

## ÉTUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DE L'INCORPORATION DANS LE FOIE DE SOURIS DE PRÉCURSEURS DES ACIDES NUCLÉIQUES ET DES PROTÉINES

par

A. FICQ\* ET M. ERRERA\*\*

*Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles (Belgique)*

Les méthodes autoradiographiques permettent de déceler dans les cellules les constituants qui ont été marqués par des radioisotopes<sup>4,7</sup>; les premiers résultats obtenus par ces méthodes s'étant montrés encourageants, il nous a paru utile d'étudier systématiquement le sort de certains précurseurs dans des tissus dont le métabolisme est déjà connu grâce aux méthodes biochimiques. C'est pourquoi nous avons choisi le foie de souris comme matériel expérimental; nous y avons étudié l'incorporation de divers précurseurs des protéines et des acides nucléiques.

Le but de toute méthode cytochimique étant d'identifier, de localiser et de doser certains constituants cellulaires, il importe d'utiliser comme marqueurs les précurseurs les plus spécifiques possibles de ces constituants. On peut, d'autre part, en adjoignant aux observations autoradiographiques des réactions cytochimiques destinées à fixer ou à éliminer les molécules marquées de façon spécifique, espérer arriver à les identifier avec une précision accrue. C'est pourquoi nous avons étudié l'effet de fixateurs variés sur des coupes d'organes fixés préalablement par congélation sous vide à basse température<sup>8</sup> ou par congélation-dissolution<sup>11</sup> parce que ces méthodes assurent au mieux la conservation dans la cellule des substances solubles.

Une série de coupes a donc été soumise telle quelle au processus autoradiographique; d'autres ont été traitées, avant l'application de l'émulsion sensible, par les solutions suivantes;

1. l'alcool acétique, qui est un fixateur fréquemment utilisé pour l'autoradiographie;
2. l'acide trichloracétique qui est utilisé par les biochimistes pour précipiter les protéines et les polynucléotides;
3. l'acétate de plomb qui a été proposé par TANDLER<sup>14</sup> comme un bon fixateur des nucléotides acidosolubles;
4. l'acide citrique a, en outre, été choisi parce qu'on l'utilise souvent pour isoler les noyaux cellulaires<sup>5</sup> et qu'il permet donc de comparer nos propres résultats avec les données obtenues dans le cas des tissus fractionnés par centrifugation différentielle et analysés par les méthodes usuelles de dosage des radioisotopes. Rappelons que MIRSKY<sup>1,3</sup> a observé que l'acide citrique extrait une proportion considérable des protéines du noyau cellulaire.

\* Chargée de Recherches au Fonds National de la Recherche scientifique.

\*\* Associé au Fonds National de la Recherche Scientifique.

Nous avons choisi, comme précurseurs, le glycolle-1-<sup>14</sup>C dont le carbone marqué fournit le C<sub>4</sub> des purines et qui s'incorpore aussi dans les protéines; l'adénine et la phénylalanine sont, par contre, des précurseurs plus spécifiques respectivement des purines et des protéines. On sait que si le foie n'est pas en régénération, l'acide désoxyribonucléique ne s'y marque pratiquement pas<sup>9</sup>.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons injecté à trois souris, par voie intrapéritonéale, du glycolle-1-<sup>14</sup>C, de l'adénine-8-<sup>14</sup>C et de la DL-phénylalanine-3-<sup>14</sup>C dissous dans du liquide physiologique. L'activité des différents précurseurs radioactifs utilisés était de 16  $\mu$ c dans le cas de la glycine et de 4  $\mu$ c dans celui de l'adénine et de la phénylalanine.

Les animaux ont été sacrifiés après 24 heures dans le cas du glycolle et de l'adénine et après 60 heures dans celui de la phénylalanine. Bien qu'il ne s'agissait pas de foie en régénération, nous avons choisi ces durées d'expériences parce que, après hépatectomie, la synthèse des purines est maxima après 24 heures et celle des protéines après 60 heures<sup>9</sup>. Les foies ont été prélevés et fixés à basse température sous vide par la technique de GERSH<sup>8</sup> ou par la méthode de congélation-dissolution décrite par LISON<sup>11</sup>. Des coupes d'environ 10  $\mu$  ont été effectuées et leur épaisseur a été vérifiée dans chaque cas à l'aide de la vis micrométrique du microscope, puisque la radioactivité observée est évidemment proportionnelle au volume du tissu. L'activité a été corrigée dans chaque cas et ramenée à une épaisseur uniforme de 10  $\mu$ .

Un certain nombre de coupes fixées et déparaffinées au xylol ont été ensuite soumises aux traitements suivants:

1. Alcool acétique (3/1 en volumes) pendant 10 minutes à 20°, suivi d'un lavage à l'éthanol 70° pendant 30 minutes.
2. Acide trichloracétique 10 % à 0° pendant 15 minutes, suivi de lavages répétés à l'éther.
3. Acétate de plomb 10 % acidifié par de l'acide acétique (1 % en volume) pendant 12 heures à 0°, suivi de plusieurs lavages à l'eau distillée, selon la méthode de TANDLER<sup>14</sup>.
4. Acide citrique 5 % (pH 3.4) à 0° pendant 12 heures, suivi d'un traitement pendant 2 heures par de l'acide trichloracétique à 10 %, puis d'un lavage à l'alcool-éther (3/1 en volumes).
5. Un certain nombre de préparations témoins n'ont été traitées par aucune solution.

Les préparations histologiques ont été recouvertes d'émulsion Ilford G5 "in gel form", puis révélées, fixées et colorées par le mélange d'Unna, suivant la méthode précédemment décrite<sup>7</sup>. Les lames ont été développées après 24 heures d'exposition dans le cas du glycolle et de l'adénine et après 48 heures dans celui de la phénylalanine.

Au moins mille cellules ont été comptées dans chaque cas et les traces des électrons émis par le <sup>14</sup>C (environ 300 traces pour 1.000 cellules habituellement) ont été dénombrées dans le cytoplasme et les noyaux des cellules parenchymateuses et des cellules de KUPFFER; elles ont été rapportées à la surface correspondant à chacun de ces éléments. Le diamètre moyen des noyaux des cellules parenchymateuses et des cellules de KUPFFER a été mesuré au moyen d'un micromètre. La surface du cytoplasme a été évaluée en mesurant la surface totale de tissu observée, dont on déduit la surface des noyaux et celle des espaces intercellulaires, qui peut être estimée à environ 1/5 de celle de l'ensemble des noyaux. Il n'a été tenu compte que des traces des électrons d'au moins 4 grains. Le "background" a été déterminé dans 20 champs de chaque lame; on a déduit de la radioactivité de chaque élément cellulaire, l'activité d'une surface correspondante de background. Le background des environs immédiats de la préparation histologique est environ 2 fois plus élevé que celui des régions qui en sont éloignées; il n'excède jamais 1 trace par champ microscopique de 16,000  $\mu^2$  et il correspond à environ 10 % de la radioactivité totale. Les résultats expérimentaux sont exprimés en nombre de traces pour 1,000  $\mu^2$  de tissu; il est donc possible, si l'on connaît les teneurs relatives des diverses fractions cellulaires en protéines et en acides nucléiques, de déterminer de façon approximative la valeur de la radioactivité spécifique.

Nous avons utilisé comme étalon de la radioactivité une suspension de cellules de levures marquées au <sup>14</sup>C, dont la radioactivité par cellule avait au préalable été déterminée au compteur Geiger. Une goutte de cette suspension a été déposée sur chacune des lames et le nombre de traces pour 500 cellules a été déterminé dans chaque cas. Cet artifice permet de vérifier la constance du processus de l'autoradiographie (épaisseur de l'émulsion photographique, durée de l'exposition et conditions de développement).

#### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau I, tandis que la microphotographie (Fig. 1) montre l'aspect d'une préparation de tissu traitée par cette technique.

TABEAU 1

	Expérience 1 Glycocolle				Expérience 2 Phénylalanine				Expérience 3 Adénine			
	Nombre de traces 10,000 $\mu^3$				Nombre de traces 10,000 $\mu^3$				Nombre de traces 10,000 $\mu^3$			
	Cyto- plasma	Noyaux	Noyaux cytopl.	Noyaux Kupffer	Cyto- plasma	Noyaux	Noyaux cytopl.	Noyaux Kupffer	Cyto- plasma	Noyaux	Noyaux cytopl.	Noyaux Kupffer
Alcool acétique	0.8	3.7	4.6	10.6					0.41*	1.8*	4.4	7*
	0.6	3.4	5.6	8.3	0.45*	1.8*	4.0	4.4*	0.51*	2.0*	5.6	7*
	0.7	4.0	5.6	10.0					0.36	1.14	3.7	15
Acide citrique	0.6	1.7	2.8	6.1	0.13*	0.4*	3.0	0.8*	0.36*	1.1*	3.0	4*
	0.7	1.9	2.7	3.8								
Acetate de plomb	0.4	3.3	8.5	5.3	0.35*	2.4*	7.0	3.5*	0.18*	1.05*	5.8	2.7*
	0.4	3.7	9.1	6.8					0.13	0.84	6.4	2.4
Acide trichloracétique	0.9	4.0	4.5	10.0	0.39*	1.5*	3.8	8.0*	0.16	0.9	5.6	3
	0.15	1.1	7.4	4.4					0.5*	3.6*	7.2	9.4*
									0.22	0.68	3.1	1.3

Les résultats marqués d'une astérisque concernent des tissus fixés par congélation-dissolution. Les autres résultats se rapportent à des tissus fixés par congélation-dessiccation.

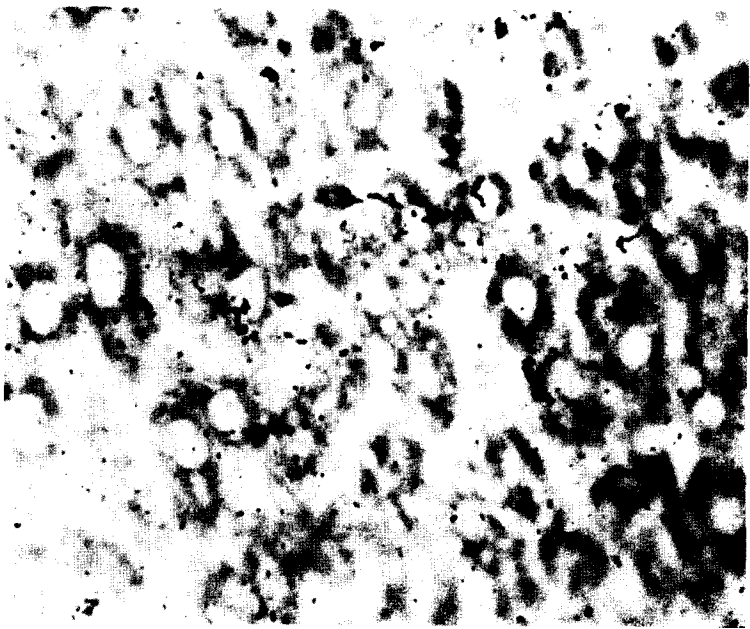


Fig. 1. Autoradiographie de tissu hépatique, coloré au mélange de Unna et photographié en lumière verte (les noyaux sont en clair et la basophilie cytoplasmique est très apparente).

On observe une radioactivité du même ordre de grandeur dans les coupes de l'animal tué 60 heures après l'injection de phénylalanine et dans celles de l'animal tué 24 heures après l'injection d'adénine. Mais, dans ce dernier cas, l'exposition de l'émulsion photographique n'était que de 24 heures alors qu'elle était de 48 heures dans le premier. On peut en conclure que l'incorporation de la base purique dans les nucléotides est plus

rapide que celle de l'acide aminé dans les protéines, puisque la radioactivité de la solution injectée était la même. On avait injecté une dose de radioactivité quatre fois plus élevée pour le glycocolle; il n'est donc pas étonnant d'observer une radioactivité spécifique plus élevée dans son cas.

Le traitement par l'alcool acétique ou par l'acide trichloracétique semble conserver une activité comparable dans le cas du glycocolle et dans celui de la phénylalanine; dans le cas de l'adénine, l'alcool acétique conserve deux fois plus d'activité que l'acide trichloracétique. Le témoin fixé par simple congélation-dissolution demeure cependant le plus actif. En général, la fixation par l'acétate de plomb entraîne une perte de radioactivité dans le cas des 3 isotopes utilisés; elle se manifeste surtout dans le cytoplasme; il faut en conclure que, dans le cas de l'adénine, la fixation des nucléotides n'est certainement pas quantitative. Le traitement par l'acide citrique s'accompagne d'une diminution notable de la radioactivité principalement au niveau des protéines (expériences 1 et 2); les noyaux cellulaires peuvent perdre jusqu'à 75% de leur activité (expérience 2). Une fraction des protéines cytoplasmiques semble également être éliminée par ce traitement. Il s'agit vraisemblablement de protéines basiques parce que, dans ce cas, la basophilie des nucléoles et celle du cytoplasme sont particulièrement évidentes.

La radioactivité des noyaux est 4 fois plus élevée que celle du cytoplasme, tant en ce qui concerne les protéines que les nucléotides; les noyaux des cellules de KUPFER semblent très actifs dans tous les cas observés.

#### DISCUSSION

Il ressort des résultats qui ont été rassemblés dans le Tableau I que les noyaux hépatiques incorporent plus de glycocolle, d'adénine et de phénylalanine que le cytoplasme, par unité de volume.

Mais il importe, avant de discuter ce résultat, d'examiner les causes d'erreurs techniques qui peuvent intervenir au cours de ces déterminations.

Considérons d'abord les erreurs que l'on peut commettre en ce qui concerne la localisation de l'origine cellulaire de la radioactivité. Le diamètre apparent des noyaux hépatiques est de l'ordre de 10  $\mu$ . Le diamètre d'un grain d'AgBr est de l'ordre de 0,5  $\mu$ ; la distance entre les tout premiers grains est de 1 à 0,5  $\mu$ . La perte de premiers grains d'une trace pourrait donc occasionner une erreur assez considérable dans la localisation de son point d'origine. Cette erreur peut, cependant, être négligée car le développement photographique de toutes les plaques a été homogène dans toute la profondeur de l'émulsion (environ 40  $\mu$  d'épaisseur d'émulsion sèche). Une autre erreur de localisation pourrait résulter du phénomène de "back-scattering" (l'électron peut effectuer un certain parcours dans le tissu et dans le verre du porte-objet avant de pénétrer dans l'émulsion sensible); il serait possible d'évaluer cette erreur en utilisant des porte-objets constitués par des éléments légers (matières plastiques) ou lourds (verres riches en plomb) qui diminueraient ou exagéreraient son importance. Il semble toutefois que des erreurs de ce type doivent jouer plutôt en défaveur des noyaux, puisqu'ils représentent la surface la plus petite. Cependant, si la zone cytoplasmique périnucléaire était particulièrement active, on risquerait d'attribuer aux noyaux un nombre trop considérable de traces; or on sait que cette zone est particulièrement basophile et qu'elle est donc riche en microsomes. Ces particules constituent précisément la fraction qui incorpore le plus intensément les précurseurs des acides nucléiques et des protéines.

tant *in vitro*<sup>10,13</sup> que *in vivo*<sup>2</sup>. Cependant, selon ces mêmes auteurs<sup>2,10,13</sup>, la fraction nucléaire incorpore aussi très activement les précurseurs des protéines et des nucléotides. Il semble donc que les valeurs élevées trouvées pour les noyaux des cellules parenchymateuses et, plus encore, pour ceux des cellules de KUPFFER soient significatives. Le rapport entre l'incorporation des précurseurs dans le noyau et dans le cytoplasme est du même ordre de grandeur, quel que soit le précurseur considéré (Tableau I). SMELLIE et ses collaborateurs<sup>13</sup> ont observé, par des méthodes biochimiques, un enrichissement en <sup>15</sup>N plus élevé dans l'ARN et les protéines du noyau que dans les mêmes constituants du cytoplasme total.

D'après SCHNEIDER<sup>12</sup> la teneur en protéines et en ARN du noyau est environ 10% de celle du cytoplasme. Nos estimations montrent que le rapport nucléo-cytoplasmique des cellules hépatiques correspond à 0.1, ce qui concorde avec les observations de ALLFREY *et al*<sup>1</sup>.

Pour que les valeurs consignées dans le Tableau I représentent des radioactivités spécifiques, il faudrait que la concentration en protéines et en acides nucléiques soient identiques dans le noyau et dans le cytoplasme. Ceci semble approximativement exact en ce qui concerne les protéines<sup>12</sup>; mais l'ARN est, d'après MIRSKY<sup>1</sup>, deux fois moins concentré dans les noyaux que dans le cytoplasme.

Remarquons que les valeurs que nous avons observées par autoradiographie tendent à mettre l'accent sur le métabolisme particulièrement élevé des noyaux. Cette conclusion reste valable, que les tissus soient seulement congelés et desséchés, ou qu'ils soient ensuite fixés par l'alcool acétique ou par l'acide trichloracétique. Dans le cas de l'adénine, l'acide trichloracétique élimine, semble-t-il, une proportion assez considérable de nucléotides marqués, tant dans le noyau que dans le cytoplasme. Nous avions espéré fixer quantitativement les nucléotides acidosolubles en les précipitant à l'aide d'acétate de plomb, comme le préconise TANDLER<sup>14</sup>: le rapport d'incorporation nucléocytoplasmique est en effet plus marqué dans ce cas; mais il résulte d'une perte de radioactivité dans le cytoplasme, tant en ce qui concerne les protéines que les acides nucléiques. Il en résulte donc, et ceci est particulièrement évident dans le cas de l'adénine, que l'acétate de plomb ne fixe pas les nucléotides acidosolubles de manière quantitative. Enfin, le fait que la plupart des auteurs aient trouvé, par voie biochimique, une activité de la fraction nucléaire relativement moins élevée que celle que nous observons, résulte vraisemblablement de l'utilisation d'acide citrique comme milieu d'isolement: cet acide extrait, en effet, jusqu'à 75% de l'activité due aux protéines et près de 50% de celle due aux nucléotides.

MIRSKY<sup>1</sup> observe également que l'acide citrique peut enlever jusqu'à 55% des protéines du noyau, principalement des histones; ce fait explique la basophilie accrue des nucléoles, que nous avons observée. La baisse de la radioactivité due aux nucléotides, à la suite d'un traitement prolongé à l'acide citrique, ne peut s'expliquer que par une hydrolyse lente des bases puriques ou des polynucléotides. Ajoutons, d'autre part, que l'acide trichloracétique, même à froid pendant 15 minutes, élimine une certaine proportion des nucléotides qui ont incorporé de l'adénine. Il est difficile d'expliquer, à l'heure actuelle, pourquoi une même extraction ne s'observe pas quand la glycine est utilisée comme précurseur. Peut-être y a-t-il une incorporation plus élevée d'adénine que de glycine dans les petits nucléotides. Dans le cas des protéines, la diminution de la radioactivité, après traitement à l'acide trichloracétique, est négligeable et elle est de l'ordre des erreurs expérimentales.

Nos résultats indiquent que la méthode autoradiographique est susceptible d'apporter des renseignements d'ordre quantitatif. Il serait toutefois désirable de trouver un mode de fixation qui soit à l'abri de toute critique et qui modifie le moins possible la constitution du tissu. La méthode de congélation-dissolution semble, à ce point de vue, offrir un net avantage, en tous cas, en ce qui concerne la fixation des nucléotides. Cette conclusion concorde avec les observations de DAVIES et WALKER<sup>15</sup>, faites par microspectrophotométrie d'absorption. Ajoutons que les images cytologiques obtenues par ce mode de fixation sont excellentes.

### RÉSUMÉ

Nous avons étudié, par autoradiographie, l'incorporation *in vivo* dans le foie de souris de glycine-1-<sup>14</sup>C, de DL-phénylalanine-3-<sup>14</sup>C et d'adénine-8-<sup>14</sup>C. La méthode est quantitative et les résultats concordent avec ceux obtenus par les méthodes biochimiques usuelles. Toutefois, dans le cas des trois précurseurs utilisés, nous avons trouvé une activité métabolique des noyaux hépatiques d'environ 4 fois supérieure à celle du cytoplasme. Les noyaux des cellules de KUPFFER ont une activité encore plus considérable.

Nous avons étudié de manière systématique par la même technique les propriétés des divers fixateurs histologiques.

### SUMMARY

The *in vivo* incorporation of glycine-1-<sup>14</sup>C, DL-phenylalanine-3-<sup>14</sup>C and adenine-8-<sup>14</sup>C in mouse liver has been studied by radioautography. Results may be given quantitatively and are in fair agreement with those obtained by the usual biochemical methods. However, in the case of all three precursors, we have found a metabolic activity of the nuclei of liver cells about 4 times that of the cytoplasm. The nuclei of the KUPFFER cells have a still greater activity.

We have investigated systematically by the same technique the properties of various fixatives.

### ZUSAMMENFASSUNG

*In vivo* wurde der Einbau von Glycin-1-<sup>14</sup>C, DL-Phenylalanin-3-<sup>14</sup>C und Adenin-8-<sup>14</sup>C in die Leber der Maus mittels der Radioautographie untersucht. Die Methode liefert quantitative Ergebnisse, die mit denen der gewöhnlichen biologischen Methoden übereinstimmen. Jedoch fanden wir im Falle der drei verwandten Vorläufer in den Kernen der Leberzellen eine viermal so hohe Aktivität wie im Zellplasma. Die Kerne der KUPFFER'schen Sternzellen haben eine noch grössere Aktivität. Mit der gleichen Technik haben wir die Eigenschaften verschiedener histologischer Fixierungsmittel systematisch untersucht.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> V. ALLFREY, H. STERN, A. E. MIRSKY ET H. SAETREN, *J. Gen. Physiol.*, 35 (1952) 529.
- <sup>2</sup> H. BORSOOK, C. L. DEASY, A. J. HAAGEN-SMIT, G. KEIGHLEY ET P. H. LOWY, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 309.
- <sup>3</sup> M. M. DALY, V. ALLFREY ET A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 36 (1952) 173.
- <sup>4</sup> I. DONIACH, A. HOWARD ET S. R. PELC, *Progress in Biophysics*, 3 (1953) 1.
- <sup>5</sup> A. L. DOUNCE, G. H. TISCHKOFF, S. R. BARNETT ET R. M. FREER, *J. Gen. Physiol.*, 33 (1949) 629.
- <sup>6</sup> N. H. ELIASSON, E. HAMMARSTEN, P. REICHARD, S. ÅQUIST, B. THORELL ET G. EHRENSVÄRD, *Acta Chem. Scand.*, 5 (1951) 431.
- <sup>7</sup> A. FICQ, F. GAVOSTO ET M. ERRERA, *Exper. Cell Res.*, 6 (1954) 69 et 238.
- <sup>8</sup> I. GERSH, *Anat. Rec.*, 70 (1938) 311.
- <sup>9</sup> E. HAMMARSTEN, *Ciba Symposium. Conf. on Isotopes in Biochemistry*, (1951) 203.
- <sup>10</sup> T. HULTIN, *Exper. Cell Res.*, 1 (1950) 376.
- <sup>11</sup> L. LISON, *Histochimie et Cytochimie animales*. Gauthier-Villars, Paris, 2e Edit. (1953) 29.
- <sup>12</sup> W. C. SCHNEIDER, *Cancer Res.*, 6 (1946) 685.
- <sup>13</sup> R. M. S. SMELLIE, W. M. MACINDOE ET J. N. DAVIDSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 559.
- <sup>14</sup> C. J. TANDLER, *Arch. Histol. norm. y pathol.*, 4 (1951) 275.
- <sup>15</sup> P. M. B. WALKER, communication personnelle.

Reçu le 13 août 1954