

L'Action de l'irradiation ultraviolette sur le métabolisme des acides nucléiques dans l'embryon de Poulet

par FRANCISCO D. BARBIERI¹

Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles

INTRODUCTION

DAVIS (1944) a montré que des doses faibles de lumière U.V. empêchent la fermeture de la gouttière neurale dans l'embryon de poulet.

Se basant sur la région du spectre la plus efficace, cet auteur avait conclu que cette inhibition de la morphogénèse serait la conséquence d'une altération du métabolisme des stéroïdes. Nous avons répété cette expérience afin de préciser si ce traitement n'affecterait pas aussi le métabolisme des acides nucléiques. Nous avons étudié dans ce but, l'incorporation de l'adénine marquée par la méthode autoradiographique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Six embryons de poulet ayant de 1 à 7 somites ont été dépourvus de leurs membranes vitellines, explantés et cultivés *in vitro* dans le 'minimum medium' de Spratt (1948). Après leur étalement dans le milieu de culture, les embryons ont été soumis à l'irradiation d'une lampe 'Mineralight' pourvue d'un filtre SL 2537, à des doses d'environ 200 erg/mm.² (déterminées au photomètre de Latarjet).

Les embryons ont ensuite été placés dans le milieu de Spratt contenant environ 0.3 μ C/c.c. d'adénine-8-C¹⁴ pendant 2 à 3 heures avant d'être fixés au Serra, coupés et autoradiographiés selon la méthode de Ficq (1955) qui a déjà été appliquée à ce matériel par Tencer (1956) et Barbieri (1960). Dans certaines des expériences, les embryons n'ont été placés dans le milieu radioactif qu'une heure après l'irradiation. Les coupes destinées à l'autoradiographie ont été colorées au mélange vert de méthyle-pyronine de Unna.

Certaines des coupes ont été soumises à l'action de la ribonucléase (Armour Laboratories; 0.5 mg./c.c., 2 heures à 37° C.), de l'eau distillée dans les mêmes conditions ou de l'acide chlorhydrique normal (5 minutes à 60° C.); cela nous a permis de suivre l'incorporation du précurseur dans l'ADN, l'ARN et le

¹ *Author's address:* Instituto de Biología General y Embriología Experimental, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucuman, R. Argentina.

[*J. Embryol. exp. Morph.* Vol. 9, Part 1, pp. 9-13, March 1961]

résidu résultant de l'hydrolyse des coupes dans HCL N à 60° C., ainsi que dans une fraction soluble à l'eau à 37° C.

L'incorporation du précurseur a été mesurée en comptant le nombre de traces dans l'émulsion photographique; les chiffres obtenus ont été ramenés à une surface arbitrairement choisie de 441 μ^2 . Quatre embryons témoins ont été soumis aux mêmes traitements excepté l'irradiation ultraviolette. Nous avons comparé des embryons de différents âges bien que les différences d'activité qu'on peut attribuer au traitement soient beaucoup plus grandes que celles dues à l'âge embryonnaire, comme le montrent les données de Tencer (1956) et les chiffres fournis par nos propres témoins.

RÉSULTATS

Comme Davis (1944), nous avons pu constater une inhibition de la fermeture de la gouttière neurale par l'action des U.V.

Effets sur l'incorporation de l'adénine-C¹⁴

(a) Immédiatement après l'irradiation, c'est-à-dire au cours de la 1^{ère} et de la 2^{ème} heure, il y a une *augmentation* de l'incorporation totale de l'adénine au niveau des trois portions, *A*, *B* et *C*, du tube neural (*A* étant la portion céphalique et *C* la portion caudale) (tableau 1).

TABLEAU 1

Incorporation de l'adénine-C¹⁴ (0.3 μ C/c.c.) dans le tube neural

Expérience	Somites	A		B		C	
		T	U.V.	T	U.V.	T	U.V.
1. Adénine: 13 γ /c.c., incub. 1 h.	3	2.3	3.6	4.0	6.3	6.8	8.2
2. Adénine: 13 γ /c.c., incub. 1 h.	5	0.7	1.7	3.5	9.0	6.8	13.8
3. Adénine: 6 γ /c.c., incub. 2 h.	7	1.8	—	3.9	—	7.8	—
	4	—	7.0	—	8.0	—	14.5
	5	—	6.5	—	10.3	—	10.1
4. Adénine: 6 γ /c.c., incub. 3 h. (Début: 1 h. après l'irradiation)	4	2.5	—	15.5	—	14.5	—
	7	—	2.1	—	3.8	—	9.5
	6	—	1.5	—	7.7	—	5.6

T = témoins non irradiés; U.V. = 200 ergs/mm.²

Les résultats sont exprimés en nombre de traces par 441 μ^2 pour les niveaux *A*, *B*, *C* du système nerveux (*A* étant la portion céphalique et *C* la portion caudale).

Si on essaie de préciser ce qui se passe dans les diverses fractions biochimiques que l'on peut mettre en évidence après hydrolyse enzymatique ou acide des coupes, nos observations préliminaires permettent d'affirmer que cette augmentation de l'incorporation au cours de la première heure intéresse principalement la fraction hydrosoluble, la fraction résiduelle et l'ARN; au contraire,

l'étude de la fraction ADN ne paraît pas permettre de conclusions bien définies, bien que, en général, l'incorporation semble y être diminuée.

(b) Si, après l'irradiation, on attend une heure à 37° C. avant de traiter par l'adénine-C¹⁴ pendant 3 heures, on observe que l'incorporation de l'adénine dans les cellules neurales diminue considérablement après irradiation; les extractions diverses auxquelles sont soumises les coupes avant l'autoradiographie indiquent que l'ADN et la fraction hydrosoluble sont principalement affectés.

(c) Notons qu'en aucun cas nous n'avons observé de variation dans l'affinité des cellules pour le vert de méthyle ou pour la pyronine.

Effets sur la division cellulaire

L'index mitotique des tubes neuraux normaux et celui des embryons irradiés a été déterminé: l'irradiation U.V. entraîne une nette augmentation du nombre des figures mitotiques aux divers niveaux du tube neural, comme l'indique le tableau 2.

TABLEAU 2

Nombre de mitoses pour cent cellules dans le tube neural normal (T) et irradié (U.V.)

Age (nombre de somites)	Niveau du tube neural					
	A		B		C	
	T	U.V.	T	U.V.	T	U.V.
3	9.6 (41/426)	23.7 (104/438)	7.5 (28/372)	7.2 (26/361)	6.8 (23/338)	8.3 (30/361)
4	2.3 (12/522)	16.2 (69/425)	3.7 (15/405)	12.1 (36/297)	2.2 (10/454)	9.1 (34/373)
5	8.8 (40/453)	13.6 (38/279)	3.5 (14/40)	8.5 (13/152)	1.9 (7/368)	6.2 (21/338)
	—	12.3 (51/414)	—	12.3 (44/358)	—	12.1 (28/231)
7	8.3 (48/578)	18.7 (88/470)	6.3 (26/412)	19.5 (63/322)	7.9 (19/240)	17.6 (81/460)

On a compté, sur neuf embryons, tous les noyaux correspondants à une coupe pour chaque section (A, B, C, A étant la portion céphalique et C la portion caudale). (Nombre de mitoses/Nombre de noyaux comptés.)

DISCUSSION

Quatre points semblent ressortir du présent travail:

- (1) L'incorporation de l'adénine dans les cellules du tube neural augmente *immédiatement* après l'irradiation U.V., puis elle diminue. Cette augmentation initiale semble concerner l'ARN, le résidu de l'hydrolyse acide et une fraction hydrosoluble; la diminution d'incorporation plus tardive semble surtout intéresser la fraction hydrosoluble.
- (2) En ce qui concerne l'incorporation de l'adénine dans l'ADN, elle semble

en règle générale être *diminuée* après l'irradiation U.V.; ce résultat mériterait d'être précisé.

- (3) Ces variations du métabolisme de l'*adénine* s'accompagnent d'une augmentation du nombre des figures mitotiques.
- (4) Comme l'avait déjà montré Davis (1944), la fermeture de la gouttière neurale est inhibée par l'irradiation U.V.

Il est difficile, à l'aide de ces données, d'établir une corrélation entre ces divers résultats. D'une part, les index mitotiques des segments *A*, *B* et *C* du tube neural sont du même ordre de grandeur; d'autre part, il existe un gradient d'incorporation de l'adénine qui va en augmentant vers la région caudale (Barbieri, 1960).

L'arrêt ou la diminution de l'incorporation dans l'ADN qui s'observe dans la plupart des expériences qui ne dépassent pas 3 heures d'incubation après l'irradiation, peut expliquer la *diminution* de l'index mitotique observée par Davis, 30 heures après l'irradiation. Dans l'expérience présente, on observe cependant une *augmentation* de l'index mitotique (cellules en métaphase ou parfois en anaphase) dans les embryons fixés 1, 2 ou 3 heures après l'irradiation. Ce résultat, qui porte sur l'observation de près de 10.000 cellules, n'est pas nécessairement en contradiction avec ceux de Davis, puisque ces observations ont été faites après un délai beaucoup plus long.

Il est probable qu'il s'agit réellement d'une augmentation du nombre de cellules qui *entrent* en mitose: en effet, dans la plupart des observations portant sur les types cellulaires les plus variés, il a été montré que, pour des doses de l'ordre de celles que nous avons utilisées, l'irradiation retarde l'entrée en mitose avant la prophase; au cours de la mitose elle-même, il est beaucoup plus difficile d'arrêter le processus (Gaulden, 1956). Il est très probable que si nous avions fixé les embryons 30 heures après l'irradiation, nous aurions effectivement observé une chute de l'index mitotique.

L'explication de l'augmentation de la synthèse de l'ARN et du nombre des mitoses dans les heures qui suivent l'irradiation doit logiquement trouver son explication dans un déplacement d'un équilibre dynamique cellulaire, résultant de l'arrêt d'un type particulier de métabolisme au profit de celui de l'ARN; ce dernier est peut-être nécessaire pour déclencher la mitose. Le ralentissement de la synthèse de l'ADN pourrait conduire à une augmentation des précurseurs ou des réserves d'énergie permettant un accroissement de la synthèse d'ARN et des mitoses. Il faudrait cependant savoir comment évolue le métabolisme des autres parties de l'embryon et préciser s'il y a une diminution des mouvements cellulaires, qui rendrait également disponible une certaine quantité d'énergie, avant de tirer des conclusions. Il est certain, en tous cas, qu'on observe effectivement un arrêt des mouvements des replis neuraux. En ce qui concerne le spectre d'action de Davis qu'il a interprété en 1944 comme reflétant une absorption par les stérols, il nous semble plus vraisemblable, à la lumière de nos connaissances actuelles sur le rôle des acides nucléiques et des protéines

dans la morphogénèse (Brachet, 1957), d'attribuer les maxima d'efficacité à 260 m μ et à 285 m μ à l'action des U.V. sur respectivement les acides nucléiques et les protéines.

SUMMARY

1. The incorporation of labelled adenine in the neural plate of ultra-violet irradiated chick embryos has been studied.
2. It has been confirmed that small doses of radiation inhibit the closure of the neural folds.
3. The incorporation of adenine increases immediately after radiation and decreases one hour after the treatment.
4. There is a significant increase of the mitotic index during this first hour.
5. In the light of previous results it is possible to attribute the inhibition of closure of the neural folds to some alteration in the metabolism of nucleic acids or proteins.

REMERCIEMENTS

Une bourse de la Rotary Foundation nous a permis la réalisation de ce travail. Nous remercions le Professeur M. Errera de ses précieux conseils dans l'interprétation de nos résultats.

TRAVAUX CITÉS

- BARBIERI, F. D. (1960). Incorporation de l'adénine-C¹⁴ dans l'embryon de poulet. *J. Embryol. exp. Morph.* **8**, 174-81.
- BRACHET, J. (1957). *Biochemical Cytology*. New York: Academic Press.
- DAVIS, J. C. (1944). Photochemical spectral analysis of neural tube formation. *Biol. Bull., Wood's Hole*, **87**, 73-95.
- FICQ, A. (1955). Étude autoradiographique du métabolisme de l'oocyte d'*Asterias rubens* au cours de la croissance. *Arch. Biol., Paris*, **66**, 509-24.
- GAULDEN, M. E. (1956). DNA synthesis and X-ray effects at different mitotic stages in grasshopper neuroblasts. *Genetics*, **41**, 5, 645.
- SPRATT, M. T. (1948). Development of the early chick blastoderm on synthetic media. *J. exp. Zool.* **107**, 39-63.
- TENCER, R. (1956). Dissertation non publiée.

(Manuscript received 27 : v : 60)