

176. Métabolisme des acides nucléiques de l'épithélioma atypique du rat

par Mme Yvonne Khouvine.

(26 V 46)

Depuis les travaux de *Caspersson*¹⁾ et ceux de *Mitchell*²⁾ sur l'absorption des rayons ultra-violetes par les acides nucléiques des cellules, on sait que l'acide ribonucléique joue un grand rôle dans la division cellulaire et dans la synthèse des protéines. *Brachet*³⁾ a montré par des colorations histochimiques et par l'action de la ribonucléase que les taux d'acides ribo- et thymonucléiques sont variables suivant l'état de la cellule. *Davidson* et *Waymouth*⁴⁾, entre autres, ont fait des dosages de ces acides sur différents tissus et ont montré que les tissus hépatiques en voie de régénération, les hépatomes et les adénocarcinomes de rats, le sarcome de *Rous*, quelques tumeurs humaines et les tissus embryonnaires sont plus riches en acide ribonucléique que les tissus normaux correspondants ou que les tissus à l'état de repos. Ils ont, en outre, trouvé qu'il y a dans les tissus plus d'acide ribonucléique que d'acide thymonucléique. Sans connaître ces derniers travaux qui nous sont parvenus il n'y a que quelques mois, nous avons, avec *Grégoire*⁵⁾, montré que les tissus des cancers du sein, de l'utérus, de l'estomac et du rectum, contiennent 2 à 3 fois plus d'acide ribonucléique que les tissus sains correspondants, prélevés sur un fragment excisé au voisinage de la partie malade, et que le tissu cancéreux «normal» de l'épithélioma atypique du rat (souche de l'Institut du Cancer de Villejuif) est également plus riche en acide ribonucléique que le tissu nécrosé ou que la peau de rat épilée et écharnée. Nous avons, en outre, montré que les tissus embryonnaires de poulet sont encore plus riches en acide ribonucléique que les tissus cancéreux, si l'on rapporte les valeurs trouvées au poids sec et non au poids frais, car la teneur en eau de l'embryon de poulet (90 %) est plus grande que celle des tissus cancéreux (80 %).

Pour compléter ces recherches, nous avons étudié le métabolisme des acides nucléiques de l'épithélioma atypique du rat en dosant, dans les tissus cancéreux et nécrosés, l'acide thymonucléique par la méthode de *Dische*⁶⁾, l'acide ribonucléique par celle de *Hoffman*⁷⁾,

1) *T. Caspersson*, Skand. Arch. Physiol. **73**, suppl. 8 (1936).

2) *J. S. Mitchell*, Brit. J. Exp. Path. **23**, 285; **86**, 309 (1942).

3) *J. Brachet*, C. r. Soc. Biol. **193**, 193 (1945).

4) *J. N. Davidson*, *C. Waymouth*, Biochem. J. **38**, 375, 379 (1944).

5) *Y. Khouvine* et *J. Grégoire*, C. r. Soc. Biol. **133**, 142 (1945).

6) *Z. Dische*, Mikroch. **8**, 4 (1930).

7) *W. S. Hoffman*, J. Biol. Chem. **73**, 15 (1927).

les nucléotides totaux par précipitation sous forme de sel d'urane et dosage de l'azote total du précipité, les nucléotides puriques, les nucléosides puriques et les purines libres par la méthode de *Kerr* et l'azote purique total résiduel par la méthode de *Kruger*¹⁾ modifiée par *Vend्रेly* et *Sarciron*³⁾.

Tableau 1.

Utérus				Estomac				Sein			
Cancéreux		Sain		Cancéreux		Sain		Cancéreux		Sain	
Frais	Sec	Frais	Sec	Frais	Sec	Frais	Sec	Frais	Sec	Frais	Sec
%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
0,18	0,84	0,13	0,60	0,26	1,30	0,16	0,79	0,23	1,12	0,15	0,75
0,38	1,90	0,10	0,45	0,33	1,67	0,14	0,68	0,42	2,10		
								0,50	2,50		
								0,10	0,49	0,05	0,25
								0,13	0,66		

Rectum				Epithélioma atypique du rat			
Cancéreux		Sain		Tissu cancéreux		Tissu nécrosé	
Frais	Sec	Frais	Sec	Frais	Sec	Frais	Sec
%	%	%	%	%	%	%	%
0,08	0,40	0,02	0,10	0,40	2,10	0,14	0,74
0,07	0,35			0,37	1,95		
				0,36			
				0,42			

Embryon de poulet		
	Frais	Sec
	%	%
9 j.	0,17	1,70
13 j.	0,18	1,80
15 j.	0,19	1,90

Les poids des tissus cancéreux et nécrosés que l'on obtient avec une seule tumeur sont, en général, trop faibles, surtout quand la tumeur est jeune, pour qu'on puisse faire toute cette série de dosages. Il est, en outre, difficile de comparer les dosages de plusieurs substances faits sur différentes tumeurs, chaque série de résultats étant elle-même assez variable. Aussi avons-nous prélevé plusieurs tumeurs à la fois et mélangé les tissus cancéreux d'une part et nécrosés d'autre part. Chaque résultat est donc déjà un résultat moyen.

Il faut environ, en poids de tissu frais, 2 gr. de tissu cancéreux normal et 5 gr. de tissu nécrosé pour un dosage d'acide ribonucléique, 2 gr. de chaque tissu pour un dosage d'acide thymonucléique et, respectivement, 1 gr. pour les nucléotides totaux, les nucléotides puriques et l'azote purique résiduel. La délipidation est faite dans l'appareil de *Kumagawa*, soit avant, soit après l'extraction trichloracétique, 16 heures par l'acétone, 8 heures par l'alcool, 8 heures par l'éther et enfin 8 heures par l'acétone.

¹⁾ *M. Kruger, A. Schittenhelm, Z. physiol. Ch.* **45**, 14 (1905).

²⁾ *M. Kruger et J. Schmid, id.* 1.

³⁾ *R. Vend्रेly, R. Sarciron, Bl. Soc. Chim. biol.* **26**, 214 (1944).

Tableau 2.
Extraction acétonique préalable.

Nature des tissus	Acide RbN du résidu egr./100 gr.	Acide RbN du filtrat egr./100 gr.	Total acide RbN egr./100 gr.	Acide ThyN du tissu egr./100 gr.	Rapport $\frac{\text{ThyN}}{\text{RbN}}$	N purique du résidu egr./100 gr.	N des Nucléotides totaux egr./100 gr.	N des Nucléotides puriques egr./100 gr.	N des Nucléosides et purines libres egr./100 gr.	Nombre de tumeurs
Cancéreux Nécrosé	48,9	5,3	59,2	78,6	1,3	13	1,0			8
	18,1	2,2	22,3	71,7	3,2	10,5	1,0			
Cancéreux Nécrosé	36,8	3,9	40,7			15,3		5,0	7,2	8
	12,0	0,2	12,2			17,0		4,0	6,8	
Cancéreux Nécrosé	27,5	2,9	30,5	82,3	2,7	12,0	5,3	2,4	2,1	4
	6,8	1,6	8,4	62,1	7,3	17,0	2,3	0,7	1,3	
Cancéreux Nécrosé	31,2	2,4	33,6	57,4	1,7	18,1	5,9	2,8	2,1	7
	12,1	0,9	13,0	67,6	5,2	15,4	3,0	2,5		
Cancéreux Nécrosé	48,0	1,7	49,7	74,3	1,5	17,2	6,3	3,2	2,3	2
	12,7	0	12,7	95,7	7,5	15,9	3,2	1,9	2,9	
Cancéreux Nécrosé	28,2	0	28,2	72,4	2,6	13,4	1,3	2,1	2,9	2
	4,2	traces	4,2	95,7	22,6	12,1	1,3	1,1	1,3	
Cancéreux Nécrosé	60,0	0,8	60,8	83,2	1,4	12,8	4,6	2,0	1,4	6
	19,2	traces	19,2	101,5	52,8	15,6	3,5	2,0	1,3	

Les animaux sont tués par décapitation, les tumeurs sont prélevées, mises dans une boîte de *Petri* reposant sur de la glace et le tissu nécrosé est séparé du tissu cancéreux à l'aide d'un scalpel. Nous avons vérifié sur des coupes histologiques que cette séparation est tout à fait bonne quand on ne conserve pour les dosages que les fragments nettement caractérisés.

Délipidation préalable. Les tissus pesés sont additionnés d'acétone, coupés aux ciseaux, puis délipidés dans l'appareil de *Kumagawa*, d'abord par l'acétone, puis par l'alcool, l'éther et enfin par l'acétone. On laisse évaporer l'excès de solvant et l'on broye le tissu dans un moulin à café turc. La poudre obtenue est pesée, puis délayée au mortier avec un peu d'acide trichloracétique à 10% et extraite avec 5 fois son poids de solution acide. On triture pendant $\frac{1}{2}$ heure, on filtre sur verre fritté et l'on fait une deuxième extraction avec la même quantité d'acide. On filtre, on réunit les filtrats et on fait sécher la poudre au dessiccateur ou dans l'étuve à 100—105°. Sur les tissus, on dose l'acide thymonucléique, l'acide ribonucléique et les purines résiduelles. Dans le filtrat amené à un volume connu, on dose les nucléotides totaux, les nucléotides puriques et les nucléosides puriques avec l'azote purique libre.

Extraction trichloracétique préalable. Les tissus pesés sont additionnés de 5 fois leur poids d'acide trichloracétique, coupés finement aux ciseaux puis traités comme nous l'avons indiqué ci-dessus. Après la seconde extraction, on fait la délipidation. Dans les filtrats trichloracétiques et sur les tissus séchés, on fait les mêmes dosages que ci-dessus.

Ces techniques ont été employées non seulement pour les tissus des tumeurs et des métastases, mais aussi pour le sang des rats normaux et cancéreux.

Nous avons également fait des dosages d'acide urique par la méthode de *Folin*¹⁾, d'allantoïne par la méthode de *Young, MacPherson, Wentworth et Hawkins*²⁾ et d'urée par la méthode de *Cuny et Robert*³⁾.

Nos résultats sont réunis dans les tableaux 2 et 3.

On voit d'après ces tableaux que la teneur en acide ribonucléique d'un même tissu est variable d'une expérience à l'autre, mais que la teneur du tissu cancéreux «normal» est toujours 3 à 6 fois plus grande que celle du tissu nécrosé. En revanche, le taux d'acide thymonucléique varie, le plus souvent, assez peu ou bien est plus élevé dans le tissu nécrosé que dans le tissu cancéreux. Il semble que ces dernières variations soient dues à un état plus ou moins avancé de nécrose, car le taux d'acide thymonucléique est le plus élevé dans les tumeurs les plus grosses (celles de 2 rats qui pesaient chacune environ 35 g) où le tissu nécrosé ne contient plus guère que des noyaux. Dans les métastases, ces résultats sont encore plus nets, les tissus étant, si l'on peut dire, beaucoup plus purs.

Quant au rapport acide thymonucléique/acide ribonucléique, il est plus grand pour le tissu nécrosé que pour le tissu cancéreux, et il est toujours plus grand que l'unité. *Davidson et Waymouth*⁴⁾ ont obtenu un rapport acide ribonucléique/acide thymonucléique

1) *Folin*, J. Biol. Chem. **101**, 111 (1933); **106**, 311 (1934).

2) *E. G. Young, C. C. MacPherson, H. P. Wentworth, N. W. Hawkins*, J. Biol. Chem. **142**, 839 (1944).

3) *L. Cuny et J. Robert*, J. Pharm. Chim. **15**, 7 (1932).

4) Loc. cit.

voisin de 2 et souvent bien supérieur à 2, alors que nous obtenons un rapport inverse au moins égal à 1,3 et qui peut même être égal à 53 dans le tissu nécrosé des métastases.

Tableau 3.

Extraction trichloracétique préalable.

Nature des tissus	Acide RbN du résidu cgr./100 gr.	Acide RbN du filtrat cgr./100 gr.	Total acide RbN cgr./100 gr.	Acide ThyN du tissu cgr./100 gr.	Rapport $\frac{\text{ThyN}}{\text{RbN}}$
Cancéreux	54,6	3,9	58,5	78,1	1,3
Nécrosé	15,7	2,0	17,7	70,3	3,9
Cancéreux	43,6	1,6	45,2	60,4	1,3
Nécrosé	11,7	9,4	21,1	67,2	3,1
Cancéreux	50,2				
Nécrosé	26,6				
Cancéreux	53,5				
Nécrosé	11,7				
Nature des tissus	N purique du résidu cgr./100 gr.	N des Nucléotides totaux cgr./100 gr.	N des Nucléotides puriques cgr./100 gr.	N des Nucléosides et purines libres	Nombre de tumeurs
Cancéreux	11,2	5,2	1,5	1,6	7
Nécrosé	7,5	5,5	1,3	1,8	
Cancéreux	15,2	4,4	2,5	2,4	7
Nécrosé	8,4	3,6	1,6	4,6	
Cancéreux	10,5		2,1		8
Nécrosé	11,6		1,4		
Cancéreux	9,1		1,7		3
Nécrosé	8,7		1,6		

Les tissus de l'épithélioma atypique du rat sont donc très riches en acide thymonucléique et leur thymonucléoprotéine s'extrait, d'ailleurs, assez facilement. Cependant, on ne peut conclure, même lorsque dans le tissu nécrosé l'acide thymonucléique augmente alors que l'acide ribonucléique disparaît, à une synthèse de l'un aux dépens de l'autre, car on ne peut dire qu'un poids donné de tissu nécrosé correspond à un poids égal de tissu cancéreux.

Les tableaux 2 et 3 montrent encore que les taux de nucléotides et de nucléosides sont faibles et que leurs variations d'un tissu à l'autre, quand il y en a, ne rendent pas compte de la disparition de l'acide ribonucléique. Que devient cet acide? Nous l'avons recherché en vain sous la forme de produits dérivant des purines tels que l'acide urique, l'allantoïne ou l'urée. Les taux de ces substances varient autour d'un chiffre moyen, d'un animal à l'autre, mais ne varient pas plus chez les animaux cancéreux que chez les témoins. La composition du sang, elle-même, reste constante. Il faut donc penser que l'élimination des produits de dégradation, s'il y en a, se fait par les reins qui restent normaux pendant le développement de la tumeur.

Comment disparaît l'acide ribonucléique? Probablement sous l'action d'un enzyme qui pourrait être la ribonucléase. Nous avons essayé de montrer que le tissu nécrosé était riche en ribonucléase par la méthode de *Bain et Rusch*¹⁾, dans le dispositif de *Warburg*, et nous avons vu que ce tissu homogénéisé ne contient même pas plus de ribonucléase qu'un rein de rat normal, qui lui-même en contient très peu. Cependant on ne peut conclure que le tissu nécrosé ne contient pas un enzyme capable d'attaquer l'acide ribonucléique du tissu cancéreux de l'épithélioma atypique du rat parce qu'il n'attaque pas celui de la levure. Nous essayons, actuellement, de préparer l'acide ribonucléique de cette tumeur afin de poursuivre nos recherches.

Institut de Biologie physico-chimique.
Service de biochimie, Paris.

¹⁾ *J. A. Bain, H. P. Rusch, J. Biol. Chem. 153, 569 (1944).*
