

CENTRE D'ETUDE DE L'ENERGIE NUCLEAIRE
C.E.N.

31, RUE BELLIARD - BRUXELLES

PREPARATION DE THYMIDINE TRITIEE ET SON EMPLOI POUR L'ETUDE,
PAR LA METHODE AUTORADIOGRAPHIQUE, DE LA SYNTHESE
DE L'ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE DANS DES
CELLULES EN CULTURE.

W.G. VERLY, H. FIRKET ET G. HUNEBELLE

*Laboratoire des Isotopes du Service de Pathologie Générale
et Institut d'Histologie, Université de
Liège, Belgique.*

Conf. Gen. - P/323

CEN - R.1541

Septembre 1958

PREPARATION DE THYMIDINE TRITIEE ET SON EMPLOI POUR L'ETUDE,
PAR LA METHODE AUTORADIOGRAPHIQUE, DE LA SYNTHESE
DE L'ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE DANS DES
CELLULES EN CULTURE.

La biosynthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) intéresse beaucoup les biologistes ; elle suit un mécanisme précis qui assure la continuité des espèces. Le rôle génétique de l'ADN semble dû à son action, directe ou indirecte, sur la synthèse des protéines et en particulier des enzymes.

La thymine, qui est un des constituants de l'ADN, ne se trouve pratiquement pas dans l'ARN (acide ribonucléique). Cependant les noyaux cellulaires n'utilisent guère la thymine pour faire la synthèse de l'ADN mais plutôt le désoxyriboside de thymine que l'on appelle thymidine.

I.- Préparation et radioactivité de la thymidine tritiée:

I.1.- Nous avons préparé de la thymidine marquée avec du tritium et possédant une grande activité spécifique (Verly et Hunebelle, 1) de manière à ce qu'elle puisse être utilisée pour des études cytologiques par la méthode

de l'autoradiographie. La méthode de préparation de ce nucléoside marqué, par échange catalytique entre de l'eau tritiée et de la thymidine ordinaire, est analogue à celle utilisée par Eidinoff et Knoll (2) pour obtenir des purines tritiées et deutérées. Taylor et al. (3) ont aussi préparé de la thymidine tritiée ; ils ne donnent aucun détail sur le procédé de synthèse, ni sur la pureté du produit obtenu.

- 1.2.— On met dans un tube 200 mg de catalyseur d'Adams fraîchement réduit, 205 mg de thymidine California Foundation for Biochemical Research (CFBR) et 1 ml d'eau tritiée ayant une radioactivité de 2 curies. Le tube est scellé sous vide et agité pendant 24 heures à 100° C.

Après refroidissement, l'eau tritiée est distillée dans un système clos et récupérée. On ajoute de l'eau très chaude au résidu pour dissoudre la thymidine et on filtre la solution pour éliminer le catalyseur. Le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite.

Pendant le traitement en présence du catalyseur d'Adams, des atomes d'hydrogène de la thymidine sont remplacés par des atomes d'hydrogène de l'eau tritiée : la thymidine est ainsi marquée.

- 1.3.— Parmi les atomes de tritium qui entrent dans les molécules du nucléoside, certains occupent des positions stables en l'absence de catalyseur, tandis que d'autres (comme ceux du groupe imidé de la fraction thymine et des groupes hydroxyle du désoxyribose) sont labiles, c'est-à-dire plus ou moins facilement échangeables avec les atomes d'hydrogène du milieu. Pour utiliser le produit marqué dans des expériences de biologie, il faut le débarrasser de ses atomes de tritium labiles. La labilité dépend de l'acidité du groupement qui contient le tritium : il est devenu classique, pour éliminer les atomes de tritium labiles, de favoriser l'émission d'ions hydrogène en chauffant le produit tritié dans un milieu basique. Après ce traitement, les atomes de tritium qui restent dans la

thymidine sont très solidement attachés au reste de la molécule (1.7.).

Le résidu obtenu après l'échange catalytique (1.2.) est dissous dans 5 ml de NaOH 0.2 N et chauffé à 100° C pendant 5 minutes. La solution, qui est devenue jaune, est refroidie, neutralisée avec de l'acide sulfurique jusqu'au pH 6-7 (papier indicateur universel) et évaporée à sec sous pression réduite.

La séparation de la thymidine et du sulfate de sodium se fait avec du butanol bouillant qui dissout la thymidine. La solution butanolique, qui est jaune, est passée à travers un filtre Schleicher et Schüll 589/3 en ayant soin de la maintenir très chaude pendant la filtration, et le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite.

1.4.- Le traitement par NaOH n'est pas accompagné d'une destruction importante de la thymidine. En effet, de la thymidine ordinaire, pure, chauffée dans NaOH 0.2 N à 100° C pendant 5 minutes ne jaunit pas ; après neutralisation avec H_2SO_4 , extraction au butanol, filtration et évaporation du filtrat, on obtient un résidu qui est de la thymidine pure.

Mais la thymidine est partiellement détruite pendant le chauffage dans l'eau en présence du catalyseur (1.2.). Cette destruction est une hydrolyse avec production de thymine (*). Dans les conditions utilisées

(*) 103 mg de thymidine CFBR, 100 mg de catalyseur d'Adams fraîchement réduit et 2 ml d'eau sont chauffés sous vide à 170° C en agitant pendant 46 heures. Après ce traitement, le tube contient une substance peu soluble dans l'eau froide. Après filtration à chaud pour enlever le catalyseur, le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite et le résidu dissous dans le méthanol bouillant. La solution méthanolique jaune est traitée par le charbon actif et filtrée chaude. Le volume du filtrat est réduit et des cristaux apparaissent lorsque la solution se refroidit ; ils sont recristallisés dans le méthanol. On obtient ainsi 31 mg de thymine pure comme le montrent la forme des cristaux, l'absence de fusion avant 300° C et le spectre ultraviolet. Ceci signifie que le traitement à 170° C dans l'eau pendant 46 heures, en présence de catalyseur d'Adams, hydrolyse au moins 60 % de la thymidine mise en oeuvre.

(100° C, 24 heures ; cf. 1.2.), la destruction de la thymidine n'est pas trop importante, ce qui permet de la repurifier assez facilement par des cristallisations consécutives à un traitement par le charbon actif.

Le résidu obtenu par évaporation de la solution butanolique (1.3.) contient, outre la thymidine, de la thymine et des sucres plus ou moins altérés par NaOH ; il est d'ailleurs jaune. On le cristallise deux fois dans 2 ml de butanol. Les cristaux ainsi obtenus restent jaunes et n'ont pas un point de fusion correct. On les dissout dans 10 ml de méthanol et la solution bouillante est agitée pendant 2 minutes avec environ 100 mg de charbon actif. Après filtration, la solution est évaporée à sec sous pression réduite et le résidu est cristallisé dans le butanol.

On obtient ainsi 70 mg de cristaux blancs qui ont la forme d'aiguilles des cristaux de thymidine. Ils fondent à 185-186° C (corr.) comme la thymidine CFBR utilisée dans la réaction d'échange isotopique. Les spectres d'absorption ultraviolets des thymidines tritiées et CFBR ne sont pas distinguables ; l'absorption millimolaire du produit tritié à 267 mμ au pH 7.2 est de 9.81, tandis que celle de la thymidine CFBR est de 9.87.

30 mg de thymidine tritiée moins pure (P.F. : 163-167° C [corr.]) sont isolés des eaux mères par cristallisation dans le méthanol après un traitement par le charbon actif. Le rendement global est donc voisin de 50%.

1.5.- La thymidine tritiée est diluée 11.400 fois par de la thymidine CFBR. Le produit dilué est brûlé et l'eau de combustion réduite en hydrogène. La radioactivité spécifique de cet hydrogène est mesurée dans une chambre à ionisation suivant la méthode de Verly et al. (4). Corrigée pour la dilution, la radioactivité est de 14.9 ± 0.1 millicurie par millimole de thymidine.

La radioactivité de l'eau tritiée qui a servi à l'échange est de 18 millicuries par milliatome-gramme d'hydrogène. Donc, en moyenne, 0.85 atome

d'hydrogène par molécule de thymidine a été remplacé par des atomes d'hydrogène de l'eau tritiée pendant le traitement par le catalyseur et a résisté à l'action de la soude ; ces atomes d'hydrogène occupent donc des positions stables.

L'activité spécifique de la thymidine tritiée est d'un ordre de grandeur pratique pour les travaux de cytologie qui utilisent la radioautographie. Un noyau de cellule d'oiseau (p.ex. de fibroblaste de poulet) synthétise avant de se diviser, une quantité d'ADN qui contient 2.4×10^{-12} millimole de thymidine qu'il répartit ensuite entre les deux noyaux fils. Si nous supposons des conditions expérimentales telles que la totalité de la thymidine présente dans l'ADN néoformé provient de la thymidine tritiée introduite dans le milieu où vivent les cellules, chaque noyau fils reçoit une radioactivité de 56 désintégrations par jour. Ces valeurs seraient environ doublées pour des cellules de mammifères.

1.6.- Il est nécessaire de connaître la répartition de la radioactivité de la thymidine entre la pyrimidine et le désoxyribose pour pouvoir interpréter les résultats des autoradiographies. En effet, l'évolution métabolique de ces deux moitiés de la molécule n'est peut-être pas la même. Il n'est pas exclu qu'il existe des réactions de transfert du désoxyribose dans d'autres désoxyribosides de l'ADN ; il n'est pas non plus tout à fait certain que le seul rôle du désoxyribose introduit sous la forme de thymidine soit de participer à la synthèse de l'ADN et qu'en particulier il ne puisse pas être oxydé en ribose et pénétrer dans l'ARN. La portion thymine, par contre, semble, sauf exception quantitativement peu importante (Littlefield et Dunn, 5) se rencontrer exclusivement sous forme de nucléotide de thymidine dans l'ADN.

Pour localiser la radioactivité, on hydrolyse la thymidine diluée (1.5.) et on dose le tritium dans la thymine pure isolée du milieu. Corrigée pour la dilution de la thymidine, la radioactivité est de 14.9 ± 0.3 millicurie par millimole de thymine.

La thymine isolée après hydrolyse de la thymidine a donc la même activité par millimole que la thymidine elle-même. Cela signifie que la totalité de la radioactivité du désoxyriboside se trouve dans sa portion pyrimidique ; le désoxyribose ne contient pas d'atomes d'hydrogène qui, à la fois, sont échangeables catalytiquement et occupent des positions stables dans NaOH 0.2 N. Il n'est donc pas utile d'envisager une synthèse de thymidine à partir de thymine tritiée pour localiser la radioactivité uniquement dans la portion pyrimidique ; la synthèse de la thymidine n'a jamais été réalisée par voie chimique, mais Friedkin et Roberts (6) ont réussi une synthèse enzymatique en mettant de la thymine et du désoxyribose-1-phosphate en présence d'un extrait de foie ou de rein de mammifère.

1.7.- Il faut des moyens énergiques pour hydrolyser la thymidine et l'on pouvait craindre que le traitement à 120° C dans HCl 6 N pendant 3 heures qui est nécessaire, ne labilise une partie des atomes de tritium fixés dans la fraction thymine. Le fait de retrouver la totalité de la radioactivité de la thymidine dans la thymine isolée après l'hydrolyse (1.6.) exclut cette possibilité. Une autre expérience confirme cette conclusion : la thymine provenant de l'hydrolyse de thymidine ordinaire par HCl 6 tritié pendant 3 heures à 120° C, après plusieurs dissolutions dans l'eau suivies d'évaporations (pour éliminer les atomes de tritium très labiles fixés par les groupements NH), est pratiquement dépourvue de radioactivité.

Les deux expériences illustrent la très grande stabilité des atomes de tritium introduits dans la thymidine par échange catalytique et qui résistent au traitement par NaOH. Seules des réactions métaboliques seront capables de libérer du tritium de la thymidine tritiée introduite dans les cellules.

2.- Etude de la synthèse de l'ADN dans des cultures de fibroblastes.

2.1.- Les cultures, en goutte pendante, sont faites à partir de muscles de patte d'embryons de poulet âgés de 9 à 11 jours et sont utilisées avant tout repiquage ; les principales cellules sont des "fibroblastes".

La thymidine tritiée, dissoute dans du Glycosol bicarbonaté ou du sérum dilué au quart dans du Glycosol bicarbonaté, est ajoutée à des cultures en croissance. La concentration utilisée est de 2×10^{-3} M, qui n'inhibe en rien la croissance des cultures.

Juste avant la fixation, les explants sont découpés et enlevés sous contrôle du microscope binoculaire de façon à ne laisser sur la lamelle que la zone de croissance bien étalée. La préparation est lavée dans six bains successifs de liquide de Ringer ou de Glycosol. On fixe à l'alcool éthylique à 80° pendant un à deux jours, puis on lave abondamment à l'eau courante. Les lamelles sont placées, cultures en haut, sur des lames préparées pour l'autoradiographie (par lavage à l'albumine à 1 % et à l'alun de chrome à 0.05 %).

Les autoradiographies sont faites selon la méthode du "stripping film" (Kodak Ltd Autoradiographic Plates) en suivant les indications de Doniach et Pelc (7) commentées par Boyd (8). Les bords du film sont soigneusement rabattus sur les grands côtés et la face inférieure de la lame pour éviter tout déplacement du film par rapport aux cellules. On sèche soigneusement à la chambre noire dans un exsiccateur. L'exposition dure une à deux semaines en boîtes étanches en présence de CaCl_2 .

Le développement (par le Kodak Developer D 19b dilué de moitié) et la fixation se font en maintenant les lames horizontales et à température aussi constante que possible (17-18° C). Après lavage à l'eau courante et séchage, on colore légèrement à l'hématoxyline d'Ehrlich. On laisse sécher les lames avant de les monter (Firket, 9).

2.2.- Après développement des autoradiographies, on constate que le voile entre les cellules (= background) est peu important et que le nombre de grains d'argent par unité de surface n'est pas plus élevé au-dessus du cytoplasme des cellules qu'entre celles-ci. La densité des grains d'argent n'est significativement plus élevée qu'au-dessus des noyaux des cellules au repos et au voisinage des chromosomes (à moins de $1\ \mu$) dans les cellules qui se divisent ; on en déduit que le tritium introduit sous la forme de thymidine se trouve exclusivement dans ces structures après fixation de la préparation (fig. 2.2.1.) (Firket, 9 ; Firket et Verly, 10) .

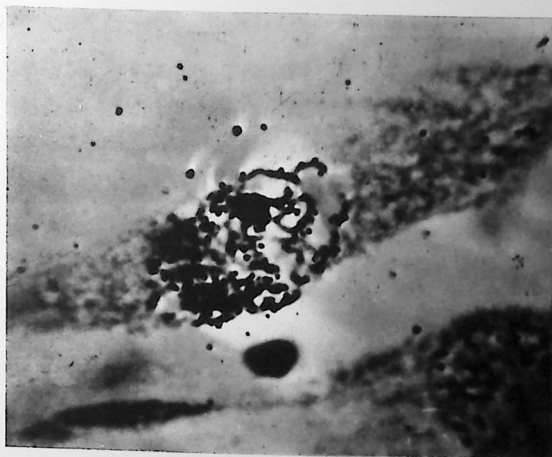


Fig. 2.2.1. : Fibroblaste de poulet cultivé en présence de thymidine tritiée. Noyau en prophase : les chromosomes sont les filaments gris, les grains d'argent (points noirs) les surmontent ou sont situés dans leur voisinage immédiat ; la grosse masse foncée est le nucléole coloré en bleu sur la préparation.

2.3.- Après deux heures de contact de la culture avec de la thymidine tritiée, on constate la présence de tritium dans un certain nombre de noyaux, mais aucune figure mitotique n'est marquée.

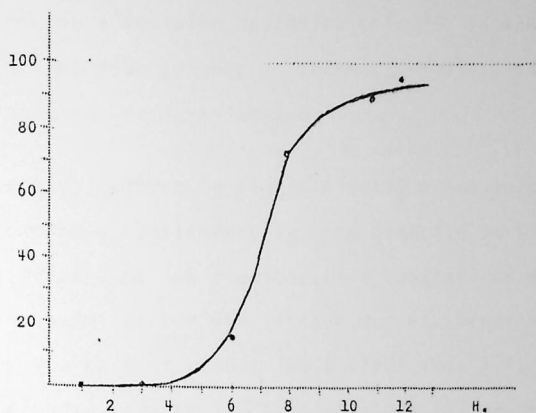


Fig. 2.3.1. : Pourcentage des figures mitotiques marquées en fonction du temps pendant lequel la culture a été au contact de thymidine tritiée.

Il faut attendre plus de 4 heures de contact pour qu'un certain pourcentage des noyaux en division soit marqué. Après 10 heures de contact, ils sont pratiquement tous marqués. La figure 2.3.1. montre que la fixation du tritium mis au contact de la cellule sous la forme de thymidine, dans un composé insoluble à l'intérieur du noyau, précède la mitose de 7 heures en moyenne dans une culture maintenue à 37° C (Firket, 9 ; Firket et Verly, 10). Firket (9) a montré que c'était à peu près à ce moment que se produisait le redoublement de la quantité de l'ADN cellulaire.

2.4.- Le nombre de grains d'argent développés peut servir de mesure relative du tritium qui se trouve au contact immédiat de l'émulsion nucléaire. Si ce tritium se trouve réparti dans une structure ayant une certaine épaisseur et séparée de l'émulsion par de la matière, le problème de son dosage par le procédé autoradiographique devient beaucoup plus compliqué (cf. 3.3.). Cependant, il est possible, en comptant les grains, de comparer la radioactivité de deux structures de même forme et situées à la

même distance de l'émulsion nucléaire tels que le sont, en première approximation, les deux groupes de chromosomes d'une même figure de mitose pendant l'anaphase et la télophase.

On constate que, lorsque la figure mitotique est marquée, les deux groupes de chromosomes contiennent la même quantité de tritium. Les différences observées dans les résultats des numérations de grains d'argent ne dépassent pas l'erreur statistique due au phénomène de radioactivité. Si on admet que ce tritium est lié à l'ADN (cf. 3.1.), on doit conclure que l'ADN élaboré pendant l'intercinèse est également réparti entre les deux groupes de chromosomes au moment de la mitose (Firket, 9 ; Firket et Verly, 10). Il serait intéressant de vérifier si le fait est également vrai pour les deux chromosomes identiques qui se séparent à la métaphase.

2.5.- Dans des cultures qui ont été cultivées 3 jours en présence de thymidine tritiée, on constate qu'il existe encore des noyaux de fibroblastes (parfois jusque 30 %) qui ne sont pas marqués. Comme ils sont mélangés à d'autres cellules dont les noyaux ont impressionné l'émulsion nucléaire, il semble que l'absence de grains d'argent au-dessus des noyaux de ces cellules signifie qu'ils ne contiennent pas de tritium (Firket, 9 ; Firket et Verly, 10).

Il semble donc que la quantité d'ADN n'a pas augmenté dans ces cellules et qu'elles ne participent pas aux cycles mitotiques. Mais de plus, le résultat semble indiquer qu'il n'y a eu aucune synthèse d'ADN. Il n'y a donc pas eu de renouvellement détectable de cet acide nucléique et la constance de sa quantité dans la cellule n'est pas le résultat d'un équilibre de flux (steady state). Comme aucune autre particularité ne distingue ces cellules, nous n'avons pas de raison de supposer que leurs membranes cellulaire ou nucléaire soient moins perméables à la thymidine tritiée que celles des autres cellules.

3.- Autoradiographie et thymidine tritiée. -----

3.1.- L'identification des molécules qui contiennent le tritium dans les préparations fixées, constitue un problème très important. L'autoradiographie permet seulement de repérer le radioisotope ; elle n'est pas une méthode d'identification chimique. Nous n'avons pas, jusqu'à présent, isolé ces composés tritiés, mais une série d'arguments nous fait penser qu'il s'agit de polymères insolubles qui contiennent de la thymidine tritiée et qui sont vraisemblablement pour la plus grande partie, de l'ADN.

- 1) La fixation des cellules et les lavages qu'elles subissent, éliminent tout ce qui est soluble dans l'eau et dans l'alcool, donc, en particulier, la thymidine libre et les produits de son métabolisme qui ont un faible poids moléculaire ;
- 2) La thymidine est un précurseur spécifique de l'ADN (Reichard et Estborn, 11). On a trouvé de la thymine (rappelons que la thymidine tritiée utilisée était marquée exclusivement dans la fraction pyrimidique [1.6.]) presque uniquement dans l'ADN ; en particulier, l'ARN n'en contient pas ou très peu (5) ;
- 3) Dans nos autoradiographies, seuls les noyaux des cellules au repos et les chromosomes des cellules en division, contiennent du tritium ; l'ADN est précisément localisé exclusivement dans ces structures ;
- 4) Nous avons observé un parallélisme entre l'apparition de tritium dans les noyaux et l'accroissement de la quantité d'ADN dans ces noyaux pendant l'intercinèse (2.3.).

3.2.- La radiation β du tritium est très peu pénétrante. A l'énergie maximum de 18.000 eV correspond une pénétration de 0.82 mg/cm², soit 8.2 μ dans un milieu de densité 1 ; à l'énergie moyenne de 5690 eV correspond une pénétration de 0.12 mg/cm², soit 1.2 μ dans un milieu de densité 1.

L'émulsion nucléaire est formée d'une matrice de gélatine de densité voisine de l'unité dans laquelle se trouvent des grains de AgBr qui ont une densité de 6.5 et qui occupent 45 % du volume de l'émulsion ; celle-ci a donc une densité moyenne de 3.5. On a montré expérimentalement que si le tritium est placé au contact direct de l'émulsion nucléaire, 90 % des électrons émis vers l'émulsion sont arrêtés après une trajectoire inférieure à $1\ \mu$ et donnent, après développement, un seul grain d'argent (Fitzgerald, Eidinoff et Simmel, 12 ; Beischer, 13) .

Il en résulte deux conséquences :

- 1) une localisation très précise - à moins de $1\ \mu$ - du point où le tritium s'est désintégré ; cette précision ne peut être obtenue avec aucun autre radioisotope émetteur de rayons β qui présente un intérêt en biologie ;
- 2) chaque grain d'argent correspond à un électron de désintégration ; on peut donc compter un grand nombre d'électrons émis par une petite surface ce qui signifie une grande précision dans la mesure de la radioactivité.

3.3.- Malheureusement, dans les autoradiographies cellulaires, le tritium se trouve dans des structures qui ont une épaisseur et qui ne se trouvent pas directement au contact de l'émulsion nucléaire. L'absorption du rayonnement β du tritium par le milieu cellulaire n'est pas négligeable si on considère que $1\ \mu$ de protoplasme est capable d'arrêter complètement la moitié des électrons de désintégration.

Dans les cultures de fibroblastes, il y a des noyaux presque sphériques et d'autres en forme d'ellipsoïdes plus ou moins aplatis. Si l'on suppose, en première approximation, qu'ils ont tous le même volume, l'inverse de leur surface est proportionnelle à leur épaisseur. Dans les conditions où sont faites les cultures, les noyaux sont presque tous tangents à l'émulsion quand on fait l'autoradiographie. La figure 3.3.1.

montre que le nombre de grains d'argent développés est statistiquement plus élevé au-dessus des noyaux aplatis qu'au-dessus des noyaux arrondis ; l'allure générale de la courbe est celle d'une courbe d'auto-absorption de rayons β (Firket, 9) .

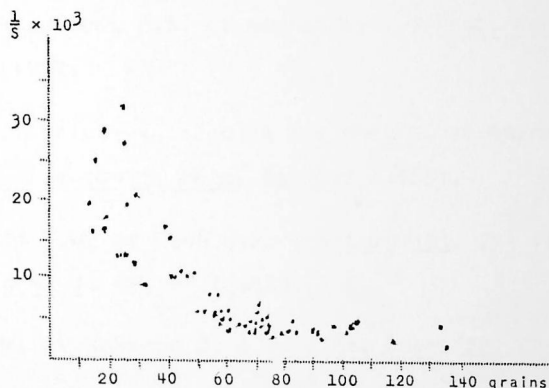


Fig. 3.3.1. : Fibroblastes de poulet cultivés en présence de thymidine tritiée. Nombre de grains d'argent au-dessus des noyaux en fonction de l'inverse de la surface de leur projection dans un plan parallèle au film autoradiographique (prise comme mesure de l'épaisseur du noyau).

Il faut donc se méfier de l'impression, en ce qui concerne la distribution du tritium dans une cellule ou un tissu, que donne un simple coup d'oeil sur une autoradiographie. Il faudrait, pour chaque organite, compter les grains d'argent et appliquer un facteur de correction qui tiendrait compte de la forme de la structure analysée (dans laquelle la distribution du radioisotope est supposée homogène) et de l'épaisseur qui la sépare de l'émulsion radiographique.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Verly W.G. et Hunebelle G. ; Bull. Soc. Chim. Belg. 66, 640 (1957).
- (2) Eidinoff M.L. et Knoll J.E. ; J. Am. Chem. Soc. 75, 1992 (1953).
- (3) Taylor J.H., Woods P.S. et Hughes W.L. ; Proc. Natl. Acad. Sci. 43, 122 (1957).
- (4) Verly W.G., Brictoux-Grégoire S., Koch G. et Espreux G. ;
Bull. Soc. Chim. Belg. 64, 491 (1955).
- (5) Littlefield J.W. et Dunn D.B. ; Nature 181, 254 (1958) ;
Biochem. J. 68, 8P (1958).
- (6) Friedkin M. et Roberts D. ; J. Biol. Chem. 207, 257 (1954).
- (7) Doniach I. et Pelc S.R. ; Brit. J. Radiol. 23, 184 (1950).
- (8) Boyd G.A. ; Autoradiography in Biology and Medicine, Academic Press,
New York, p. 399 (1955).
- (9) Firket H. ; Arch. Biol. 69, 1 (1958).
- (10) Firket H. et Verly W.G. ; Nature 181, 274 (1958).
- (11) Reichard P. et Estborn B. ; J. Biol. Chem. 188, 839 (1951)
- (12) Fitzgerald P.J., Eidinoff M.L. et Simmel E.B. ; Science 114, 495 (1951).
- (13) Beischer D.E. ; Nucleonics 11, (12), 24 (1953).
