

## MÉTABOLISME DE LA THYMININE DANS LA GLANDE SÉRICIGÈNE DU VER A SOIE (1)

### IV. — ÉTUDES SUR LA GLANDE « IN SITU »

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

1. Le transfert du nucléoside injecté dans l'hémocoel vers les organes, et en particulier la glande séricigène, se réalise à grande vitesse. Aux 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> jours, la majeure partie de la thymidine disparaît de l'hémolymphe en l'espace de 10 à 15 minutes. Ce phénomène résulte d'une transformation immédiate du nucléoside introduit. Au 3<sup>e</sup> jour, 15 minutes après injection d'une dose traceuse de thymidine, la radioactivité soluble dans la glande apparaît entièrement sous la forme de nucléotides, ou de composés de dégradation.

2. Les nucléotides radioactifs se trouvent à bref délai incorporés au pool d'utilisation et, ainsi, mêlés aux précurseurs endogènes. Il est donc possible, en première approximation, d'assimiler la vitesse de disparition des nucléotides marqués à la vitesse de renouvellement du pool endogène. On a pu évaluer que ce renouvellement, au 3<sup>e</sup> jour, s'effectue 0,6 fois par heure.

3. Dans ces conditions, l'ADN incorpore le précurseur très rapidement, dès le début de l'expérience. La vitesse du marquage se ralentit ensuite ; la radioactivité maximum de l'acide nucléique est atteinte après 2 à 8 heures, aux 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> jours. Après ce maximum, la décroissance de la radioactivité spécifique permet de mesurer la synthèse d'ADN qui se produit dans la glande.

4. Avec des chenilles plus âgées (6<sup>e</sup> jour), on note essentiellement un ralentissement des divers processus.

Ces résultats sont comparés à ceux qu'on a obtenus *in vitro*.

---

### INTRODUCTION

L'étude de la synthèse d'ADN dans la glande séricigène du Ver à soie peut comporter l'emploi de méthodes diverses : dosages d'ADN (DAILLIE, 1965), études autoradiographiques après fourniture de thymidine radioactive (NIGON et coll., 1961 ;

(1) Ces recherches correspondent à une thèse (Lyon, 1967) enregistrée aux Archives originales du C.N.R.S. sous le numéro 1371.

GILLOT, 1967), etc. L'emploi de molécules marquées pour des études proprement chimiques sur l'organisme entier (DAILLIE, 1960) suppose l'éclaircissement préalable d'un certain nombre de problèmes qui concernent, en particulier, les mouvements du précurseur au sein de l'organisme dans son ensemble et son transfert au niveau du pool des précurseurs immédiats. Trois publications précédentes (DAILLIE, 1967, *a*, *b*, *c*) ont été consacrées à l'étude de ces problèmes sur les glandes séricigènes maintenues en survie, *in vitro*. Mais il est clair que les résultats ainsi obtenus ne sauraient être transposés, sans précaution, et directement assimilés, aux processus analogues qui se déroulent dans la glande *in situ*.

L'étude du métabolisme de la thymidine dans l'organe en place se heurte à de nombreuses difficultés.

D'une part, les conditions expérimentales ne peuvent être contrôlées que dans une faible mesure. Les chenilles, tout en provenant de lots traités de façon homogène, manifestent une variabilité individuelle notable.

D'autre part, les processus observés concernent, au moins en partie, l'ensemble de l'organisme et non plus un organe isolé. Aussi est-il impossible d'établir un bilan précis du métabolisme du précurseur au sein d'un organe.

Cependant, les données générales rassemblées sur l'utilisation de la thymidine par les glandes, *in situ*, méritent d'être examinées, puis discutées à la lumière des résultats obtenus *in vitro*.

## I. — TECHNIQUES

La souche de *Bombyx mori* employée et les conditions de son élevage ainsi que les méthodes d'analyse pratiquées, ont été définies précédemment (DAILLIE, 1967 *a*). Je ne préciserai donc ici que les aspects techniques propres à l'expérimentation sur l'animal vivant.

### 1. Fourniture du précurseur

On procède par injection dans l'hémocoèle au moyen d'une pipette - aiguille de verre dont la pointe, finement étirée, est affûtée en biseau. Le volume injecté est compris entre 5 et 25  $\mu$ l. Les écoulements de sang, toujours à redouter lorsqu'on perfore la cuticule d'un insecte, sont limités lorsqu'on introduit l'aiguille à la base d'une fausse-patte abdominale, dans une membrane articulaire.

### 2. Étude de l'hémolymphe

Le sang est collecté, au moment du sacrifice, par section d'une fausse-patte. On procède aux mesures de la radioactivité du sang en scintillation liquide (PACKARD). A des aliquotes de 0,1 ml, on ajoute 0,25 ml d'une solution molaire d'hydroxyde d'hyamine (PACKARD) dans le méthanol, puis 10 ml de la solution scintillante de FIELD et coll. (1961).

L'analyse par chromatographie des composés marqués solubles porte sur le sérum obtenu par chauffage de l'hémolymphe, au bain-marie bouillant, pendant 2 minutes, suivi d'une centrifugation.

### 3. Molécules marquées utilisées

Thymidine-méthyle- $^3\text{H}$  (6 700 mCi/mM) et thymidine-2- $^{14}\text{C}$  (25 mCi/mM) de *New England Nuclear Corp.*

## II. — ÉVOLUTION DE LA RADIOACTIVITÉ DU SANG APRÈS INJECTION DE THYMIDINE MARQUÉE

### A — Résultats

#### I. Étude de la radioactivité globale (fig. 1 et 2).

Les résultats obtenus avec des chenilles soumises à l'expérience au début du 4<sup>e</sup> jour du 5<sup>e</sup> âge indiquent :

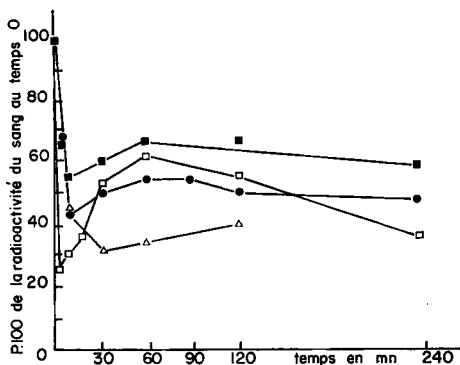


FIG. 1. — Évolution de la radioactivité de l'hémolymphe après injection de thymidine-méthyle-<sup>3</sup>H

● et □ : chenilles au 4<sup>e</sup> jour injectées avec  $3 \cdot 10^{-4}$   $\mu$ M de thymidine  
 △ : chenilles au 4<sup>e</sup> jour injectées avec  $3 \cdot 10^{-1}$   $\mu$ M de thymidine  
 ■ : chenilles au 6<sup>e</sup> jour injectées avec  $3 \cdot 10^{-4}$   $\mu$ M de thymidine  
 (Chaque point est la moyenne de 5 essais).

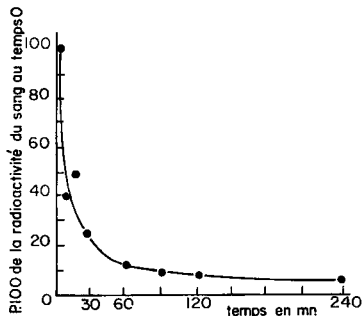


FIG. 2. — Évolution de la radioactivité de l'hémolymphe après injection de thymidine-2-<sup>14</sup>C  
 Chenilles au 4<sup>e</sup> jour injectées avec  $3 \cdot 10^{-1}$   $\mu$ M de thymidine (5 essais par point).

a) qu'en 10 minutes, la radioactivité du sang diminue de moitié, parfois même davantage, quel que soit le type de marqueur administré. La quantité injectée (de  $3 \cdot 10^{-1}$  à  $3 \cdot 10^{-4}$   $\mu$ M) ne semble pas non plus influencer nettement sur la vitesse de disparition de la radioactivité au cours des premières minutes.

b) Au-delà de 10 minutes, on observe, après injection de thymidine tritiée ( $3 \cdot 10^{-4}$   $\mu$ M), un retour de produits marqués dans le sang, pendant environ 1 heure; après quoi, le marquage diminue lentement (fig. 1). Pour une dose 100 fois plus élevée <sup>(1)</sup> on n'observe pas d'accroissement net mais plutôt une stabilisation de la radioactivité de l'hémolymphe; celle-ci s'établit 30 minutes après l'injection (fig. 1).

Avec la thymidine-2-<sup>14</sup>C ( $3 \cdot 10^{-1}$   $\mu$ M), la radioactivité du sang diminue de manière asymptotique (fig. 2).

c) Après 24 heures, dans tous les cas, la radioactivité résiduelle dans le sang est faible (5 à 10 p. 100 de la radioactivité initiale).

<sup>(1)</sup> Obtenue en ajoutant de la thymidine froide au produit marqué.

Avec des chenilles au 6<sup>e</sup> jour, la courbe (fig. 1) représentant l'évolution de la radioactivité dans le sang (injection de thymidine tritiée) n'est pas sensiblement différente de celles qu'on obtient avec des vers plus jeunes.

## 2. Nature des produits marqués présents dans le sang.

Outre la thymidine, on rencontre dans le sérum de l'hémolymphe, la thymine et deux composés non identifiés appelés  $X_0$  et  $X_1$ . La figure 3 précise la position de ces divers produits radioactifs après chromatographie sur papier.

a) La figure 4 A représente l'évolution, au cours du temps, de la répartition de la radioactivité entre les composés trouvés dans le sang, après injection de thymidine-méthyle-tritiée ( $3 \cdot 10^{-4}$   $\mu$ M).

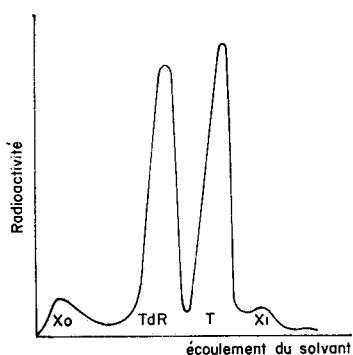


FIG. 3. — Position, après chromatographie sur papier, des composés radioactifs de l'hémolymphe Papier Whatman n° 1. Solvant : acétate d'éthyle-eau-acide formique (FINK et coll., 1956) Comptages d'après la méthode de NUNEZ et JAXQUEMIN (1961) TdR : thymidine ; T : thymine ;  $X_0$  et  $X_1$  : substances non identifiées.

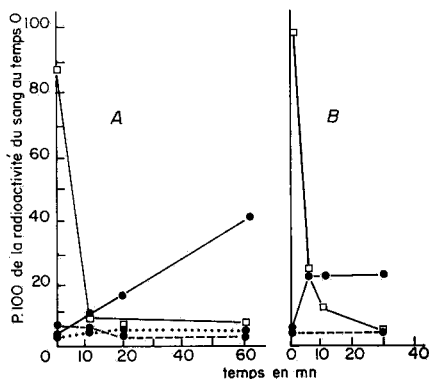


FIG. 4. — Évolution dans le temps des composés radioactifs de l'hémolymphe (4<sup>e</sup> jour)

A — Injection de thymidine-méthyle-<sup>3</sup>H ( $3 \cdot 10^{-4}$   $\mu$ M)

● — ● : thymine ; ● — ● :  $X_1$  ;

□ — □ : thymidine ; ● — ● :  $X_0$

B. — Injection de thymidine 2-<sup>14</sup>C ( $3 \cdot 10^{-1}$  M)

● — ● :  $X_0 + X_1$  ; □ — □ : thymidine ;

● — ● : thymine.

On remarque :

— que 10 minutes seulement après l'injection, 90 p. 100 de la thymidine ont disparu,

— que le composé  $X_0$  s'accumule dans le sang pendant la première heure. A ce moment, il représente environ 40 p. 100 de la radioactivité initiale,

— que la thymine et la substance  $X_1$  se maintiennent à des niveaux très faibles.

b) La figure 4 B correspond à une expérience identique réalisée avec la thymidine-2-<sup>14</sup>C ( $3 \cdot 10^{-1}$   $\mu$ M).

On voit que le nucléoside disparaît du sang à peu près à la même vitesse que dans le cas précédent, bien qu'il ait été administré en quantité 1 000 fois plus élevée.

Toutefois des différences apparaissent pour les autres composés marqués :

—  $X_0$  et  $X_1$  restent à l'état de traces,

— au contraire, la quantité de radioactivité liée à la thymine est multipliée par cinq, en 5 minutes, et se maintient ensuite à ce niveau. Elle représente près de 20 p. 100 de la radioactivité initiale.

Cependant l'observation du tableau 1 indique que dans la thymidine-2- $^{14}\text{C}$ , comme dans la thymidine tritiée, avant l'injection, la radioactivité se répartit à peu près de la même manière entre le nucléoside et les diverses impuretés.

TABLEAU I

*Analyse, avant injection, des solutions de thymidine employées*

Thymidine-méthyle- $^3\text{H}$  (6 700 mCi/mM) et thymidine-2  $^{14}\text{C}$  (25 mCi/mM)  
New England Nuclear Corp.

$X_0$  et  $X_1$  : composés non identifiés après chromatographie sur papier (cf. fig. 3)

Composés radioactifs isolés	Thymidine- $^3\text{H}$	Thymidine- $^{14}\text{C}$
Thymidine	93	95
Thymine	2	2,5
$X_0$	3	1,5
$X_1$	2	1
Total .....	100	100

### B — *Interprétation*

La radioactivité du sang diminue rapidement après l'injection, mais la mesure de la radioactivité globale ne donne qu'une idée imparfaite de la vitesse de disparition de la thymidine. En effet, l'hémolymph se charge de composés marqués qui proviennent de la métabolisation du précurseur. J'ai vérifié que le sang fraîchement recueilli est incapable de transformer la thymidine : c'est donc dans les tissus et organes de la chenille que ces dégradations se produisent.

La pénétration est un processus très rapide puisque près de 90 p. 100 de la thymidine radioactive injectée disparaissent en l'espace de 10 minutes. Il en résulte que la quantité de nucléoside disponible après cette période, sans être absolument négligeable, ne peut alimenter que de façon très limitée le pool des précurseurs intracellulaires.

On se trouve donc, en ce qui concerne le milieu intérieur, très proche des conditions d'un marquage « éclair ». Cette conclusion s'oppose à celle de BERREUR (1965) qui estime que, chez *Calliphora*, la thymidine reste disponible dans le sang de l'insecte à un niveau élevé pendant 12 heures. Toutefois cet auteur fonde sa thèse sur la mesure de la radioactivité globale de l'hémolymph en omettant l'analyse des produits de transformation inassimilables.

Un problème se pose quant à l'identification du produit principal de dégradation qui apparaît dans le sang. En effet, il diffère (localisation sur le chromatogramme, vitesse d'élimination du sang) selon que l'on administre la thymidine-méthyle-tritiée ou la thymidine-2-<sup>14</sup>C. *Avant injection*, quels que soient le lieu et la nature du marquage, la solution de thymidine employée contient toujours, en quantité équivalente, un peu de composé X<sub>0</sub> et de thymine (tabl. 1). Il apparaît ainsi que le produit qui s'accumule en marquage tritié (en restant sur le chromatogramme avec X<sub>0</sub>) ne possède pas le carbone 2 du cycle pyrimidique ; réciproquement, le composé de dégradation qui apparaît en marquage <sup>14</sup>C et possède le R<sub>f</sub> de la thymine, est différent de celle-ci et se trouve dépourvu de groupement méthyle.

FINK et coll. (1956) et EVANS et AXELROD (1961) ont défini les diverses voies du catabolisme de la thymine. D'après leurs indications, en admettant que la première étape du catabolisme de la thymidine est la production de thymine et en me fondant sur les migrations en chromatographie (FINK et coll., 1956) le composé méthyl-tritié qui reste au point de départ en compagnie de X<sub>0</sub> (fig. 3) pourrait être l'acide β-amino-isobutyrique (ou l'alanine) et le produit 2-<sup>14</sup>C qui se déplace avec la thymine, l'urée.

Il ne s'agit que d'une hypothèse parmi d'autres. On pourrait par exemple envisager qu'on se trouve en présence d'un effet isotopique (BAUGNET-MAHIEU et coll., 1966).

### III. — INCORPORATION DU PRÉCURSEUR DANS LES PRODUITS SOLUBLES DE LA GLANDE SÉRICIGÈNE PRÉLEVÉE AU 3<sup>e</sup> JOUR

Je n'ai procédé à une étude à peu près complète du mouvement des composés radioactifs dans la glande qu'après injection de thymidine tritiée (tabl. 2).

La radioactivité maximale accumulée dans le tube sécréteur est enregistrée, dès le premier point de mesure, soit 15 minutes après l'injection. Après quoi elle subit une diminution — spécialement entre 15 et 30 minutes — et atteint un palier.

TABLEAU 2

*Incorporation de la thymidine tritiée dans la glande séricigène au 3<sup>e</sup> jour du 5<sup>e</sup> âge*

Les chenilles reçoivent par injection 4μCi de thymidine-<sup>3</sup>H.

Fractionnement, dosages et comptages effectués à partir des glandes séricigènes (tubes sécréteurs) d'un seul animal (5 essais par temps)

Temps écoulé après l'injection de thymidine- <sup>3</sup> H	Radioactivité mesurée dans les différentes fractions en dpm/animal			Radioactivité totale en dpm/animal
	fraction « alcool »	acido-soluble	ADN	
15 minutes	138 623	93 126	69 975	301 724
30 minutes	88 574	71 961	98 550	259 035
1 heure	44 421	37 516	169 875	251 812
2 heures	39 999	14 276	199 350	253 625
4 heures	32 093	5 391	214 122	251 610

## A — La fraction « alcool »

## 1. Nature des composés radioactifs.

Quelques analyses effectuées par chromatographie (tabl. 3) précisent que dans la fraction « alcool », 15 et 30 minutes après l'injection, la thymidine tritiée n'est pas décelable tandis que la radioactivité se détecte sans difficulté aux niveaux  $X_0$ , thymine et  $X_1$  (fig. 3).

TABLEAU 3

Composés marqués de la fraction « alcool »

Analyse par chromatographie sur papier (cf. fig. 3)

 $X_0$  et  $X_1$  : substances non identifiées ; TdR : thymidine ; T thymine

Temps écoulé après injection	Distribution de la radioactivité p. 100 entre les divers produits isolés			
	$X_0$	TdR	T	$X_1$
15 minutes	55	0	40	5
30 minutes	53	0	23	24

La fraction « alcool » ne contient donc que des composés qui proviennent du catabolisme de la thymidine. On en conclura :

que la métabolisation du précurseur est extrêmement rapide dans la glande ;  
que dès 15 minutes après l'injection, la glande n'a plus la possibilité d'assurer le renouvellement de ses nucléotides radioactifs à partir du nucléoside qui est épuisé.

Ces remarques sont conformes à l'évolution de la radioactivité dans l'hémolymphe.

## 2. Origine des produits de dégradation contenus dans la glande.

Il est vraisemblable que la glande séricigène contribue à produire les composés de dégradation qui apparaissent dans le sang très rapidement (fig. 4 A). Le rejet initial que j'ai signalé (tabl. 2) et qui représente 1/6 de la radioactivité totale présente 15 minutes après l'injection, s'effectue en effet aux dépens de la fraction « alcool ». Aucune trace de nucléotides n'a pu être décelée dans le sang.

Cependant, l'importance de l'activité catabolique qui s'exerce sur la thymidine dans les cellules séricigènes est difficile à évaluer pour deux raisons au moins. D'une part, les échanges qui s'effectuent entre la glande et le sang dans les deux sens ne permettent pas de connaître l'entrée totale maximum. D'autre part, il n'est évidemment pas certain que les produits de dégradation rencontrés dans la glande prennent naissance en son sein ; ils peuvent aussi être fournis par le canal de l'hémolymphe.

Il est seulement possible d'affirmer, d'après les données du tableau 2, que les composés de dégradation présents dans la glande, représentent plus du tiers de l'entrée enregistrée 15 minutes après l'injection.

## B — La fraction acido-soluble

L'examen du tableau 2 montre que la radioactivité acido-soluble la plus élevée est enregistrée également dès le temps 15 minutes. Après 4 heures, il ne reste plus que 5 p. 100 de cette radioactivité.

Les résultats de la figure 5, obtenus lors d'une autre expérience, confirment que la phosphorylation de la thymidine entrée est très rapide : 15 minutes après l'injection du précurseur, la radioactivité de la fraction acido-soluble passe par un maximum. La radioactivité se trouve concentrée dans le TMP et le TDP tandis que le TTP marqué ne semble pas s'accumuler en quantité. Cette observation est conforme avec l'opinion déjà discutée (DAILLIE, 1967 a) selon laquelle la thymidine atteint l'état triphosphate en passant par le TMP et le TDP. La faible accumulation du TTP témoigne de son utilisation immédiate par l'ADN. Le précurseur, en effet, atteint

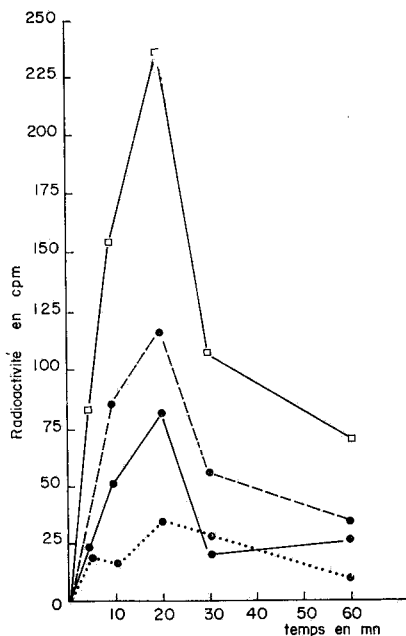


FIG. 5. — Évolution dans le temps de la radioactivité des trois nucléotides thymidyliques après injection de thymidine  $^3H$

Chenilles au 3<sup>e</sup> jour injectées avec 25  $\mu$ Ci de thymidine  $^3H$

La fraction nucléotidique est analysée par radiochromatographie (DAILLIE, 1967, a)

●.....● : TTP ; ●—● : TDP ; ●- - -● : TMP ; □—□ : ensemble des 3 thymidine-phosphates.

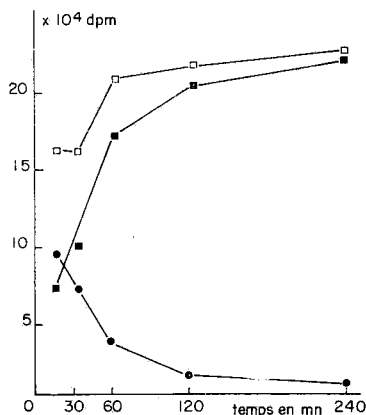


FIG. 6. — Incorporation de la radioactivité acido-soluble dans l'ADN, en fonction du temps, au 3<sup>e</sup> jour

Courbes tracées à partir des résultats du tableau 2

●—● : acido-soluble ; ■—■ : ADN ; □—□ : acido-soluble + ADN.

rapidement l'ADN, surtout pendant la première heure ; ensuite, le marquage se ralentit fortement. Une partie de la radioactivité qui atteint l'ADN entre 15 minutes et 4 heures ne paraît pas provenir des nucléotides radioactifs accumulés en 15 minutes (fig. 6). En effet, l'ADN gagne, dans cet intervalle de temps, environ 140 000 dpm



tandis que l'acido-soluble n'en fournit que 90 000. Or j'ai montré, d'une part, que la cellule séricigène ne contient pas de thymidine radioactive en réserve et, d'autre part, que la quantité de précurseur restant dans le sang après 10 minutes est des plus faibles (fig. 4 A).

Bien entendu, on peut penser que ce déficit n'est qu'apparent et reflète la très grande variabilité des diverses mesures. Mais il est possible également que la glande séricigène trouve encore dans le sang de la chenille la thymidine radioactive nécessaire. La quantité est suffisamment faible ( $\neq$  50 000 dpm) en regard des 9 millions de dpm injectées pour que l'hypothèse soit plausible ; la figure 4 A indique d'ailleurs qu'entre 10 minutes et 4 heures, le sang contient 5 à 10 p. 100 de la thymidine injectée.

Admettons :

1° qu'à partir de 15 minutes, soit après la période de charge massive du pool acido-soluble marqué (=  $P_r$ ), le pool total des précurseurs disponibles pour la synthèse d'ADN soit constant, c'est-à-dire que

$$P_r + P_e = K \quad (P_e = \text{pool endogène})$$

2° que pendant ce temps,  $P_r$  se renouvelle grâce à une entrée résiduelle de thymidine (immédiatement phosphorylée), supposée fixe et égale à  $q$  par unité de temps.

Dans ces conditions, la synthèse d'ADN s'effectuera au taux  $nK$  et l'utilisation du pool radioactif (fig. 6, courbe 1) sera

$$dP_r = (q - nP_r)dt = -n\left(P_r - \frac{q}{n}\right)dt$$

d'où :

$$\frac{dP_r}{P_r - \frac{q}{n}} = -n dt$$

en intégrant l'expression ci-dessus, il vient :

$$\text{Log} \left( P_r - \frac{q}{n} \right) = -nt + c \quad (1)$$

Dans cette relation, lorsque  $t \rightarrow \infty$ ,  $P_r \rightarrow \frac{q}{n}$

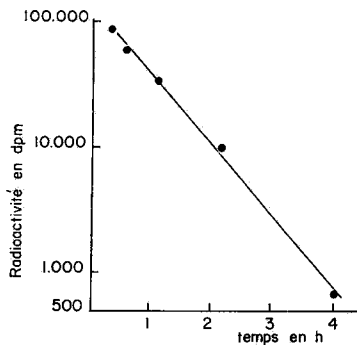


FIG. 7. — Décroissance de la radioactivité acido-soluble au 3<sup>e</sup> jour

Résultats du tableau 2 ajustés à la relation :

$$\text{Log} \left( P_r - \frac{q}{n} \right) = -nt + c.$$

On peut déterminer graphiquement une valeur de  $\frac{q}{n}$  qui permet d'obtenir une linéarisation des données expérimentales (fig. 7);  $n$  est peu différent de 0,6.

La relation (1) propose un modèle qui rend compte de la décroissance du pool radioactif. Elle présente aussi l'avantage de fournir une première approximation de la grandeur du pool endogène. En effet, la valeur  $n \neq 0,6$  indique que ce pool est renouvelé 0,6 fois par heure, donc qu'il permet près de deux heures de synthèse d'ADN.

Il s'agit d'une évaluation maximum car on ne tient pas compte, dans ce calcul, de l'existence, mise en évidence grâce aux études sur la glande incubée *in vitro* (DAILLIE, 1967 b), d'un compartiment de réserve séparé d'un compartiment actif. Une telle division des nucléotides marqués ne peut se révéler dans l'expérimentation sur la glande *in situ*: en effet, 15 minutes après l'injection de thymidine radioactive, le pool acido-soluble se trouve en phase de décharge. Il est probable que le compartiment actif incorpore rapidement les nucléotides de réserve, s'ils existent. Cette hypothèse est renforcée par l'analyse cinétique du marquage de l'ADN.

#### IV. — INCORPORATION DE LA THYMIDINE DANS L'ADN AUX 3<sup>e</sup> ET 4<sup>e</sup> JOURS DU 5<sup>e</sup> AGE

##### A — Dynamique et aspects quantitatifs de l'incorporation

##### 1. Cinétique du marquage (fig. 8).

La radioactivité spécifique de l'ADN passe par un maximum dans les premières heures qui suivent l'injection du précurseur; ensuite, elle décroît de façon lente. Le maximum est atteint entre 2 et 4 heures au 3<sup>e</sup> jour, entre 4 et 8 heures au 4<sup>e</sup> jour.

Le moment auquel l'activité spécifique de l'ADN passe par sa valeur maximale n'est pas déterminé avec précision en raison de la variabilité élevée des mesures.

Au 3<sup>e</sup> jour comme au 4<sup>e</sup> jour, certaines de ces expériences sont réalisées avec la thymidine-2-<sup>14</sup>C; dans ce cas, les doses administrées sont plus élevées que lorsque la thymidine tritiée est employée. On voit (fig. 8) que la dose injectée n'a pas de repercussion très nette sur la cinétique du marquage.

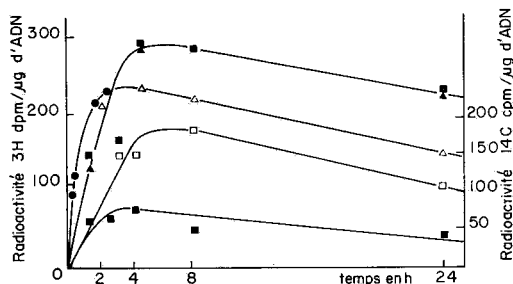


FIG. 8. — Incorporation de la thymidine radioactive dans l'ADN aux 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> jours du 5<sup>e</sup> âge

- $\Delta$  : injection de thymidine-<sup>3</sup>H au 3<sup>e</sup> jour  
(2 expériences; résultats exprimés pour 1  $\mu$ Ci)
- : injection de thymidine-2-<sup>14</sup>C au 3<sup>e</sup> jour (0,6  $\mu$ Ci)
- ▲ : injection de thymidine-<sup>3</sup>H au 4<sup>e</sup> jour  
(2 expériences; résultats exprimés pour 1  $\mu$ Ci)
- : injection de thymidine-2-<sup>14</sup>C au 4<sup>e</sup> jour (1  $\mu$ Ci).

## 2. Aspects quantitatifs du marquage.

La dose injectée influe sur la quantité de thymidine incorporée (tabl. 4). Celle-ci, pour les doses inférieures à  $10^{-2}$   $\mu\text{M}$  reste proportionnelle à la dose administrée. Si l'on accroît la dose, cette proportionnalité semble disparaître puisqu'en passant de  $42 \cdot 10^{-4}$   $\mu\text{M}$  à  $42 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{M}$ , l'entrée dans l'ADN est seulement 20 fois plus élevée. Une saturation du système paraît donc se produire ; toutefois, avec ces seuls résultats, on ne peut en préciser les limites.

Avec la plus forte dose de thymidine tritiée injectée à des chenilles au 4<sup>e</sup> jour, soit  $42 \cdot 10^{-4}$   $\mu\text{M}$  (tabl. 4), l'incorporation, pendant la première heure, ne rend compte que d'une synthèse d'ADN qui avoisine 0,25 p. 1 000 du contenu en ADN. Cette incorporation correspond à peu près à 2,5 p. 100 de la synthèse horaire totale (DAILLIE, 1965).

TABLEAU 4

*Variation de la quantité de thymidine incorporée dans l'ADN en fonction de la dose injectée*

Age des chenilles	Quantité de thymidine injectée ( $\times 10^{-4}$ $\mu\text{M}$ )	Quantité de thymidine incorporée dans l'ADN des glandes ( $\times 10^{-5}$ $\mu\text{M}/\text{animal}$ )	
		en 1 heure	en 4 heures
3 <sup>e</sup> jour	3,7 } ( <sup>3</sup> H)	0,75	
	6 } ( <sup>3</sup> H)	1,28	
4 <sup>e</sup> jour	9,2 } ( <sup>3</sup> H)	1,40	2,50
	42 } ( <sup>3</sup> H)	4,50	10
	4 200 } ( <sup>14</sup> C)		220

Le même calcul effectué après injection de thymidine-2-<sup>14</sup>C à forte dose (0,42  $\mu\text{M}$ ) indique une synthèse horaire de 6 p. 1 000, soit 60 p. 100 de la synthèse totale. Mais cette évaluation est calculée à partir de l'incorporation enregistrée 4 heures après l'injection. Il est donc vraisemblable qu'au début de l'expérience, la production d'ADN marqué s'approche davantage de la synthèse nette.

Ces résultats s'expliquent grâce aux conclusions tirées précédemment de l'analyse des produits solubles. La vitesse de disparition de la thymidine est rapide ; 15 minutes après l'injection du traceur, au 3<sup>e</sup> jour, le nucléoside n'est plus décelé dans la fraction « alcool » et la radioactivité de l'acido-soluble a atteint son niveau maximum. La vitesse de marquage de l'ADN, élevée au début, s'atténue très vite. Ces observations révèlent que les nucléotides formés sont immédiatement accessibles pour la synthèse d'ADN. Il est vraisemblable, si un compartiment de réserve se constitue pendant la brève période de charge, qu'il se trouve ensuite transféré à bref délai dans le pool d'utilisation. Par ailleurs, l'intensité du marquage de l'acide nucléique — et non sa cinétique — dépend de la quantité de précurseur injecté. Cette constatation va dans le même sens que les observations précédentes et prouve, de surcroît, que le précurseur se mêle à une réserve de précurseurs endogènes jusqu'à, sans doute, un niveau de saturation (non défini) pour les doses élevées.

Quant au marquage décroissant de l'ADN, il s'explique par l'épuisement progressif des nucléotides radioactifs.

### B — Évaluation de la synthèse nette d'ADN

Pendant la phase d'incorporation du précurseur dans l'ADN, l'évolution de celle-ci ne permet pas d'évaluer la synthèse nette d'ADN qui se produit dans la glande.

Au contraire, la vitesse à laquelle décroît l'activité spécifique de l'acide nucléique, après passage par le maximum, devrait permettre d'évaluer cette synthèse.

En supposant que le maximum de l'activité spécifique de l'ADN coïncide avec l'épuisement complet du pool des nucléotides marqués, on peut écrire, en procédant à une approximation simple :

$$Q_0 r_0 = (Q_0 + Q_{at}) r_t$$

$$\text{ou : } Q_{at} = Q_0 \left( \frac{r_0 - r_t}{r_t} \right) \quad (2)$$

relation dans laquelle

$Q_0$  = quantité d'ADN quand l'activité spécifique est maximale

$r_0$  = cette activité maximale

$Q_{at}$  = quantité d'ADN produite dans l'intervalle de temps  $t - t_0$

$r_t$  = activité spécifique de l'ADN au temps  $t$ .

La diminution de l'activité spécifique, entre le moment où elle atteint son niveau maximum et 24 heures après l'injection, est voisine de 30 p. 100 au 3<sup>e</sup> jour (2 expériences) et de 25 p. 100 au 4<sup>e</sup> jour (5 expériences).

Le calcul effectué à l'aide de la relation (2) conduit aux évaluations suivantes :

$$Q_{at_3} \approx 0,4 Q_0 \text{ au } 3^{\text{e}} \text{ jour en } 20 \text{ à } 22 \text{ heures}$$

$$Q_{at_4} \approx 0,3 Q_0 \text{ au } 4^{\text{e}} \text{ jour en } 16 \text{ à } 20 \text{ heures}$$

La synthèse horaire moyenne serait ainsi de l'ordre de 2 p. 100 au 3<sup>e</sup> jour et de 1,6 p. 100 au 4<sup>e</sup> jour.

Ces chiffres sont légèrement supérieurs aux estimations obtenues par dosages directs (DAILLIE, 1965). Étant donné la grande variabilité des résultats et le caractère approximatif de mes calculs, il serait prématuré de rechercher une signification particulière à ce fait.

### V. — MÉTABOLISME DE LA THYMIDINE AU 6<sup>e</sup> JOUR

La synthèse nette d'ADN est très réduite dans la seconde moitié du cinquième âge (DAILLIE, 1965). Les quelques résultats obtenus sur l'utilisation de la thymidine par la glande séricigène au 6<sup>e</sup> jour sont en accord avec cette constatation.

Le tableau 5 montre l'évolution du marquage de l'ADN après injection du précurseur. Il semble difficile de définir le moment auquel apparaît la radioactivité maximum, en raison de la grande variabilité des mesures individuelles. Malgré tout, il est

évident que l'incorporation se prolonge plus longtemps qu'aux 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> jour (fig. 8). Ce fait m'a conduit à examiner, par une autre expérience, l'évolution de la radioactivité dans les fractions solubles (tabl. 6).

TABLEAU 5

*Incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN de la glande séricigène au 6<sup>e</sup> jour du 5<sup>e</sup> âge*

Les chenilles reçoivent par injection 25  $\mu$ Ci de thymidine-<sup>3</sup>H (2 360 mCi/mM). Fractionnement, dosage, et comptages effectués à partir des glandes séricigènes (tubes sécréteurs) d'un seul animal (4 à 5 essais par temps).

Temps écoulé après l'injection de thymidine- <sup>3</sup> H	Radioactivité spécifique de l'ADN (dpm/ $\mu$ g)
1 heure	120
	175
	515
	155
	} 241
4 heures	330
	1 808
	389
	764
	419
	} 742
24 heures	927
	2 243
	1 008
	306
	148
	} 926
48 heures	575
	2 581
	1 075
	1 355
	1 355
	} 1396

Il apparaît :

— que l'activité maximale de la fraction nucléotidique n'est atteinte qu'à partir de 30 minutes,

— que 4 heures après l'injection, les glandes contiennent encore 20 p. 100, et après 24 heures, 5 p. 100 de cette radioactivité maximum.

Ainsi, la thymidine paraît subir la phosphorylation et s'incorporer plus lentement, ou pénétrer plus longtemps, qu'au 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> jour (tabl. 2).

En outre, le rapport entre la radioactivité soluble dans l'alcool et la radioactivité liée aux nucléotides s'accroît au 6<sup>e</sup> jour. Ce fait peut s'expliquer si l'on suppose que, en corrélation avec l'affaiblissement de la phosphorylation, la dégradation du précurseur se trouve accrue, par rapport aux observations faites à des stades plus jeunes (tabl. 2).

La disparition du traceur dans la fraction acido-soluble se déroule comme au 3<sup>e</sup> jour selon une loi de la forme

$$\text{Log} \left( P_r - \frac{q}{n} \right) = -nt + c$$

Toutefois, cette relation ne peut être établie que pour les 8 premières heures (fig. 9). Ce phénomène est dû, sans doute, à une réduction sensible de la synthèse d'ADN au cours même de l'expérience.

TABLEAU 6

*Évolution de la radioactivité incorporée dans les fractions solubles de la glande séricigène au 6<sup>e</sup> jour du 5<sup>e</sup> âge*

Les chenilles reçoivent par injection 10  $\mu\text{Ci}$  de thymidine- $^3\text{H}$ . Fractionnement et comptages effectués à partir des glandes séricigènes (tubes sécréteurs) d'un seul animal (5 essais par temps).

Temps écoulé après injection de thymidine- $^3\text{H}$	Radioactivité mesurée dans les fractions solubles en dpm/animal	
	fraction « alcool »	acido-soluble
15 minutes	261 650	98 530
30 minutes	187 320	106 310
1 heure	153 338	49 700
2 heures	110 418	28 864
4 heures	84 511	19 040
8 heures	36 386	6 984
24 heures	23 730	5 448
48 heures	15 442	2 400

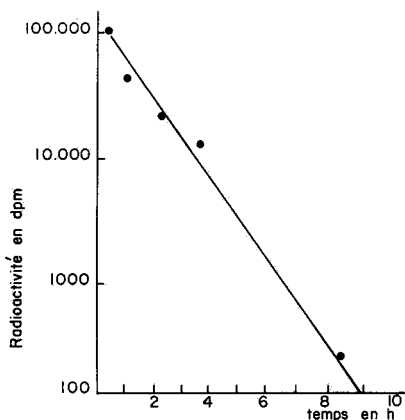


FIG. 9. — Décroissance de la radioactivité acido-soluble au 6<sup>e</sup> jour  
Résultats du tableau 6 ajustés à la relation :

$$\text{Log} \left( P_r - \frac{q}{n} \right) = -nt + c.$$

L'évaluation de  $n$  ( $\neq 0,4$ ) donne une indication sur la vitesse de renouvellement du pool endogène. Celui-ci assurerait plus de 2 heures de synthèse. Cette valeur, tout en étant peu différente de celle que j'ai obtenue pour des glandes plus jeunes, n'implique nullement que la réserve des précurseurs endogènes, au 6<sup>o</sup> jour, n'est pas réduite, puisque la synthèse d'ADN qui se produit alors n'est pas accessible au dosage direct (DAILLIE, 1965).

Cependant, par rapport à la thymidine radioactive qui atteint l'organe, ce pool endogène ne peut être négligé : la synthèse d'ADN marqué qui s'effectue durant les 4 premières heures de l'expérience (tabl. 5) représente seulement 0,06 p. 1 000, par heure, du contenu des glandes en acide nucléique. Or, j'ai montré, *in vitro*, que pour les doses saturantes de thymidine, l'incorporation rend compte d'une production d'ADN de 0,5 p. 1 000 à l'heure (DAILLIE, 1967, c), soit 8 fois plus qu'avec la dose utilisée *in vivo*. A moins d'admettre que la synthèse est accrue *in vitro*, cette différence ne peut s'expliquer que par la dilution du précurseur radioactif au sein du pool endogène.

## VI. — DISCUSSION

Les résultats ont été discutés au cours de l'exposé.

Je me bornerai donc maintenant à comparer les divers aspects du métabolisme de la thymidine dans la glande étudiée *in situ* et *in vitro*.

Par rapport aux conclusions tirées de l'analyse de la glande en survie (DAILLIE, 1967 a, b, c), les résultats qui viennent d'être examinés présentent des analogies mais également quelques différences.

Dans la glande jeune (3<sup>e</sup>-4<sup>e</sup> jour du 5<sup>e</sup> âge) étudiée *in vitro* ou dans l'organisme, on constate que l'entrée du précurseur est rapide, sa phosphorylation très active et qu'il existe des précurseurs endogènes en quantité importante par rapport aux doses de thymidine habituellement fournies. Dans les glandes prélevées plus tardivement, on observe un affaiblissement de l'utilisation du précurseur exogène qui témoigne de la réduction de la synthèse d'ADN à cette période.

Ce parallélisme permet de conclure que les processus essentiels de l'activité cellulaire sont conservés dans l'organe lorsqu'il se trouve privé de ses relations fonctionnelles avec l'ensemble de l'organisme et placé dans un milieu en grande partie artificiel.

Cependant, en survie, il apparaît des modifications de certains aspects du métabolisme de la thymidine dans la glande *in situ*. On observe, en particulier, lorsque la glande est incubée *in vitro* :

- le transfert d'une partie des nucléotides radioactifs vers le milieu d'incubation,
- l'absence ou, du moins, la réduction considérable des processus cataboliques,
- la division du pool des nucléotides radioactifs en deux compartiments cellulaires,
- la réduction sensible de la synthèse d'ADN et du pool des précurseurs endogènes.

La sortie des nucléotides hors des cellules n'a jamais été signalée, à ma connaissance, et ne semble pas se produire *in situ* ; ce processus risque de refléter une altération des propriétés de membranes, dans la glande incubée, due à une déficience du milieu employé.

L'apparition, dans l'organe en place, des produits de dégradation de la thymidine radioactive, n'implique pas, bien sûr, que ceux-ci soient produits dans la glande elle-même. Ils pourraient provenir d'autres organes, par l'intermédiaire du sang. Aucun argument sérieux, cependant, ne permet de tenir une telle hypothèse pour établie. En revanche, on peut supposer que le transfert des nucléotides radioactifs vers le milieu d'incubation, lorsque les glandes sont étudiées *in vitro*, modifie les conditions normales du métabolisme de la thymidine et donne à la voie anabolique la prépondérance, par le jeu d'un déplacement constant des équilibres enzymatiques.

L'existence d'un système complexe de compartimentation au sein du pool radioactif acido-soluble — tel qu'une partie seulement des nucléotides formés se trouve accessible à chaque instant, pour la synthèse d'ADN — n'est pas nécessairement caractéristique des glandes maintenues en survie. En effet, on peut admettre que, dans l'organe étudié *in situ*, cette division ne se manifeste pas car la production des nucléotides exogènes cesse rapidement, faute de thymidine. Cette situation se rapprocherait donc beaucoup des observations faites *in vitro*, dans les expériences de décharge (DAILLIE, 1967, *b*) ; or, dans ce cas, c'est justement l'échange de nucléotides avec le milieu extérieur qui révèle l'existence d'un compartiment de réserve.

Rappelons, enfin, que le transfert des nucléotides vers le milieu d'incubation risque de toucher également les nucléotides d'origine endogène (DAILLIE, 1967 *b*), de sorte que ce processus, à lui seul, peut expliquer que la synthèse d'ADN soit affaiblie *in vitro* par rapport à celle qui se déroule dans l'organe en place. Dans ces conditions, il n'est pas étonnant que l'estimation des réserves endogènes conduise à des valeurs moindres.

En définitive, la perméabilité des parois cellulaires vis-à-vis des nucléotides, dans la glande en survie, pourrait rendre compte de la plupart des différences qui se révèlent lorsqu'on compare les résultats obtenus *in situ* et *in vitro*.

## CONCLUSION

L'étude des processus qui déterminent et contrôlent la synthèse de l'ADN suppose qu'on est en mesure d'évaluer cette synthèse à un moment donné. Or, si la durée de l'expérience est brève, ou la quantité de matériel étudié, faible, une mesure directe est impossible et l'emploi de précurseur radioactif s'impose. Encore faut-il connaître les voies par lesquelles ce précurseur est utilisé, et les rapports qu'il établit avec les précurseurs endogènes.

Ainsi, un objectif apparemment simple soulève des problèmes plus ou moins difficiles qui nous obligent à étudier, finalement, une part notable d'un métabolisme cellulaire.

Pour ces raisons, j'ai dû examiner les diverses étapes de l'incorporation de la thymidine dans la glande séricigène. L'expérience a porté sur la glande en place ou maintenue en survie, *in vitro*. L'apport de ces deux méthodes est inégal en quantité comme en qualité. L'expérimentation *in vitro* permet une analyse fructueuse de l'ensemble des processus qui aboutissent à l'incorporation du précurseur dans l'acide nucléique. Mais des incertitudes subsistent quant à la valeur du milieu d'incubation employé et au niveau d'activité qu'il entretient dans les glandes. Les expériences



réalisées sur des organes en place permettent surtout de vérifier que la plupart des processus observés *in vitro* se déroulent aussi *in vivo*.

Les informations recueillies sont précieuses pour vérifier ou modifier le déroulement normal de la synthèse d'ADN et de ses précurseurs.

L'injection de thymidine *in situ* est équivalente à un marquage « éclair ». Toutefois, la grande variabilité des résultats, l'impossibilité de contrôler l'entrée et la sortie, fixent d'étroites limites à l'expérimentation sur la glande en place.

Les perspectives sont plus vastes avec les glandes explantées et incubées *in vitro*. La charge en précurseur radioactif pendant un temps court offre les mêmes avantages que le marquage réalisé *in situ*. Mais surtout, la situation obtenue *in vitro*, en phase de charge, assure un marquage régulier de l'ADN. C'est donc une condition qui peut être facilement exploitée pour comparer l'effet de divers traitements sur la synthèse d'ADN.

Les résultats apportés dans ce travail constituent un acquis indispensable pour entreprendre l'analyse de la fonction de l'ADN dans la glande séricigène. Nous disposons de méthodes qui permettent d'aborder, dans des conditions de milieu contrôlées, l'étude des processus de la synthèse de l'ADN et de sa régulation. Inversement, l'inhibition de cette synthèse, ou le blocage des sites actifs de l'ADN, devraient permettre de définir le rôle de ce dernier dans l'élaboration des macromolécules spécifiques, au sein de la glande séricigène.

*Reçu pour publication en mars 1967.*

## SUMMARY

### THYMIDINE METABOLISM IN THE SILKGLAND OF « BOMBYX MORI »

#### IV. — INVESTIGATIONS ON THE SILKGLAND « IN SITU »

1. The transport towards the silk gland of the nucleoside injected in the hæmocœl is very fast. At days 3 and 4, the main part of thymidine disappears from the hæmolymph within 10 to 15 minutes. This is due to an immediate metabolism of the nucleoside. At day 3, 15 minutes after the injection of a labelling dose of thymidine, radioactivity in the gland wholly appears as nucleotides or degraded compounds.

2. The radioactive nucleotides are soon incorporated to the utilization pool of endogenous precursors. It therefore appears possible to roughly equal the speed of disappearance of the labelled nucleotides to the speed of renewal of the endogenous pool, viz. 0.6 time per hour at day 3.

3. Under these conditions, the precursor is very quickly incorporated to DNA from the beginning of the experiment. The speed of labelling then slows down; the peak DNA radioactivity is reached within 2 to 8 hours, at days 3 and 4. Then, the decrease in specific radioactivity allows to estimate the DNA synthesis in the gland.

4. With older worms (day 6), we noticed a slowing up of the various processes. These findings are compared with our *in vitro* results.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAUGNET-MAHIEU L., GOUTIER R., SEMAL M., 1966. Isotopic discrimination between  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$  *in vitro* during enzymatic phosphorylation of labelled thymidine. *J. Labelled Compounds*, **2**, 77-89.
- BERREUR P., 1965. *Étude expérimentale de l'action de l'hormone de mu: sur l'évolution des acides nucléiques au cours de la métamorphose Calliphora erythrocephala* (MEIG.). *Insecte, Diptère*. Thèse, Paris.

- DAILLIE J., 1960. Incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN des glandes séricigènes chez le Ver à soie. *C. R. Acad. Sc.*, **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. Sc.*, **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
- 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<sup>e</sup> jour du 5<sup>e</sup> âge et incubée *in vitro*. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **7**, 347-354
- EVANS W. R., AXELROD B., 1961. Pyrimidine metabolism in germinating seedlings. *Plant Physiol.*, **36**, 9-13.
- 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 thymidine-methyl-<sup>14</sup>C or 2-<sup>14</sup>C by rat liver *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **221**, 425.
- GILLOT S., 1967. (en préparation).
- NIGON Y., LEGAY J.-M., NONNENMACHER J., 1961. L'incorporation de thymidine tritiée dans les glandes séricigènes de *Bombyx mori*. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **95**, 128-133.
- NUNEZ J., JACQUEMIN Cl., 1961. Comptage de radiochromatogrammes par scintillation liquide. *J. Chromatogr.*, **5**, 271-272.
-