760	210
Total .....	5 800	1 680

## 2. Cinétique en phase de décharge.

### a) Marquage de courte durée (fig. 2).

Comme dans le cas de glandes prélevées au 4<sup>e</sup> jour (DAILLIE, 1967 *b*) une partie de la radioactivité regagne le milieu. Cette perte s'effectue à la même vitesse qu'au 4<sup>e</sup> jour (21 p. 100 de la radioactivité initiale sont perdus en 15 minutes). Mais elle se prolonge plus longtemps. C'est seulement pendant la seconde demi-heure que la sortie s'atténue (courbe 4). Elle est donc au total beaucoup plus élevée qu'au 4<sup>e</sup> jour.

Il s'avère, en outre, que la thymidine contenue dans la fraction « alcool », est, pour une part assez grande, phosphorylée au début de la post-incubation. En effet, la radioactivité de l'acido-soluble est plus élevée après 15 minutes qu'au temps zéro de l'expérience, de sorte que, pendant le premier quart d'heure, elle doit passer par une valeur maximale. La perte de produits marqués porterait donc, au cours de cette période, non seulement sur la thymidine mais aussi, comme au 4<sup>e</sup> jour, sur les nucléotides.

Le marquage de l'ADN croît de façon lente, sans être affecté de manière très marquée par la diminution des nucléotides acido-solubles.

b) Marquage de longue durée (fig. 3).

Ces résultats confirment les précédents : la perte de radioactivité cellulaire est très élevée et le marquage de l'ADN reste linéaire pendant 3 heures.

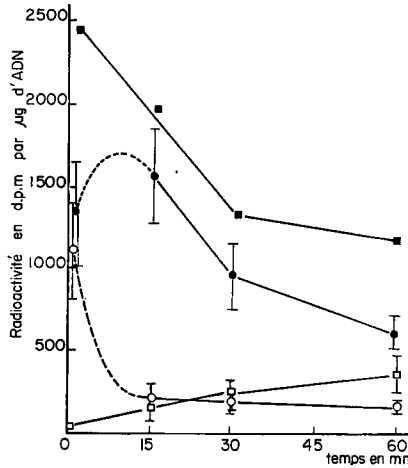


FIG. 2. — Cinétique de décharge au 6<sup>e</sup> jour après une période de marquage de 5 minutes en présence de thymidine-<sup>3</sup>H

6 paires de tubes sécréteurs (contenant en moyenne 1 540 µg. d'ADN) sont incubées 5 minutes en présence de thymidine-<sup>3</sup>H (25 µCi) puis lavées et partagées en 4 lots homogènes. L'un de ces lots sert de témoin (temps 0). Les autres sont incubés, 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 » ;
- ADN ;
- acido-soluble ;
- radioactivité cellulaire totale.

Ainsi, l'analyse des cinétiques en charge et en décharge révèle que, dans la glande séricigène prélevée sur des chenilles âgées, les divers aspects du métabolisme de la thymidine (notamment l'accumulation des nucléotides radioactifs et plus encore leur incorporation dans l'ADN), sont affaiblis par rapport aux observations faites au 4<sup>e</sup> jour. En outre, la fraction des nucléotides directement accessible pour la synthèse d'ADN (= compartiment actif) paraît plus réduite.

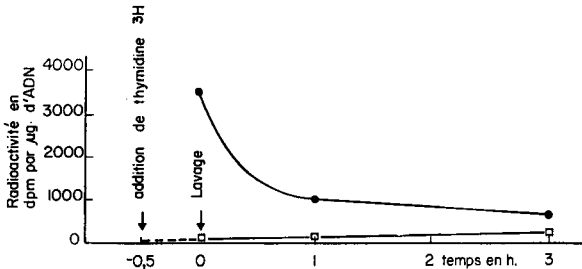


FIG. 3. — Cinétique en décharge au 6<sup>e</sup> jour après une période de marquage de 30 minutes par la thymidine <sup>3</sup>H (en pointillé, phase de charge).

Modalités expérimentales identiques à celles pratiquées dans le cas de la figure 2. (4 paires de tubes sécréteurs contenant 1 200 µg. d'ADN ; 25 µCi de thymidine).

- ADN
- acido-soluble.

B — *Effet de la concentration du milieu en thymidine (tabl. 2)*

Les chenilles utilisées dans cette expérience, bien que sacrifiées au début du 6<sup>e</sup> jour, devaient être plus « jeunes » du point de vue physiologique (retard de développement dû à des causes non définies). On constate, en effet, que pour la dose de thymidine la plus faible (tabl. 2), la répartition du précurseur exogène dans les diverses fractions cellulaires est différente de celle observée dans l'expérience de charge, pour une quantité de thymidine fournie équivalente (fig. 1). Cette remarque souligne l'influence de l'état physiologique de la glande sur l'utilisation du précurseur exogène. Notons que l'estimation de cette dernière, à partir des résultats de cette expérience, nous fournira une approximation maximum de l'activité des glandes au 6<sup>e</sup> jour.

TABLEAU 2

*Influence de la concentration du milieu en thymidine au 6<sup>e</sup> jour*  
(Résultats moyens accompagnés de l'erreur standard)

Quatre lots, préparés à partir de 6 paires de tubes sécréteurs (en moyenne, 318  $\mu\text{g}$  d'ADN par lot) sont incubés avec 2,5  $\mu\text{Ci}$  de thymidine tritiée pendant 30 minutes. Pour trois des lots, on apporte en même temps que le traceur,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  ou  $10^{-1}$   $\mu\text{M}$  de thymidine froide de façon à obtenir dans le milieu les concentrations désirées. L'expérience est répétée 4 fois.

Concentration du milieu en thymidine (en $\mu\text{M}/\text{ml}$ )	Quantité de thymidine incorporée dans les fractions cellulaires en 30 minutes ( $\times 10^{-6}$ $\mu\text{M}$ )		
	Fraction alcool	Acido-soluble	ADN
$1,87 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \pm 0,5$	$54 \pm 1,7$	$13 \pm 2,2$
$6,87 \cdot 10^{-4}$	$15 \pm 3$	$78 \pm 6$	$15 \pm 2,2$
$5,18 \cdot 10^{-2}$	$112 \pm 14$	$324 \pm 49$	$64 \pm 20$
$5,02 \cdot 10^{-2}$	$937 \pm 206$	$688 \pm 165$	$57 \pm 14$

La discordance signalée n'empêche pas de tirer de cette expérience des indications précieuses.

Comme au 4<sup>e</sup> jour (DAILLIE, 1967 b), l'incorporation du précurseur dans l'ADN augmente avec la dose fournie. Mais, au 6<sup>e</sup> jour, dès la troisième concentration essayée ( $5 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{M}/\text{ml}$ ), on atteint l'incorporation maximum dans l'acide nucléique.

Au-delà de cette concentration, seule s'accroît la quantité de précurseur extraite avec les fractions solubles (tableau 2).

Ainsi que je l'ai déjà signalé (DAILLIE, 1967 b), la croissance de la fraction « alcool » ( $= [A_r]$ ) en fonction de la concentration ( $= [C]$ ) est telle que

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

Cette relation indique que la pénétration du nucléoside s'effectue au 6<sup>e</sup> jour comme au 4<sup>e</sup> jour, selon un processus de diffusion simple, et répond à une loi identique.

## II. — INTERPRÉTATION ET DISCUSSION

Ces résultats ne remettent pas en cause les conclusions tirées précédemment de l'étude plus complète du métabolisme de la thymidine et des modalités de sa participation à la synthèse d'ADN, à laquelle j'ai procédé avec des glandes séricigènes prélevées au 4<sup>e</sup> jour. Je discuterai seulement certaines questions touchant à la synthèse d'ADN et à son contrôle.

1. Des résultats antérieurs (DAILLIE, 1965) ont montré qu'à partir du 6<sup>e</sup> jour la synthèse d'ADN dans la glande en place se réduit nettement et n'est plus accessible à l'analyse directe.

Pourtant, nous venons de montrer que la glande, explantée à cette période, laisse pénétrer la thymidine et se montre capable — certes à un taux réduit mais qui reste appréciable — de phosphoryler le nucléoside et de l'incorporer dans l'ADN.

Aucun argument décisif ne permet évidemment d'affirmer qu'une incorporation faible ne corresponde pas à des échanges de tritium labile. Je crois pourtant qu'il est plus logique de la considérer comme représentative d'une synthèse résiduelle qui ne peut qu'échapper à l'analyse directe.

2. L'augmentation de la quantité de thymidine ajoutée au milieu d'incubation aboutit — contrairement à ce que j'ai observé avec des glandes prélevées au 4<sup>e</sup> jour — à un plafond pour l'incorporation dans l'acide nucléique (tableau 2). La production d'ADN, calculée sur cette base, doit représenter de très près la synthèse totale d'ADN. Elle est voisine de 0,5 p. 1 000 à l'heure et, pour les raisons indiquées précédemment, je considérerai ce chiffre comme une évaluation maximum de la synthèse qui se produit au 6<sup>e</sup> jour. Au 4<sup>e</sup> jour, cette synthèse est, au minimum, de 0,2 p. 100 (DAILLIE, 1967 b).

Le tableau 1 montre, par ailleurs, que, pour une faible concentration de thymidine, l'incorporation dans l'ADN est douze fois plus faible au 6<sup>e</sup> qu'au 4<sup>e</sup> jour.

Il apparaît donc que la synthèse d'ADN se réduit de 4 à 12 fois dans la glande séricigène, entre le 4<sup>e</sup> et le 6<sup>e</sup> jour.

Ces observations posent le problème des mécanismes qui contrôlent la synthèse de l'acide nucléique.

3. La quantité de nucléotides marqués accumulée est plus faible que dans les glandes prélevées au 4<sup>e</sup> jour (tabl. 1). Ce phénomène peut avoir deux causes :

- une sortie accrue des nucléotides formés au sein des cellules,
- une réduction de l'activité ou de la quantité des enzymes qui assurent la phosphorylation de la thymidine.

La sortie des nucléotides est effectivement plus importante, mais elle s'effectue à la même vitesse qu'au 4<sup>e</sup> jour. Le fait essentiel est qu'au 6<sup>e</sup> jour elle se prolonge plus longtemps. Cette situation pourrait simplement traduire l'existence, corrélative du ralentissement de la synthèse d'ADN, d'un compartiment actif de faible capacité.

Cette remarque n'implique pas que l'activité kinasique ne soit pas affaiblie. Il est même évident que la phosphorylation est moins rapide qu'au 4<sup>e</sup> jour comme le montre notamment l'expérience de décharge (fig. 2).

Quelques auteurs (cf. LARK, 1963) suggèrent que l'activité des kinases de la thymidine pourrait être un des facteurs qui contrôlent la synthèse de l'ADN. Nous constatons, à ce sujet :

— que la réduction qui s'opère au niveau de la phosphorylation dans les glandes âgées est moins sévère que celle qui touche la synthèse d'ADN (tabl. 1).

— que l'accumulation des nucléotides marqués se poursuit même lorsque le système de synthèse de l'acide nucléique est saturé (tabl. 2).

Ces observations semblent indiquer que la vitesse de phosphorylation est liée au taux de la synthèse d'ADN sans être cependant déterminante dans le contrôle de cette dernière.

4. On pourrait alors supposer que c'est la production de l'ensemble des précurseurs endogènes qui subit une réduction. Il va de soi que, dans ce cas, la synthèse d'ADN sera limitée et que les précurseurs thymidyliques exogènes ne pourront être utilisés au-delà d'une certaine limite. Le fait qu'au 6<sup>e</sup> jour, le compartiment actif soit réduit et qu'on atteigne la saturation de la synthèse d'ADN pour des doses de thymidine relativement faibles, est favorable à cette hypothèse.

L'évaluation du pool des précurseurs thymidyliques endogènes, bien que délicate, peut être tentée en posant :

$$\frac{S_r}{S_t} = \frac{P_a}{P_e + P_a} \quad (\text{DAILLIE, 1967 } b)$$

$$\text{où } P_e = P_a \left( \frac{S_t}{S_r} - 1 \right)$$

expression dans laquelle :

$P_a$  = compartiment actif

$P_e$  = pool endogène

$S_r$  = ADN produit à partir des précurseurs exogènes

$S_t$  = synthèse totale d'ADN

si  $P_a = k P_r$  ( $P_r$  = Pool radioactif total)

il vient  $\frac{P_e}{k} = P_r \left( \frac{S_t}{S_r} - 1 \right)$

La valeur maximum de l'incorporation représente  $S_r$ . On peut donc calculer  $P_e/k$  pour les faibles concentrations de thymidine (tabl. 2).

On trouve  $\frac{P_e}{k} = 150 (\times 10^{-6} \mu\text{M de thymidine})$ .

L'estimation de  $k$  est délicate en raison de la cinétique complexe observée en phase de décharge (fig. 2) : le compartiment actif est faible, et on considérera que la valeur maximum de  $k$  est 0,2, d'où  $P_e \leq 30 \cdot 10^{-6} \mu\text{M de thymidine}$ .

D'après cette approximation, le pool endogène contiendrait une quantité de précurseur assurant, au plus 15 minutes de synthèse d'ADN et représentant 0,1 p. 1 000 de la thymidine contenue dans l'acide nucléique. Par rapport aux résultats obtenus au 4<sup>e</sup> jour (DAILLIE, 1967 *b*), la réserve endogène au 6<sup>e</sup> jour se trouve 10 à 20 fois plus faible, tandis que la synthèse d'ADN n'est réduite que de 4 à 12 fois.

Bien entendu, on ne peut exclure totalement l'éventualité d'un contrôle s'exerçant au niveau même de la synthèse de l'ADN (modification de la structure chromatinienne altérant son aptitude à fonctionner comme amorce ou matrice ; réduction de l'activité du système polymérisique). Il faut constater cependant que la réduction du pool des précurseurs endogènes est suffisante pour rendre compte de la diminution subie par la synthèse d'ADN. Dans cette hypothèse, il faudrait se demander quels sont les facteurs qui déterminent cette réduction. De ce point de vue, on ne peut manquer de rapprocher la situation observée dans la glande séricigène de celle que révèlent de nombreuses études concernant la différenciation cellulaire et qui montrent l'existence d'une certaine antinomie entre la division cellulaire et les opérations de différenciation. Peut-être faut-il simplement considérer que les moyens de synthèse dont dispose la cellule sont à partir du 6<sup>e</sup> jour, accaparés par la production de la soie. L'arrêt de la synthèse d'ADN pourrait n'être alors qu'une expression, parmi d'autres, de ce détournement.

*Reçu pour publication en mars 1967.*

## SUMMARY

### THYMIDINE METABOLISM ON THE SILKGAND OF BOMBYX MORI

#### III. — INCORPORATION OF RADIOACTIVE THYMIDINE INTO THE « IN VITRO » INCUBATED GLAND AT DAY 6 OF THE 5TH STAGE

Though the DNA synthesis in the silkgland at day 6 of the 5th stage is slowed down, thymidine easily penetrates into the *in vitro* incubated gland.

The activity of the phosphorylating kinases is lower than in younger glands. However, the rate of production of the nucleotides is higher than their rates of utilization by DNA, which incorporates the precursor at very low speed.

When the thymidine concentration of the medium is increased, the incorporation of the precursor into DNA soon reaches a maximum which is at its highest a 0.05 per cent nucleic synthesis per hour.

The amount of endogenous thymidilic precursors available could not be accurately estimated ; it is roughly 0.01 per cent of the thymidine contents of the gland DNA and does not seem to be capable of ensuring more than a 15 minutes synthesis.

The possible parts played by thymidine kinases and endogenous precursors in the regulation of DNA synthesis are discussed.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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**, 115-128.
- DAILLIE J., 1967. b. Métabolisme de la thymidine dans la glande séricigène du Ver à soie. II. Utilisation des nucléotides radioactifs pour la synthèse de l'ADN dans la glande incubée *in vitro* au 4<sup>e</sup> jour du 5<sup>e</sup> âge. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **7**, 227-243.
- LARK K. G., 1963. Cellular control of DNA Biosynthesis. In TAYLOR J. H. *Molecular Genetics*, Part. I, pp. 153-206.