

DOSAGE DU ^{32}P TOTAL D'UNE LARVE VIVANTE DE *TENEBRIO MOLITOR* L. (COLÉOPTÈRE : TENEBRIONIDAE)

L. HUOT* et W. G. VERLY†

Institut Léon Fredericq, Biochimie (Laboratoire des Isotopes), Université de Liège et
Centre Belge de l'Énergie Nucléaire

(Received 1 August 1959)

Abstract—It is possible to determine total ^{32}P in living larvae of *Tenebrio molitor* with an error of ± 5 per cent, which is related specially to the error in the correction factor utilized. The very small variation of this correction factor in relation to the weight of larvae is discussed.

INTRODUCTION

Le problème du dosage du ^{32}P total d'un *Tenebrio molitor* vivant n'est pas insoluble puisque le diamètre d'une larve de cet insecte ne dépasse pas 3,5 mm tandis que la portée maximum du rayonnement β du ^{32}P dans un milieu de densité unitaire est de 7 à 8 mm. Il faut néanmoins prévoir une correction pour l'absorption d'une partie du rayonnement dans les tissus de l'insecte; la valeur de ce coefficient de correction en fonction du poids de la larve est établie expérimentalement dans le présent travail.

METHODES ET RESULTATS

Nous avons utilisé des *Tenebrio molitor* de races F et G (LECLERCQ, 1950) qui proviennent de nos élevages réguliers maintenus à 27°C, à une humidité relative d'environ 70 pour cent, et nourris de farine non blutée.

Pour la préparation de la nourriture radio-active, nous tamisons fortement la farine à laquelle nous ajoutons 5 pour cent de levure desséchée pour parer aux déficiences vitaminiques. Pour 100 g de ce mélange, nous ajoutons 100 μc de phosphate marqué. Après avoir broyé à l'aide d'un mortier et mélangé quelques heures dans un moulin à billes, il est permis d'émettre l'hypothèse que, à l'échelle de la bouchée du ver, le phosphore de la farine a partout la même radio-activité spécifique. Les larves sont placées dans des récipients qui contiennent ce mélange radioactif puis nous les rangeons dans une étuve où les conditions sont les mêmes que pour nos élevages réguliers.

Les mesures de radio-activité sont faites avec un tube de Geiger Tracerlab TGC-2. Tous les résultats sont corrigés pour le mouvement propre du compteur et la décroissance de la radio-activité. Pour cette dernière correction, nous utilisons

* Titulaire d'une Bourse postdoctorale du Conseil National de Recherche du Canada et boursier du Conseil des Recherches Agricoles de la province de Québec.

† Associé du Fonds National Belge de la Recherche Scientifique.

une source de ^{32}P préparée à partir de la solution qui sert à marquer la farine et recouverte d'une pellicule d'un micron environ de plastique.* Ce recouvrement ne modifie aucunement le nombre de désintégrations enregistrées par le compteur comme le montre le Tableau 1.

TABLEAU 1—MESURES SUR TROIS ETALONS DE ^{32}P AVANT ET APRÈS LE RECOUVREMENT DE PLASTIQUE

Etalons	c/5 min		Différence	't'
	Avant le recouvrement	Après le recouvrement		
1	10 071 \pm 100	10 185 \pm 101	+114	0,80
2	9895 \pm 99	9983 \pm 100	+88	0,62
3	10 417 \pm 102	10 219 \pm 101	-198	1,37

La mesure de la radio-activité faite sur la larve entière doit être parfaitement reproductible. Dans ce but, un petit cylindre en duralumin a été creusé d'une gouttière en couronne (Fig. 1) dont le centre vient se placer dans l'axe du tube

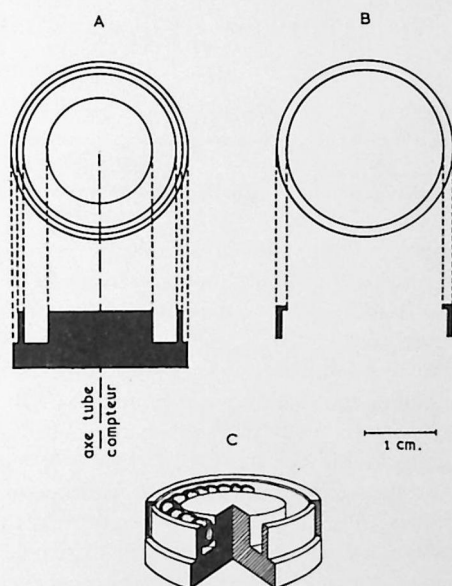


FIG. 1. Petite cage pour mesurer le ^{32}P total d'une larve vivante de *Tenebrio molitor*. A—Plan et coupe de la cage. B—Plan et coupe de l'anneau qui tient la feuille de cellophane. C—Vue de la larve dans la cage.

* Dissoudre 10 mg de plexiglass dans 10 ml de chloroforme. Placer 0,5 ml de cette solution sur le disque métallique qui contient le ^{32}P et laisser évaporer.

compteur au moment de la mesure. De cette manière, la larve en se déplaçant dans la gouttière ne modifie pas sa géométrie par rapport au compteur. La cage est fermée par une feuille de cellophane tenue par un anneau. Au cours de toutes nos séries de mesures, nous n'avons pas observé de contamination de cette cage. Dans ces conditions, les mesures faites sur une même larve ne montrent pas une variabilité qui dépasse l'erreur statistique (égale à la racine carrée du nombre de coups enregistrés) due au phénomène de la radio-activité (Tableau 2). Cette

TABLEAU 2—REPRODUCTIBILITÉ DE LA MESURE RADIO-ACTIVE EFFECTUÉE SUR UNE LARVE VIVANTE

Races	Poids des larves (mg)	Nombre total coups enregistrés			Moyenne	$\sqrt{\left(\frac{\Sigma\Delta^2}{n-1}\right)^*}$	$\sqrt{(\text{moyenne})\dagger}$
		1ère mesure	2ème mesure	3ème mesure			
G	219,7	11 250	11 375	11 342	11 322	65	106
G	198,1	10 094	9 977	9 863	9 978	116	100
G	175,8	14 366	14 601	14 510	14 492	118	121
G	131,4	10 721	10 636	10 649	10 669	46	103
G	25,4	9100	9131	9234	9155	70	96
F	103,2	17 842	18 141	18 062	18 015	155	134
F	93,7	15 336	15 616	15 832	15 595	249	125
F	60,9	9822	9797	9470	9696	196	98

* Erreur standard sur une mesure calculée d'après la variabilité des résultats obtenus pour une même larve.

† Erreur statistique sur une mesure due aux hasards des désintégrations nucléaires.

première mesure est appelée *A* et résulte de la moyenne de trois comptages successifs qui comprennent chacun environ 10 000 coups. Avant la détermination de cette première mesure *A*, les larves sortant du régime radioactif sont placées pendant 2 hr dans de la farine non radio-actives.

Afin de vérifier si, en circulant dans la farine ordinaire, les larves se débarrassent complètement des particules radio-actives qui pourraient adhérer à leur tégument, nous avons fait sur dix insectes la vérification suivante: après avoir déterminé dans les conditions habituelles la radio-activité relative d'une larve qui a passé 2 hr dans de la farine non radio-actives, nous immergeons cette larve dans de l'eau pendant quelques minutes, nous la retirons, la séchons à l'aide d'un papier filtre et un nouveau comptage est fait. Les résultats présentés dans le Tableau 3 permettent de conclure qu'il n'existe pas de différence significative entre les radio-activités mesurées avant et après le bain. *A* mesure donc exclusivement le ^{32}P contenu dans les tissus de la larve.

Après pesée et mesure de la radio-activité d'une larve vivante, cette dernière est placée immédiatement dans un creuset en porcelaine. La mesure du ^{32}P total est faite après incinération de l'insecte pendant environ 10 hr à une température

voisine de 500°C . Pour dissoudre le phosphate des cendres, nous employons 2 ml de HCl (0,05 N), agitons fortement avec une baguette de verre et ajoutons ensuite 1 ml d'eau. Nous prélevons 1,2 ml que nous plaçons sur trois disques métalliques de 24 mm de diamètre, ces disques reçoivent donc chacun 0,4 ml; l'évaporation se fait sur une plaque chauffante maintenue à basse température et

TABLEAU 3—VÉRIFICATION DE L'ABSENCE DE ^{32}P SUR LES TÉGUMENTS DES LARVES

Races	Poids des larves (mg)	Cpm d'une larve non lavée	Cpm d'une larve lavée
G	220,0	1688	1700
G	219,4	4044	4076
G	201,0	2822	2796
G	192,2	1969	1983
G	168,7	1954	1934
F	178,0	1944	1901
F	154,4	1759	1776
F	140,8	4032	4055
F	133,4	1057	1052
F	127,8	2317	2280

chacun des disques est ensuite placé sous le compteur qui a été utilisé pour mesurer la radio-activité de la larve vivante. La moyenne des valeurs obtenues pour les trois disques est la mesure *B*. La méthode a été vérifiée en ajoutant 1 ml de solution de ^{32}P à des larves non radio-actives placées dans des creusets en porcelaine. Le Tableau 4 montre que la perte en radio-isotopes est d'environ 7 pour cent avec une

TABLEAU 4—RÉCUPÉRATION DU ^{32}P TOTAL AJOUTÉ A UNE LARVE NON MARQUÉE

Dénominations	Coups/min/ml				Récupération du ^{32}P		
	Disque no. 1	Disque no. 2	Disque no. 3	Moyenne	%	Moyenne %	$\sqrt{\left(\frac{\Sigma\Delta^2}{n-1}\right)}$
Contrôle	6900	6920	7038	6953			
Larve (161,0 mg)	6641	6416	6339	6465	93,0		
Larve (158,5 mg)	6542	6758	6369	6556	94,3		
Larve (155,5 mg)	6706	6246	6674	6542	94,1	93,2	
Larve (135,0 mg)	6887	6527	6445	6620	95,2		
Larve (100,0 mg)	6442	6147	6072	6220	89,5		

erreur de 2,5 pour cent qui dépasse l'erreur statistique due au comptage; cette plus grande erreur est partiellement due à la préparation des disques pour les mesures de radio-activité.

Les 7 pour cent de ^{32}P non récupérés restent collés à la paroi du creuset. Cette adsorption est encore beaucoup plus importante quand le creuset n'est pas porté à 500°C . Nous plaçons 1 ml de solution radioactive dans deux creusets en porcelaine; le contenu du premier est évaporé sur une plaque chauffante à basse température, le second creuset est placé dans le four à 500°C . Dans les deux cas, le phosphate est repris avec HCl dilué, des disques préparés et un premier comptage effectué. Les creusets sont lavés à l'eau distillée puis placés tous deux dans le four. De nouveaux disques sont préparés de la même manière que précédemment

TABLEAU 5—ADHÉSION DU ^{32}P À LA PAROI DU CREUSET LORSQUE L'ÉVAPORATION DE 1 ml DE SOLUTION (25,778 c/m) SE FAIT A BASSE TEMPÉRATURE ET SA RÉCUPÉRATION APRÈS AVOIR PASSÉ CE CREUSET AU FOUR À 500°C

Creusets	Coups/min/ml		
	Premier comptage		Second comptage
	Evaporation a basse temperature	Traitement au four a 500°C	Creusets lavés rapidement et placés au four a 500°C
1	8981		11 403
2		24 675	942

et comptés. Les résultats obtenus (Tableau 5) indiquent très bien la forte adsorption du ^{32}P sur la paroi du creuset après une simple évaporation et la possibilité de sa récupération après un passage au four.

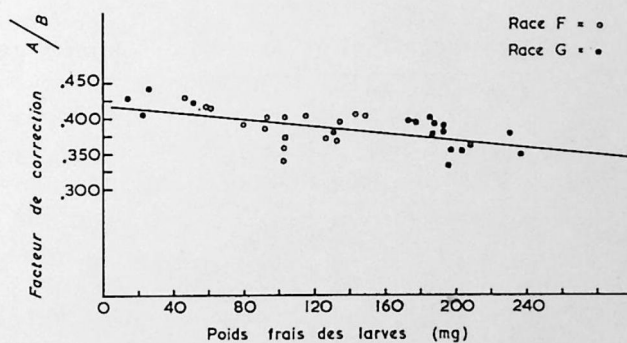


FIG. 2. Relation entre le facteur de correction A/B et le poids frais des larves.
 $Y = -.000258X + .42143$.

Le facteur de correction est A/B et il est entaché d'une erreur de l'ordre de 4 pour cent qui dépend principalement de B ; nous ne devons pas ici tenir compte de la perte de 7 pour cent qui est une erreur systématique.

La courbe de la Fig. 2 montre la relation qui existe entre le facteur A/B et le poids frais des larves. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide des formules de SNEDECOR (1946) et de FISHER (1949). Nous avons en premier lieu, fait le test de ' η ' pour déterminer si Y est une fonction monotone de X . Le résultat étant positif, nous avons estimé le coefficient de corrélation $r = -0,61$. Ce coefficient est significatif par le test ' t ' de Student ($t = 5,5$). Le test de χ^2 ne décèle pas d'hétérogénéité significative entre les résultats expérimentaux et l'hypothèse linéaire ($\chi^2_{(4)} = 9,52; P < 0,05$). L'équation de la courbe de régression ($Y = mX + k$) a ensuite été estimée ainsi que le degré de précision de cette courbe par le calcul de ' S_y ' (erreur standard de l'estimé). La valeur de S_y est de 5 pour cent et est du même ordre de grandeur que l'erreur sur le quotient A/B . Il semble donc raisonnable d'assimiler à une droite la fonction $A/B = f(\text{poids})$ dans les limites où elle est ici considérée.

DISCUSSION

On constate que le facteur A/B ne diminue que très peu quand le poids de la larve augmente.

Expérimentalement, on a vérifié que le rapport $[(\sqrt[3]{\text{poids}})/\text{longueur}]$ reste constant pendant la croissance de la larve ce qui indique, puisque l'animal est sensiblement cylindrique, que ses proportions se maintiennent (Fig. 3). L'épaisseur

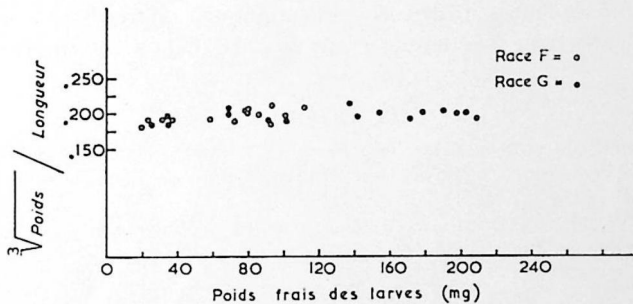


fig. 3

FIG. 3. Régularité du rapport $[\sqrt[3]{(\text{poids})}/\text{longueur}]$ pendant la croissance larvaire.

de la larve, paramètre dont dépend l'auto-absorption du rayonnement β et par conséquent le facteur de correction, varie donc comme la racine cubique du poids. On constate néanmoins qu'une augmentation d'épaisseur par un facteur de 1,35 (passage de 100 à 250 mg) ne s'accompagne que d'une variation de 10 pour cent du facteur de correction A/B .

Cette faible variation s'explique parce que nous travaillons dans la portion à faible pente de la courbe d'auto-absorption et que l'angle utile moyen pour le

comptage augmente avec le diamètre de la larve (Fig. 4) atténuant ainsi la diminution du rendement de la mesure due à une plus grande auto-absorption.

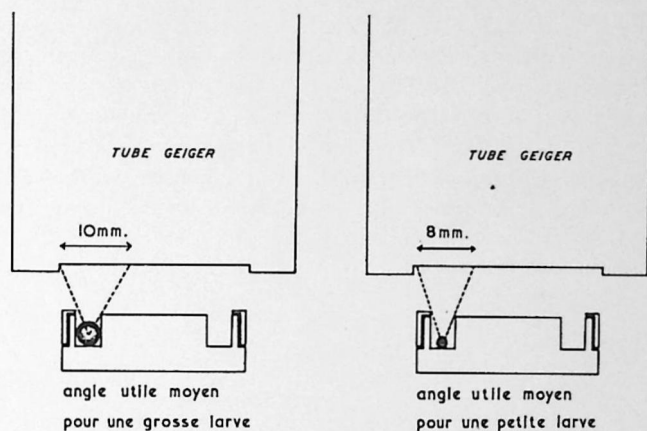


FIG. 4. L'angle utile moyen pour le comptage augmente avec le diamètre de la larve.

CONCLUSIONS

Nos résultats démontrent qu'il est possible de mesurer le ^{32}P total d'une larve vivante de *Tenebrio molitor* avec une erreur de ± 5 pour cent qui dépend essentiellement de l'erreur sur le facteur de correction appliqué. La très faible variation de ce facteur de correction en fonction du poids de la larve a été interprétée.

BIBLIOGRAPHIE

- FISHER R. A. (1949) *Statistical Methods for Research Workers*. Oliver and Boyd, Edinburgh.
 LECLERCQ J. (1950) Ecologie et physiologie des populations de *Tenebrio molitor* L. *Physiol. comp.* 2, 161-180.
 SNEDECOR G. W. (1946) *Statistical Methods Applied to Experiments in Agriculture and Biology*. Collegiate Press, Iowa.