

Expression du génome de la cellule séricigène de *Bombyx mori* au dernier stade larvaire

par P. COUBLE, Annie GAREL, J.-C. PRUDHOMME

avec la collaboration technique de Mme M.-A. GUÉRIN

Département de Biologie générale et appliquée,

Laboratoire associé au C.N.R.S. n° 92, Université Claude-Bernard Lyon-1

43, Boulevard du 11-Novembre-1918, 69622 Villeurbanne Cedex.

Summary. *Gene expression in Bombyx mori silk gland cells during the last larval instar.*

Poly (A)-containing RNA was isolated from the posterior silk gland of *Bombyx mori* just after the fourth molt, when the gland is not producing fibroin (stage V₀), and at the middle of the fifth larval instar, when the fibroin is massively synthesized (stage V₆). The hybridization kinetics of these mRNA with their complementary DNA (cDNA) were remarkably different. The mRNA from stage V₀ consisted of two abundance classes, comprising 38 and 2 915 different species, respectively. At stage V₆, fibroin mRNA (FmRNA) was separated from the rest of the poly (A)-containing RNA (F-mRNA) by centrifugation on sucrose gradients, and both preparations were analyzed separately. The kinetic complexity of FmRNA was very low as compared to its actual size. This result agrees with the existence of a short repetitive sequence accounting for 60 p. 100 of the molecule. Stage V₆ F-mRNA was resolved into four classes containing 1, 20, 319 and about 2 600 species, respectively.

We carried out cross-hybridization with each of the two cDNA classes from stage V₀ and stage V₆ F-mRNA. They demonstrated that almost all the sequences present at stage V₀ were also present at stage V₆, but that their abundance class distribution was modified.

Our data show that the specialization of the silk gland cell for fibroin production is characterized by massive accumulation of FmRNA and another unknown species, and that stage variations of mRNA populations are related to relative quantitative variations rather than to qualitative ones.

Introduction.

Au dernier stade larvaire, l'activité des cellules de la partie postérieure de la glande séricigène du Ver à soie s'oriente vers la production massive de la fibroïne qui représente alors environ 80 p. 100 de la synthèse protéique. A ce moment, la cellule séricigène présente des caractéristiques histologiques et biochimiques spécifiques. Celles-ci se traduisent par un développement intense des organites impliqués dans la synthèse (réticulum endoplasmique rugueux, RER) et le transport (appareil de Golgi) de la fibroïne. De plus, il y a accumulation de l'ARN messager de la fibroïne (mRNAF) (revue dans Prudhomme et Couble, 1979), ainsi que des macromolécules qui assurent le métabolisme des acides aminés et le fonctionnement de l'appareil de tra-

duction. Chez l'animal en sortie de dernière mue larvaire, environ 6 jours plus tôt, la situation est bien différente. La cellule a subi au cours de la mue d'intenses remaniements cellulaires qui ont abouti à la disparition quasi complète du RER et à la régression de l'appareil de Golgi (Tashiro *et al.*, 1968). Par ailleurs, le mRNF a été détruit presque totalement (Suzuki et Suzuki, 1974) et la cellule ne synthétise pas de fibroïne.

Il est ainsi possible de définir deux états fonctionnels bien différents : à la sortie de mue (stade noté V_0) la cellule n'exprime pas sa fonction spécifique alors qu'au milieu du dernier stade larvaire (stade V_6) sa spécialisation est maximale.

Si l'évolution quantitative du mRNF entre ces deux états est bien connue (revue dans Suzuki, 1975 et 1977), on ne connaît rien des variations des pools des autres mRNA, variations qui doivent *a priori*, rendre compte des modifications décrites ci-dessus qui accompagnent la spécialisation de la cellule dans la production de la fibroïne. C'est dans le but de définir ces variations et de rechercher s'il existe une « famille » de gènes impliqués dans la spécialisation cellulaire que nous avons entrepris l'étude des mRNA de la cellule séricigène aux deux stades précédemment définis (Couble, Garel et Prudhomme, 1981).

Matériel et méthodes.

Le détail des techniques mises en jeu, décrit par ailleurs (Couble, Garel et Prudhomme, 1981), est résumé ci-dessous.

Les Vers à soie utilisés sont des hybrides des races européennes 200 et 300. Ils sont élevés au laboratoire à 22 °C sur feuilles de mûrier.

Le RNA total est extrait selon une adaptation de la technique de Greene *et al.* (1975). Elle consiste en une extraction phénolique de l'homogénat de glande réalisé dans le tampon suivant : 30 mM Tris-Cl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, contenant 0,5 p. 100 de dodécyl-sulfate de sodium (SDS). Les mRNA polyadénylés sont obtenus par chromatographie sur colonne d'oligo (dT)-cellulose selon Aviv et Leder (1972), le RNA total étant chauffé pendant 2 min à 65 °C avant dépôt sur la colonne. Le mRNF est purifié par centrifugation sur gradient de saccharose, il sédimente à 47 S alors que la masse des autres mRNA (fraction notée F^-) sédimente en dessous de 28 S avec un mode à 15 S.

Les DNA complémentaires (cDNA) des mRNA sont obtenus par action de la « reverse transcriptase » dans les conditions d'Axel, Feigelson et Schütz (1976) avec les modifications développées par Myers et Spiegelman (1978). Le rendement de la réaction est de l'ordre de 11 p. 100 pour la fraction F^- , il est 8 fois moindre pour le FmRNA. L'hybridation cDNA-mRNA est effectuée selon Axel, Feigelson et Schütz (1976) dans un volume final de 100 μ l contenant 1 mM Tris-Cl (pH 7,5), 0,2 mM EDTA, 0,4 M NaCl et 0,1 p. 100 SDS. La concentration en cDNA est de 2-3 ng/ml et le rapport RNA/DNA n'est jamais inférieur à 20. Le comptage des hybrides est effectué après action de la nucléase S1 d'*Aspergillus oryzae* à la concentration de 1 000 unités/ml. La complexité des populations de mRNA a été calculée à partir des cinétiques d'hybridation en utilisant comme standard la complexité du mRNA d'ovalbumine (2 000 nucléotides) dont le R_0 † 1/2, dans nos conditions d'hybridation, est de $4 \cdot 10^{-4}$ (Hynes *et al.*, 1977).

Les classes d'abondance des cDNA sont fractionnées par hybridation jusqu'à la valeur de $R_0 t$ choisie et les hybrides sont séparés des cDNA non hybridés par chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite selon Hastie et Bishop (1976). L'analyse de la stabilité thermique des hybrides est effectuée également par chromatographie sur hydroxyapatite selon le protocole de Kemp (1975).

Résultats.

1. *Analyse de la complexité des mRNA au stade V_6 .* — Etant donné que le mRNA n'est pas copié par la « reverse transcriptase » avec le même rendement que les autres mRNA, ce qui est probablement dû à sa grande taille (16 000 nucléotides), nous avons analysé séparément la complexité du mRNA et celle de la fraction débarrassée de ce messager (fraction F⁻).

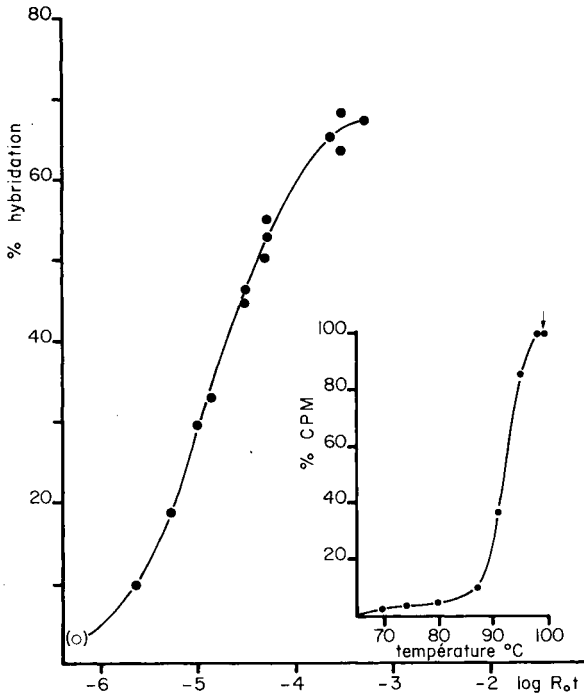


FIG. 1. — Hybridation du mRNAF avec le DNA complémentaire.

Le pourcentage d'hybridation est représenté en fonction du logarithme de $R_0 t$, produit de la concentration du mRNA (en moles de nucléotides/l) par le temps en sec. L'encart représente la courbe de dénaturation thermique de l'hybride ($T_m = 92,5$ °C).

La courbe d'hybridation du mRNAF avec son cDNA (fig. 1) montre une grande vitesse de réaction, le $R_0 t$ 1/2 de $2 \cdot 10^{-5}$ correspondant à une faible complexité, de l'ordre de 100 nucléotides, très inférieure à la taille du mRNAF. Cette remarquable vitesse d'hybridation est probablement due à l'existence d'une brève séquence répétitive à l'intérieur de la molécule (Suzuki et Brown, 1972). Une complexité cinétique

du même ordre — 65 nucléotides — a été obtenue par Morrow *et al.* (1977) dans des expériences de renaturation du gène de la fibroïne.

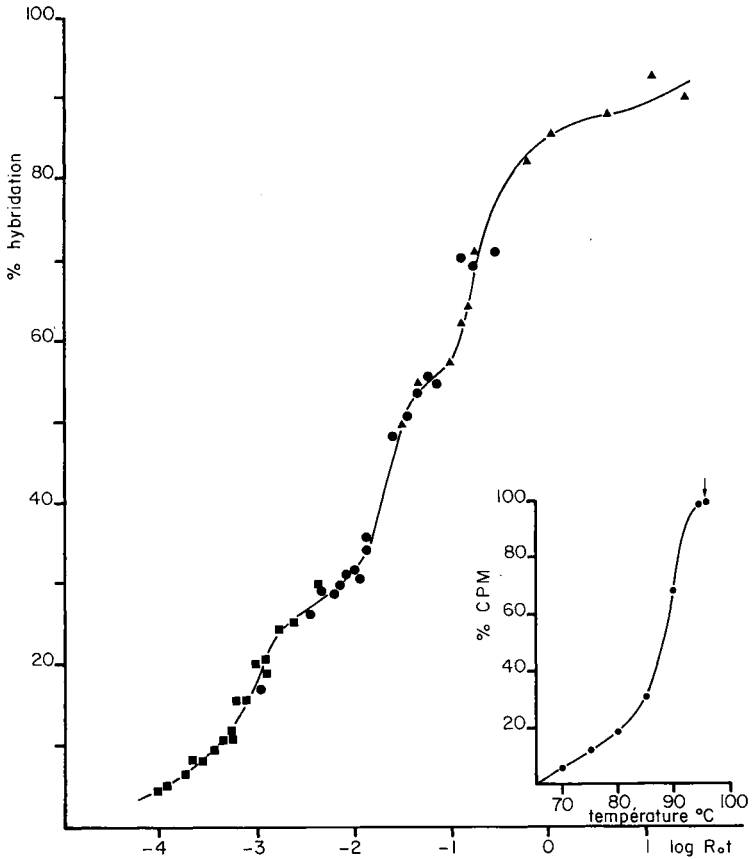


FIG. 2. — Hybridation du mRNA $V_6 F^-$ avec le DNA complémentaire. Même représentation que la figure 1. Les symboles (\blacksquare , \bullet , \blacktriangle) correspondent à différentes concentrations initiales de mRNA. La T_m est de 88 °C.

La cinétique d'hybridation de la fraction F^- avec son cDNA s'étend sur 5 ordres de grandeur, ce qui reflète l'extrême hétérogénéité de cette population (fig. 2). Trois classes d'abondance sont apparentes, elles contiennent respectivement 1, 20 et 319 espèces différentes. En fait, il existe une quatrième classe contenant environ 2 600 espèces qui ne représente qu'un faible pourcentage de cDNA et qu'on ne peut détecter que par hybridation hétérologue (voir plus loin).

2. *Analyse de la complexité des mRNA au stade V_0 .* — La cinétique d'hybridation obtenue (fig. 3) révèle l'existence d'une population de mRNA moins hétérogène qu'au stade V_6 puisque finalement deux classes d'abondance contenant respectivement 38 et 2 915 espèces différentes peuvent être mises en évidence.

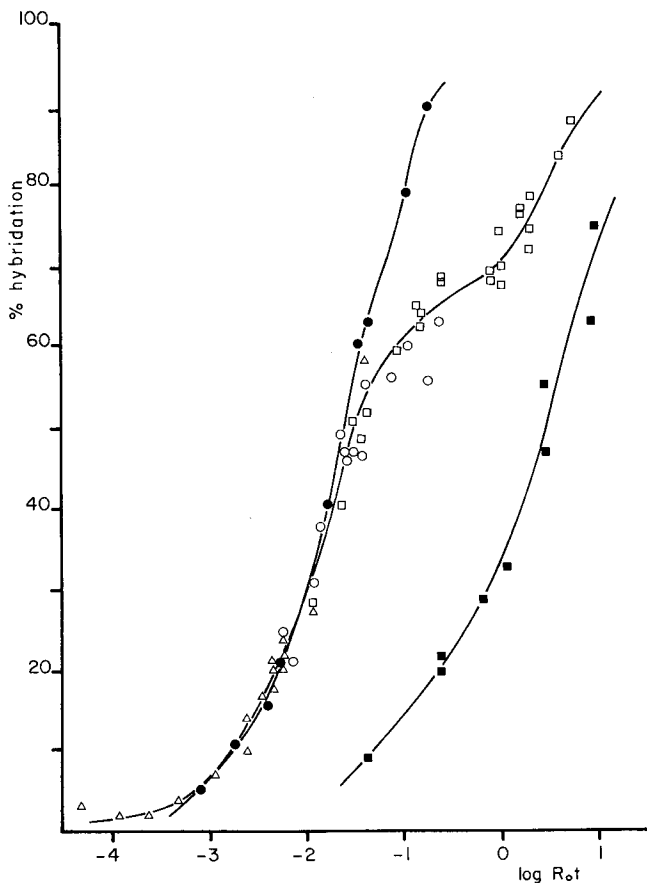


FIG. 3. — Hybridation du mRNA V_0 avec le DNA complémentaire.

Les symboles (Δ , \circ , \square) correspondent à différentes concentrations initiales. Les hybridations du mRNA V_0 avec les cDNA de chacune des deux classes, abondante et rare, sont respectivement représentées par les symboles (\bullet) et (\blacksquare).

3. *Hybridations hétérologues cDNA V_0 -mRNA V_6 .* — Les cDNA des deux classes d'abondance du stade V_0 ont été isolés et soumis à l'hybridation avec le mRNA F- du stade V_6 (fig. 4). Le cDNA de la classe abondante (à savoir 38 espèces) s'hybride à 95 p. 100 avec le mRNA F- V_6 , c'est-à-dire que la quasi-totalité des espèces de cette classe est présente également au stade V_6 . Elles s'y distribuent en deux classes représentant respectivement 25 espèces et 13 espèces qui s'hybrident à des R_0t 1/2 correspondant aux classes 2 et 3 du stade V_6 .

Le cDNA de la classe rare du stade V_0 s'hybride à 80 p. 100 avec une cinétique également biphasique. La première classe — environ 10 p. 100 soit 290 espèces — s'hybride au R_0t 1/2 de la classe 3. La seconde classe contenant au moins 2 600 espèces s'hybride à des valeurs de R_0t supérieures à celles qui sont observées dans l'hybridation homologue V_6 . C'est la mise en évidence de l'existence de la quatrième classe du stade V_6 .

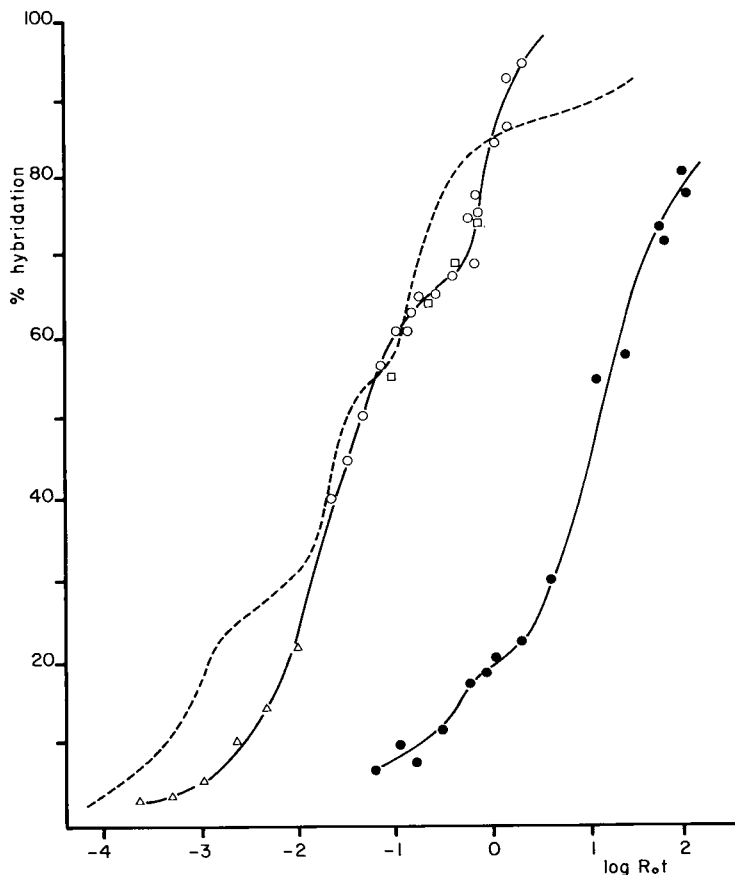


FIG. 4. — Hybridations croisées du mRNA $V_6 F^-$ avec les cDNA des deux classes du stade V_0 . Le mRNA $V_6 F^-$ a été hybridé avec le cDNA de la classe abondante (Δ , \square , \circ) et celui de la classe rare (\bullet) du stade V_0 . La courbe en pointillé représente l'hybridation homologue V_6 de la figure 2.

4. Présence du mRNF et de la classe 1 du stade V_6 au stade V_0 . — Le cDNA du mRNA de fibroïne a été hybridé avec le mRNA V_0 . La valeur de $R_0 t$ 1/2 obtenue correspond à la présence de ce mRNA dans la classe rare du stade V_0 .

Le cDNA de la classe 1 du stade V_6 a été isolé puis hybridé avec le mRNA V_0 . On constate alors qu'il s'hybride avec le $R_0 t$ 1/2 caractéristique de la classe abondante du V_0 .

Le tableau 1 récapitule l'ensemble des données acquises.

Discussion.

Il apparaît que l'ensemble des modifications histologiques et biochimiques qui accompagnent la spécialisation de la cellule dans la production massive de la soie est principalement sous-tendu par des variations quantitatives des espèces de mRNA présentes initialement. On observe notamment l'accumulation, à côté du mRNF, d'une autre espèce de fonction inconnue.

TABLEAU 1

Distribution des mRNA du stade V_0 dans les différentes classes d'abondance des mRNA du stade V_6

mRNA V_0		mRNA V_6	
Classes d'abondance	Nombre de séquences	Nombre de séquences	Classes d'abondance (mRNA F^-)
		1 (mRNA F^-)	
1	38	1*	1
		25	2
		13	3
		290	4
2	2 915	2 600	4

Ce tableau récapitule les données obtenues après exploitation des courbes présentées figure 4. Ainsi, le cDNA de la classe abondante du stade V_0 , représentant 38 espèces de mRNA, s'hybride avec le mRNA F^- du stade V_6 selon une cinétique définissant deux classes, estimées contenir respectivement 25 et 13 mRNA différents. De même l'hybridation hétérologue avec le cDNA de la classe rare du stade V_0 (2 915 mRNA) montre qu'il se répartit en deux classes de 291 et 2 600 espèces. La correspondance entre mRNA des stades V_0 et V_6 est établie par comparaison des cinétiques d'hybridation homologue et hétérologue.

* La présence de ce mRNA, particulièrement abondant au stade V_6 , dans la classe des mRNA abondants au stade V_0 , a été montrée en hybridant le mRNA V_0 avec le cDNA spécifique de cette espèce, purifié à partir du cDNA total V_6 .

Ces modifications quantitatives aboutissent à une distribution plus hétérogène des mRNA, ce qui se traduit par l'augmentation du nombre de classes d'abondance. On peut supposer que les mRNA qui voient leur importance relative augmenter sont impliqués dans la production de fibroïne, alors que le petit nombre d'espèces initialement abondantes qui diminue relativement, pourraient être caractéristiques d'autres processus, ceux de la mue par exemple.

L'hypothèse de travail qui se dégage est que la différenciation terminale de la glande séricigène est essentiellement le résultat d'une modulation quantitative de l'expression des gènes. Le clonage de cDNA des diverses classes devrait fournir le moyen d'étudier le niveau — transcriptionnel ou postranscriptionnel — où cette modulation intervient.

6^e Réunion du groupe Développement I.N.R.A.,
Clermont-Ferrand/Theix, 22-23 mai 1980.

Remerciements. — Ce travail a bénéficié d'un soutien financier du CNRS (ATP 3720) et de l'UER de Biologie Humaine de l'Université Claude Bernard. — Nous remercions le Docteur R. Axel pour ses suggestions et le Docteur D. Kurtz qui nous a aimablement fourni la reverse transcriptase.

Références

- AVIV H., LEDER P., 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidilic acid cellulose. *Proc. nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **69**, 1408-1412.
- AXEL R., FEIGELSON P., SCHÜTZ G., 1976. Analysis of the complexity and diversity of mRNA from chicken liver and oviduct. *Cell*, **7**, 247-254.
- COUBLE P., GAREL A., PRUDHOMME J.-P., 1981. Complexity and diversity of polyadenylated mRNA in the silk gland of *Bombyx mori*. Changes related to fibroin production. *Develop. Biol.*, **82** (sous presse).
- GREENE R. A., MORGAN M., SHATKIN A. J., GAGE P., 1975. Translation of silk fibroin messenger RNA in an Ehrlich ascites cell-free extract. *J. mol. Biol.*, **250**, 5114-5121.
- HASTIE N. D., BISHOP J. O., 1976. The expression of three abundance classes of messenger RNA in mouse tissues. *Cell*, **9**, 761-774.
- HYNES N. E., GRONER B., SIPPEL A. E., NGUYEN-HUU M. C., SCHUTZ G., 1977. mRNA complexity and egg white protein mRNA content in mature and hormone withdrawn oviduct. *Cell*, **11**, 923-932.
- KEMP D. J., 1975. Unique and repetitive sequences in multiple genes for feather keratin. *Nature*, **254**, 573-576.
- MORROW J. F., CHANG N. T., WOZNEY J. M., RICHARDS A. C., ESFRATIADIS A., 1977. In SCOTT W. A., WERNER R., *Molecular cloning in recombinant DNA*, 161-171, Acad. Press.
- MYERS J. C., SPIEGELMAN S., 1978. Sodium pyrophosphate inhibition of RNA-DNA degradation by reverse transcriptase. *Proc. nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **75**, 5329-5333.
- PRUDHOMME J.-C., COUBLE P., 1979. The adaptation of the silk gland cell to the production of fibroin in *Bombyx mori* L. *Biochimie*, **61**, 215-227.
- SUZUKI Y., 1975. Fibroin messenger RNA and its gene. *Adv. Biophys.*, **8**, 83-114.
- SUZUKI Y., 1977. Differentiation of the silk gland. A model system for the study of differential gene action, 1-44. In BEERMAN W., *Biochemical differentiation in insects glands*. Springer-Verlag, Berlin.
- SUZUKI Y., BROWN D. D., 1972. Isolation and identification of the mRNA for silk fibroin from *Bombyx mori*. *J. mol. Biol.*, **63**, 409-429.
- SUZUKI Y., SUZUKI E., 1974. Quantitative measurements of fibroin messenger RNA synthesis in the posterior silk gland of normal and mutant *Bombyx mori*. *J. mol. Biol.*, **88**, 393-407.
- TASHIRO Y., MORIMOTO T., MATSUURA S., NAGATA S., 1968. Studies of the posterior silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Cell Biol.*, **38**, 574-588.
-