

**Variations au cours de la journée de l'incorporation in vivo de la leucine tritiée dans les protéines du cervelet et du cerveau du jeune rat normal et hypothyroïdien**

**Daily variations of the in vivo [<sup>3</sup>H]leucine incorporation into the cerebellar and cerebral proteins of the normal and hypothyroid young rat**

J. Dainat et A. Rebière

*Laboratoire de Neurobiologie, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, F-34060 Montpellier Cedex (France), 12 mai 1977*

**Summary.** In the normal and hypothyroid 6-day-old rat, the specific radioactivity (RSA) and the relative RSA (ratio of the RSA to the [<sup>3</sup>H] leucine concentration of the acid soluble phase) of the cerebral and cerebellar proteins, change during the day synchronously. They show a maximum at 15.00 h and a minimum at 03.00 h. At all stages studied, these values are significantly lower in the hypothyroid animals than in normal ones.

Chez le rat adulte, des variations circadiennes des synthèses protéiques ont été mises en évidence dans le cortex cérébral<sup>1</sup> et certaines aires du cerveau contrôlant la fonction gonadotropique<sup>2</sup>. Chez le jeune rat, comme chez l'adulte, le contenu du cerveau en monoamines<sup>3-5</sup>, et l'activité acétylcholinestérase du cerveau<sup>6-8</sup>, varient selon un cycle circadien.

L'étude de l'influence de la déficience thyroïdienne sur l'incorporation de la leucine tritiée dans les protéines du cervelet et du cerveau chez le jeune rat a révélé l'existence d'importantes variations de la radioactivité spécifique (RAS) et de la RAS relative des protéines d'un jour à l'autre durant les 10 premiers jours de la vie postnatale<sup>10</sup>. Il nous a donc paru intéressant de rechercher l'existence éventuelle de variations journalières de l'incorporation de la leucine tritiée dans les protéines du cervelet et du cerveau du jeune rat normal et hypothyroïdien.

**Matériel et méthodes.** L'étude est réalisée sur des rats Wistar (souche CF du CNRS) élevés au Laboratoire. La température de l'animalerie est constante et le régime des animaux

standard (UAR). La photopériode est de 12 h de lumière de 08.00 h à 20.00 h et de 12 h d'obscurité de 20.00 h à 08.00 h.

A la naissance, chaque portée est ramenée à 7 ou 8 animaux. Dans la moitié des portées, les jeunes sont rendus hypothyroïdiens par gavage quotidien de la mère avec 50 mg de propylthiouracile (PTU). Le traitement débute le 18<sup>e</sup> jour de gestation et se poursuit jusqu'à la veille du sacrifice des jeunes. A l'âge de 6 jours, c'est-à-dire le 7<sup>e</sup> jour après la mise bas, les animaux sont sacrifiés aux stades 03.00, 09.00, 15.00 et 21.00 h et le lendemain aux stades 03.00 et 09.00 h. Pour chaque stade, 4-6 animaux par groupe sont légèrement anesthésiés à l'éther, et reçoivent en injection i.v. 1 µCi dans 5 µl par g de poids corporel, d'une solution de L-4-[<sup>3</sup>H] leucine (RAS10Ci/mM, CEA France) rendue isotonique par du NaCl. 30 min après l'injection, les animaux sont saignés, le cervelet et le cerveau sont rapidement prélevés et pesés, les protéines sont extraites et leurs RAS mesurées selon les techniques décrites antérieurement<sup>11</sup>. L'étude statistique des données est réalisée par l'analyse d'un plan factoriel à effectifs

Variations au cours de la journée, de la radioactivité spécifique (RAS) et de la RAS relative (RAS des protéines/concentration en [<sup>3</sup>H] leucine de la phase acido-soluble) des protéines du cervelet et du cerveau chez des rats normaux (T) et hypothyroïdiens (h), âgés de 6-7 jours, 30 min après l'injection i.v. de 1 µCi de L-[<sup>3</sup>H] leucine par g de poids corporel

Age (jours)	Heures	Cervelet		RAS relative		Cerveau		RAS relative	
		RAS dpm/mg T	RAS dpm/mg h	T	h	T	h	T	h
6	03.00	15 054	10 903 (m)	10,8 (m)	3,2 (m)				
		± 2 230	± 1 997	± 5,3	± 0,5				
	09.00	16 381	13 038	18,0	8,6	13 358	9 818 (m)	20,5 (m)	9,6
		± 720	± 747	± 2,3	± 1,0	± 1 039	± 1 718	± 5,8	± 1,6
	15.00	18 865 (M)	18 619 (M)	20,5 (M)	12,3 (M)	15 413 (M)	11 530 (M)	25,6 (M)	11,1
		± 491	± 1 830	± 2,5	± 0,7	± 2 121	± 2 073	± 2,7	± 5,4
7	21.00	18 154	17 117	18,9	11,2	14 268	10 193	21,2	9,5
		± 1 090	± 2 916	± 2,7	± 1,7	± 1 515	± 1 513	± 4,6	± 2,2
	03.00	12 370 (m)	9 562	13,7 (m)	7,0 (m)	9 175 (m)	9 520 (m)	12,9 (m)	9,1
		± 3 191	± 1 265	± 4,2	± 0,9	± 2 336	± 887	± 3,7	± 1,0
09.00	15 480	13 661	16,9	11,5				13,2	11,1
		± 1 484	± 531	± 1,3	± 0,4			± 4,3	± 1,8

Significativité (test F)

Traitements	< 0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Stades	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Interaction	NS	< 0,05	< 0,05	NS

Chaque valeur représente la moyenne de 4-6 animaux ± l'erreur standard de la moyenne. L'étude statistique des données est réalisée par l'analyse de variance d'un plan factoriel à effectifs inégaux. La mise en évidence de maxima (M) et minima (m) est obtenue par un test de localisation des différences (test de Tukey) pour  $t = 0,05$  (test de Student). NS: différence non significative; ( $p > 0,05$ ).

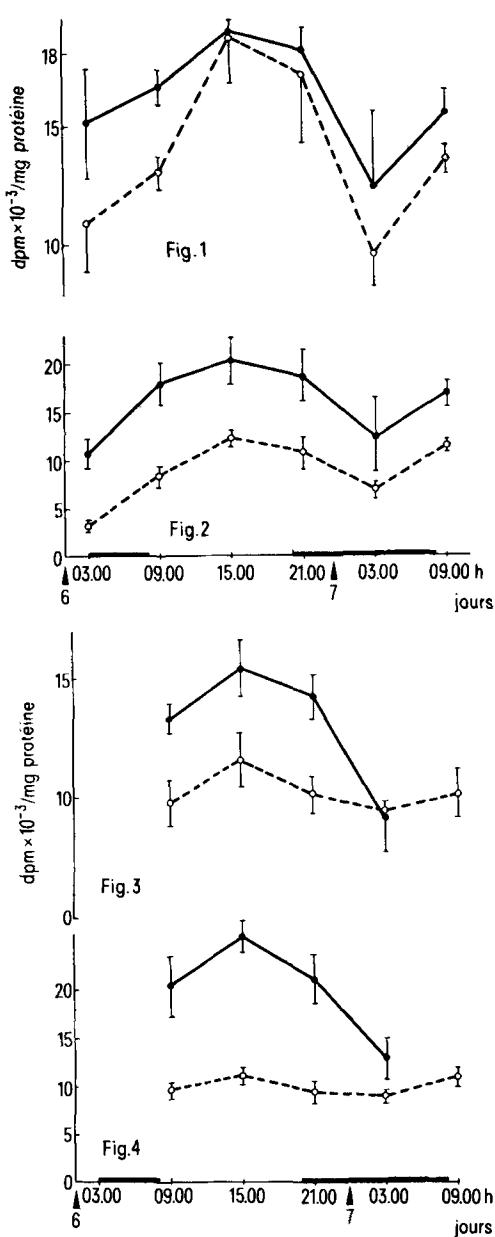
inégaux. C'est une analyse de variance à 2 voies de classifications (traitement-stades). La mise en évidence de maxima et minima est obtenue par un test de localisation des différences (test de Tukey<sup>12</sup>).

**Résultats.** La RAS et la RAS relative des protéines du cervelet et du cerveau des animaux hypothyroïdiens sont significativement inférieures à celles des animaux normaux (tableau, figures 1-4). Dans les 2 groupes d'animaux étudiés ces paramètres varient significativement en fonction des stades étudiés et on observe des interactions significatives entre les traitements et les stades étudiés pour la RAS du cerveau et la RAS relative du cervelet. Dans le cerveau et le cervelet des animaux normaux et hypothyroïdiens, la RAS des protéines comme la RAS

relative (rapport de la RAS à la concentration de [<sup>3</sup>H] de la phase acido soluble) est maximale à 15.00 h (période claire) et minimale à 03.00 h (période sombre).

Dans les 2 groupes d'animaux, le test de localisation des différences fait apparaître une différence significative entre le maximum 6 jours 15.00 h et les minima 6 jours 03.00 h de la RAS des protéines et 7 jours 03.00 h de la RAS relative chez les animaux normaux. Dans les 2 groupes d'animaux, on observe des différences significatives de la RAS des protéines du cerveau entre le maximum 6 jours 15.00 h et les minima 7 jours 03.00 h ainsi que 6 jours 09.00 h pour les animaux hypothyroïdiens. Chez les animaux normaux, la RAS relative des protéines du cerveau ne présente de différence significative qu'entre le maximum 6 jours 15.00 h et les minima 6 jours 09.00 h et 7 jours 03.00 h.

**Discussion.** La RAS et la RAS relative des protéines du cervelet et du cerveau sont significativement diminuées chez les animaux hypothyroïdiens par rapport à la normale comme cela a déjà été observé<sup>12-15</sup>. L'incorporation d'acides aminés marqués dans les protéines du cerveau présente des variations circadiennes chez le rat adulte<sup>1,2</sup>. Chez le jeune rat de 6 jours, nous constatons que l'incorporation de la [<sup>3</sup>H] leucine dans les protéines du cervelet et du cerveau présente des variations significatives durant la journée. Ces variations pourraient peut-être suivre un rythme circadien comparable à celui déjà observé pendant les 2 premières semaines postnatales pour le contenu du cerveau en monoamines et l'activité acétylcholinestérase du cerveau<sup>4,5,7</sup>. Chez les animaux normaux et hyperthyroïdiens, la RAS et la RAS relative des protéines du cervelet et du cerveau varient de manière synchrone. Si la RAS des protéines donne une idée des multiplications cellulaires<sup>11</sup>, d'ailleurs maximales à 6 jours<sup>16</sup>, les variations synchrones de la RAS et de la RAS relative des protéines entre les animaux normaux et hypothyroïdiens pourraient refléter une synchronisation de leurs multiplications cellulaires, ce qui pourrait signifier que leur cycle mitotique est comparable. Mais les variations durant la journée<sup>10</sup>, ainsi que les variations selon les heures de la journée de la significativité des différences de la RAS et de la RAS relative des protéines, entre les animaux normaux et hypothyroïdiens, incitent à beaucoup de prudence dans l'interprétation des résultats concernant l'influence sur la maturation biochimique du SNC de l'hypothyroïdie fœtale et néonatale. De telles études nécessitent donc une programmation minutieuse des expériences entreprises pour éviter que toute fluctuation imputable aux seules variations nycthémérales n'interfèrent avec celles imputables à l'action propre des traitements expérimentaux.



Figures 1-4. Variations au cours de la journée, de la radioactivité spécifique (RAS) (figures 1 et 3) et de la RAS relative (RAS des protéines/concentration en [<sup>3</sup>H] leucine de la phase acido-soluble) (figures 2 et 4) des protéines du cervelet (figures 1 et 2) et du cerveau (figures 3 et 4) chez des rats normaux, ●—●, et hypothyroïdiens, ○—○, âgés de 6-7 jours, 30 min après l'injection i.v. de 1  $\mu$ Ci de L-[<sup>3</sup>H] leucine par g de poids corporel.

1. K. Richardson et S. P. R. Rose, *Nature* 233, 182 (1971).
2. M. B. Ter Haar et P. C. B. McKinnon, *J. Endocrin.* 57, 44 (1973).
3. J. Axelrod, *Endeavour* 29, 144 (1970).
4. F. Okada, *Life Sci.* 10, 77 (1971).
5. F. Hery, E. Rover et J. Glowinski, *Brain Res.* 53, 445 (1972).
6. I. Hanin, R. Massarelli et E. Costa, *Science* 170, 341 (1970).
7. U. K. Moudgil et M. S. Kanungo, *Comp. gen. Pharmac.* 4, 127 (1973).
8. C. Mohan et E. Radha, *Life Sci.* 15, 231 (1974).
9. Y. Saito, I. Yamashita, K. Yamazaki, F. Okada, R. Satomi et T. Fujieda, *Life Sci.* 16, 281 (1975).
10. J. Dainat et A. Rebière, *J. Neurochem.* 26, 935 (1976).
11. J. Dainat, *J. Neurochem.* 23, 713 (1974).
12. J. W. Tukey, *Biometrics* 5, 99 (1949).
13. S. Geel, T. V. Valcana et P. S. Timiras, *Brain Res.* 4, 143 (1967).
14. J. Dainat, A. Rebière et J. Legrand, *J. Neurochem.* 17, 581 (1970).
15. I. Szijan, L. E. Kalbermann et C. J. Gomez, *Brain Res.* 27, 309 (1971).
16. J. Dainat et A. Rebière, *J. Neurochem.* 26, 941 (1976).