

Reçu le 27 février 1964.

CONTRIBUTIONS A LA BIOCHIMIE DU VER A SOIE
XXVIII. BIOSYNTHESE DE TRÉHALOSE
A PARTIR DU PYRUVATE

PAR

S. BRICTEUX-GRÉGOIRE, Ch. JEUNIAUX et M. FLORKIN
(Institut Léon Fredericq, Biochimie; Université de Liège)

Introduction

La notion selon laquelle le glycogène du tissu adipeux peut être une source du tréhalose de l'hémolymphe des Insectes est étayée par plusieurs observations. Quand un extrait de *corpora cardiaca* de *Periplaneta americana* est injecté à des adultes de cette espèce, le tréhalose de l'hémolymphe augmente, tandis que le glycogène du tissu adipeux diminue (STEELE, 1963). Les modifications du glycogène du tissu adipeux de *Bombyx mori* observées par SAITO (1963) dans diverses conditions expérimentales concordent avec la même notion. D'autre part, chez les vers à soie, nous avons observé (DUCHÂTEAU-BOSSON, JEUNIAUX et FLORKIN, 1963) que la teneur en tréhalose de l'hémolymphe augmente à la fin de chaque âge larvaire, peu avant la mue; cette augmentation est synchronisée avec une diminution du poids du tissu adipeux et de sa teneur en glycogène. Le tréhalose ainsi fourni à l'hémolymphe est, au cours de la mue, hydrolysé en glucose, par suite de la levée de l'inhibition de la tréhalase de l'hémolymphe, et le glucose est utilisé par l'épiderme, notamment pour la biosynthèse de la chitine. Le tissu adipeux ne possède pas de glucose-6-phosphatase, mais il contient un système enzymatique propre aux Insectes, qui assure la conversion du G-6-P en tréhalose-P (CANDY et KILBY, 1961). Le rôle hypertréhalosémiant de l'hormone des *corpora cardiaca* résiderait dans une activation de la voie métabolique glycogène : G-1-P : G-6-P : tréhalose (STEELE, 1963).

L'UDPG agit comme donneur de glucose dans la synthèse du tréhalose (CANDY et KILBY, 1959) et la présence d'UDPG a été

mise en évidence d
WYATT, 1960). L'in
muscles de *Schistoc
LONI, 1960). C'est a
on étudie la form
constate qu'une ad
glycogène (comme
déprime, avec pou
(TRIVELLONI, 1960)
compétition enzym
VARDANIS (1962)*

l'activateur de l'
observations, on do
et du tréhalose doit
par les concentratio
du glycogène, et du

Toutefois, on ne
sémie pourrait s'ali
sans passage par le
convenable.

C'est dans le but
du tréhalose et du
tuelle synthèse de c
au ^{14}C , chez le ver

Deux lots de ver
été anesthésiés à l'é
la paroi d'une fauss
d'une solution aqu
3.36 mC/millimole
soit 0.77 microcuri
injecté de la même
pyruvate- ^{14}C (act
larve a reçu 65 μg

Après chaque inj
vers à soie ont été
heures après l'injec

Reçu le 27 février 1964.

BIOCHIMIE DU VER A SOIE LE RÔLE DE LA TRÉHALOSE ET DU PYRUVATE

J. JEUNIAUX et M. FLORKIN

(Université de Liège)

Le tissu adipeux peut être synthétisé chez le Bombyx mori. L'incubation d'UDPG-¹⁴C avec des extraits de muscles de *Schistocerca* a fourni du glycogène marqué (TRIVELLONI, 1960). C'est aussi le cas avec le G-1-P marqué. Mais quand on étudie la formation de glycogène à partir d'UDPG, on constate qu'une addition de G-6-P n'active pas la formation de glycogène (comme chez les Mammifères) mais au contraire la déprime, avec pour conséquence la formation de tréhalose (TRIVELLONI, 1960). C'est vraisemblablement le résultat d'une compétition enzymatique.

VARDANIS (1962) a montré, chez *Periplaneta*, que le G-1-P est l'activateur de l'UDPG-glycogène transglucosylase. De ces observations, on doit conclure que la biosynthèse du glycogène et du tréhalose doit être réglée dans le tissu adipeux des Insectes par les concentrations relatives du G-1-P, favorisant la synthèse du glycogène, et du G-6-P, favorisant la synthèse du tréhalose.

Toutefois, on ne doit pas perdre de vue le fait que la tréhalosémie pourrait s'alimenter à une synthèse directe du tréhalose, sans passage par le glycogène, dans les conditions d'alimentation convenable.

C'est dans le but de préciser les voies métaboliques possibles du tréhalose et du glycogène que nous avons recherché l'éventuelle synthèse de ces deux sucres à partir de pyruvate marqué au ¹⁴C, chez le ver à soie à la fin de la période larvaire.

Le rôle du tréhalose dans la synthèse du glycogène : G-1-P :

Matériel et méthodes

Deux lots de vers à soie au 10^e jour du 5^e âge larvaire ont été anesthésiés à l'éther. A chaque larve du premier lot, à travers la paroi d'une fausse patte, on a injecté dans l'hémocoel 0.1 ml d'une solution aqueuse de pyruvate-1-¹⁴C (activité spécifique : 3.36 mC/millimole ; chaque larve a reçu 25 µg de pyruvate, soit 0.77 microcurie). A chaque larve du deuxième lot, on a injecté de la même manière 0.1 ml d'une solution aqueuse de pyruvate-2-¹⁴C (activité spécifique : 2.96 mC/millimole ; chaque larve a reçu 65 µg de pyruvate, soit 1.75 microcuries).

Après chaque injection, la fausse patte a été ligaturée et les vers à soie ont été maintenus à la température de 26° C. Quatre heures après l'injection, le sang de chaque larve a été prélevé

es tissus adipeux ont été
a loupe binoculaire, lavés
rsiologique pour Insectes,
lot 2.4 ml de plasma et
même lot 2.0 ml de plasma

s de potasse caustique à
100° C, puis dilué jusqu'à
DUCHÂTEAU et FLORKIN,
ivement 14.8 et 13.2 mg
60 mg/100 ml de plasma.
on d'alcool à des portions
ge à l'antrone a donné
10 et 17.5 mg de glyco-
plasma en tréhalose était
g/100 ml.

on a utilisé la technique
ment 96.8 et 98.6 mg de
liluant ainsi le tréhalose
ois.

r la digestion, la solution
berlite IR 120 (H) de
c 50 ml d'eau. Le filtrat
sec sous pression réduite.
à 94°, filtré et additionné
du refroidissement.

du tissu adipeux.

tétrachlorure de carbone
. Il a ensuite été digéré
asse caustique à 30 % à
enée à 25 ml. Le dosage
a été effectué sur cette
a été précipité dans des
mitive et de la solution
ats du dosage à l'antrone
u'ils ont été obtenus sur

le culot précipité dans la solution primitive ou dans la solution diluée. Dans le tableau I, nous avons porté les résultats extrêmes obtenus. Les plus élevés, trouvés dans la solution plus concentrée, sont probablement plus proches de la vérité, car, dans le cas des solutions diluées, la précipitation du glycogène n'est pas complète, même après trois heures.

TABLEAU I. — *Teneur du tissu adipeux
et du plasma en tréhalose et en glycogène
(courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de tréhalose)*

	Tissu adipeux mg/100 g poids frais		Plasma mg/100 ml	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
Tréhalose + glycogène	5960	6800	616	660
Glycogène	4260-5450	5200-6200	10	17.5
Tréhalose	510	600	606	642

Les valeurs données dans le tableau pour le tréhalose ont été calculées par différence en utilisant pour le glycogène les valeurs les plus élevées. Elles sont évidemment entachées d'une erreur importante.

Le glycogène a été isolé du tissu adipeux en utilisant la technique du « carrier ». On a ajouté respectivement 91.2 et 95.6 mg de glycogène Hofman-La Roche à 5 ml du produit de la digestion alcaline du tissu puis 6 ml d'alcool éthylique à 94 %. Après une nuit, la suspension a été centrifugée, le culot lavé deux fois à l'alcool à 66 %, séché, puis redissous dans l'eau et précipité une nouvelle fois par addition d'alcool. Le culot, lavé deux fois à l'alcool à 66 %, et une fois à l'alcool absolu, a été séché sous vide. On a obtenu respectivement 83 et 86 mg de glycogène.

Le tréhalose a été isolé de la même façon que dans le plasma, en utilisant 89.0 et 88.9 mg de tréhalose comme entraîneur.

Mesures d'activité.

La radioactivité des produits isolés a été mesurée à l'aide d'un scintillateur liquide Packard Tri-Carb. Le tréhalose a été dissous dans 1 ml d'eau et additionné de 10 ml de solution scintillante contenant 1 g de naphthalène, 100 mg de PPO (2.5-diphényloxazole) et 2.5 mg de POPOP (1.4-bis-2 (5-phényloxazolyl)-benzène) dans du dioxane.

Le glycogène n'étant pas soluble dans les liquides organiques, on a dû l'hydrolyser avant de le soumettre aux mesures d'activité. La prise d'essai de glycogène a été dissoute dans 1 ml d'eau et 0.5 ml d'acide sulfurique 3N et hydrolysée pendant 2 heures à 100°C. L'acide sulfurique a été éliminé en versant la solution sur 4 ml de Dowex 2(OH) et en lavant la résine avec 5 fois 2 ml d'eau. Les eaux de lavage réunies au filtrat ont été évaporées à sec, le résidu repris dans de l'eau et distribué dans les fioles du scintillateur. On a alors ajouté le mélange scintillant à base de dioxane.

Résultats

Les résultats des mesures d'activité ont été réunis dans le tableau II. L'activité du glycogène isolé du tissu adipeux n'est jamais supérieure au « background ».

TABLEAU II — *Activité spécifique du tréhalose et du glycogène isolés après injection de pyruvate-¹⁴C à des vers à soie (désint./min. mg.)*

	Plasma Tréhalose	Tissu adipeux	
		Tréhalose	Glycogène
Pyruvate-1- ¹⁴ C ...	3200	190	0
Pyruvate-2- ¹⁴ C ...	7300	440	0

Le tréhalose a été recristallisé dans de l'alcool à 94° additionné d'éther. L'activité spécifique n'a pas changé de façon significative après la recristallisation. L'activité spécifique du

tréhalose du tissu doit être de l'ordre de grandeur. En effet, d'un facteur de dilution du tissu en tréhalose, obtenus élevés dont l'une est ap

Quatre heures après l'injection à soie à la fin du 5^e âge larvaire le glycogène est nulle. Il est probable que du pyruvate soit transformé dans le tissu et trouverait tellement dilué dans le tissu que le marquage passerait inaperçu. On est tenté de penser que le pyruvate, par son métabolisme, a été utilisé très particulièrement pour alimenter la synthèse d'acides aminés et pour la

En effet, une radioactivité dans le plasma plasmatique et dans le tissu adipeux n'est pas directement en rapport avec son activité spécifique éta

En supposant que chaque molécule de lymphocyte, on peut calculer l'activité spécifique du tréhalose de l'hémolymphe. Pour le pyruvate-1-¹⁴C, l'activité spécifique est de 3180 d/min.mg et la concentration de 6.2 mg/ml; l'activité spécifique est donc de 20.000 d/min en tissu adipeux, négligeable pendant la durée de l'expérience. Elles sont représentatives de la radioactivité qui a été transformée en tréhalose. Le tréhalose n'est pas négligé car il est transformé en tréhalose peu de temps après avoir reçu 0.77 µC de pyruvate-1-¹⁴C. 1.2 % du pyruvate injecté est transformé en tréhalose.

Dans le cas de l'injection

a été mesurée à l'aide d'un
Le tréhalose a été dissous
ml de solution scintillante
g de PPO (2.5-diphénylo-
bis-2 (5-phényloxazolyl)-

ns les liquides organiques,
mettre aux mesures d'acti-
é dissoute dans 1 ml d'eau
drolysée pendant 2 heures
né en versant la solution
t la résine avec 5 fois 2 ml
u filtrat ont été évaporées
t distribué dans les fioles
le mélange scintillant à

é ont été réunis dans le
olé du tissu adipeux n'est

que du tréhalose
tion de pyruvate-¹⁴C
(d/min. mg.)

Tissu adipeux	
Tréhalose	Glycogène
190	0
440	0

as de l'alcool à 94° addi-
n'a pas changé de façon
L'activité spécifique du

tréhalose du tissu doit être considéré comme indiquant un ordre de grandeur. En effet, elle est calculée en tenant compte d'un facteur de dilution qui dépend de la concentration du tissu en tréhalose, obtenue par différence entre deux valeurs élevées dont l'une est approximative.

Discussion

Quatre heures après l'injection de pyruvate-¹⁴C à des vers à soie à la fin du 5^e âge larvaire, l'incorporation d'activité dans le glycogène est nulle. Il n'est pas tout à fait exclu cependant que du pyruvate soit transformé en glycogène, mais celui-ci se trouverait tellement dilué par le glycogène déjà présent dans le tissu que le marquage passerait inaperçu. Il paraît plus vraisemblable de penser que le pyruvate, plaque tournante du métabolisme, a été utilisé très rapidement pour d'autres buts, en particulier pour alimenter le cycle de Krebs, pour la synthèse d'acides aminés et pour la synthèse de tréhalose.

En effet, une radioactivité appréciable apparaît dans le tréhalose plasmatique et dans le tréhalose du tissu adipeux. Ce dernier n'est pas directement en équilibre avec le tréhalose plasmatique, son activité spécifique étant nettement moins élevée.

En supposant que chaque larve contenait environ 1 ml d'hémolymphe, on peut calculer approximativement l'activité totale du tréhalose de l'hémolymphe. Dans le cas de l'injection de pyruvate-1-¹⁴C, l'activité spécifique du tréhalose plasmatique était de 3180 d/min.mg et la teneur de l'hémolymphe en tréhalose de 6.2 mg/ml; l'activité totale d'un ml d'hémolymphe était donc de 20.000 d/min environ. Si le *turnover* du tréhalose est négligeable pendant la durée de l'expérience, ces 20.000 d/min sont représentatives de la quantité de pyruvate qui a été effectivement transformée en tréhalose. Par contre, si le *turnover* du tréhalose n'est pas négligeable, la quantité de pyruvate transformée en tréhalose peut être beaucoup plus grande. Chaque ver ayant reçu 0.77 μ C ou 1.71.10⁶ d/min, c'est un minimum de 1.2 % du pyruvate injecté qui a été effectivement transformé en tréhalose.

Dans le cas de l'injection de pyruvate -2-¹⁴C, l'activité injectée

à chaque ver était de 1.75 μC ou 3.88.10⁶ d/min. L'activité totale du tréhalose contenu dans 1 ml d'hémolymphe étant de 45.000 d/min environ, le pourcentage minimum de transformation du pyruvate a été de 1.2 % également.

Les observations rapportées ci-dessus montrent que, s'il est vrai qu'on observe, dans les conditions de nos expériences, une incorporation du pyruvate-1-¹⁴C ou du pyruvate-2-¹⁴C dans le tréhalose, on n'observe pas d'incorporation dans le glycogène du tissu adipeux. Elles montrent donc que le tréhalose peut trouver son origine dans le pyruvate sans passage par le glycogène, c'est-à-dire que l'organisme du ver à soie peut être le siège d'une tréhalosonéogenèse directe à partir de pyruvate.

Les faits rapportés dans l'Introduction faisant penser que le tissu adipeux pourrait être, selon les conditions de nutrition, le siège d'une synthèse de tréhalose ou d'une synthèse de glycogène à partir du G-6-P, il serait indiqué de rechercher dans différentes conditions de nutrition, l'éventuelle synthèse des deux osides à partir du pyruvate.

Conclusion

Du pyruvate-¹⁴C a été injecté à des vers à soie à la fin du 5^e âge larvaire. Le tréhalose du plasma et du tissu adipeux et le glycogène du tissu adipeux ont été isolés et leur radioactivité a été mesurée. Le glycogène, dans les conditions des expériences décrites, n'a incorporé aucune radioactivité. Le tréhalose plasmatique a incorporé au moins 1.2 % de l'activité du pyruvate injecté.

BIBLIOGRAPHIE

- CANDY, D. J. et KILBY, B. A. (1961). — *Biochem. J.*, **73**, 531.
 CAREY, F. G. et WYATT, G. R. (1960). — *Bioch. Biophys. Acta*, **41**, 178.
 DUCHÂTEAU, Gh. et FLORKIN, M. (1959). — *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, **41**, 178.
 DUCHÂTEAU-BOSSON, Gh., JEUNIAUX, Ch. et FLORKIN, M. (1963). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **71**, 566.
 SAITO, S. (1963). — *J. Insect Physiol.*, **9**, 509.
 STEELE, J. E. (1963). — *Gen. and Comp. Endocr.*, **3**, 46.
 TRIVELLONI, J. C. (1960). — *Arch. Bioch. Biophys.*, **89**, 149.
 VARDANIS, A. (1963). — *Bioch. Biophys. Acta*, **73**, 565.

EXCERPT

Les EXCERPTA ME
 extensif d'extraits des r
 immense de la médecine
 20 sections qui font pa
 formant une document

PHYSIOLOGY, BI

Environ 1000

ABSTRAC

Publicatio

Nous désirons vous rapp
 dispose pour la traduction
 Nous vous prions de nous
 recevrez un relevé du prix

EXCER

119-123, Herengracht
 AMSTERDAM (Hollande)