



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Nancy I

Spécialité : Biologie du Développement

par

Eric CIOLEK

-=-=-=-=-

**Effets de la triiodothyronine endogène et exogène, et du clofibrate sur
les peroxysomes hépatiques des Amphibiens Anoures.**

-=-=-=-=-

Soutenue le 12 juillet 1991 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

Président :	J. HUGON, Professeur (Sherbrooke-Québec)
Rapporteurs :	G. GRIGNON, Professeur (Nancy I)
	F. VAN HOOFF, Professeur (Bruxelles)
Autres jurés :	M. DAUÇA, Professeur (Nancy I)
	J. HOURDRY, Professeur (Paris XI)
	J. MAGDALOU, D.R. CNRS (Nancy I)

AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Mes remerciements vont tout d'abord à Monsieur le Professeur M. DAUÇA qui a dirigé ce travail. Je lui adresse mes plus vifs remerciements pour les conseils et les encouragements qu'il m'a toujours prodigués pendant ces quelques années passées dans son laboratoire. C'est avec le plus grand plaisir que j'ai travaillé sous sa direction et je tiens à lui exprimer ici ma reconnaissance.

La présence de Monsieur le Professeur F. VAN HOOFF dans ce jury est pour moi un grand honneur. Mon initiation aux techniques de dosages des enzymes peroxysomales s'est faite dans son laboratoire à Bruxelles et ses conseils ont toujours été pour moi bienveillants. Je lui adresse mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur G. GRIGNON a bien voulu, malgré ses nombreuses charges, être le rapporteur de ce travail. Je lui exprime ici ma respectueuse gratitude.

Je suis reconnaissant à Monsieur le Professeur J. HUGON et je le remercie vivement, d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Monsieur le Professeur J. HOURDRY a bien voulu juger ce travail en participant à ce jury. Que ce soit pour moi l'occasion de lui exprimer ma sincère reconnaissance.

Je remercie également le Professeur J. MAGDALOU pour sa participation au jury.

Je voudrais encore remercier particulièrement MM A. BAUTZ et J. VAMECQ pour l'aide qu'ils m'ont apportée.

Ma reconnaissance s'étend aussi à l'ensemble de l'équipe du Laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement sans qui ce travail n'aurait jamais pu aboutir.

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	5
MATERIELS ET METHODES.....	12
I. Matériels.....	12
A) <u>Matériels biologiques et expérimentaux</u>	12
1) Métamorphose naturelle.....	12
2) Métamorphose induite par la triiodothyronine	13
3) Traitement au clofibrate	14
B) <u>Marqueurs moléculaires</u>	14
II. Méthodes	14
A) <u>Microscopie électronique</u>	14
B) <u>Cytochimie ultrastructurale de la catalase</u>	15
C) <u>Préparation des homogénats de foie</u>	15
D) <u>Fractionnement cellulaire</u>	15
E) <u>Dosage des protéines</u>	16
F) <u>Dosages de l'activité des enzymes peroxysomales</u>	16
1) La catalase	16
2) Les oxydases	17
3) La β -oxydation peroxysomale	18
G) <u>Etude électrophorétique des protéines</u>	18
1) Préparation des extraits	18
2) Electrophorèse monodimensionnelle en présence de SDS	19
3) Révélation des protéines	19
4) Immunodétection de la catalase et de la D-aminoacide oxydase	19
5) Electroélution de la catalase	20

RESULTATS	21
I. Etude morphologique et biochimique du comportement des peroxysomes hépatiques au cours de la métamorphose spontanée des Amphibien Anoures.....	21
A) <u>Phase larvaire</u>	21
1) Etude morphologique	21
2) Etude biochimique	22
a) Activité de la catalase	22
b) Activités des oxydase peroxysomales	22
B) <u>Métamorphose spontanée</u>	23
1) Etude morphologique	23
2) Dosages biochimiques	24
a) Teneur protéique	24
b) Activité catalasique	24
c) Activité des oxydases peroxysomales	24
II. Etude morphologique et biochimique du comportement des peroxysomes hépatiques au cours de la métamorphose induite des Amphibiens Anoures	25
A) <u>Larve traités au propylthiouracyl</u>	25
1) Etude morphologique	25
2) Etude biochimique	25
a) Activité de la catalase	25
b) Activité des oxydases peroxysomales	26
B) <u>Impact de la triiodothyronine</u>	26
1) Etude morphologique	26
2) Etude biochimique	26
a) Activité de la catalase	26
b) Activité des oxydases peroxysomales	27

III. Effets du clofibrate sur les peroxysomes hépatiques des Anoures 27

A) <u>Etude morphologique</u>	27
1) Stade larvaire	27
2) Stade adulte	28
B) <u>Etude biochimique</u>	29
1) Stade larvaire	29
2) Stade adulte	29
a) Poids corporel et hépatique	29
b) Teneur protéique	29
c) Activités enzymatiques peroxysomales	29
α - Homogénats hépatiques	30
β - Fraction L, enrichie en peroxysomes	30
C) <u>Etude électrophorétique</u>	31
1) Impact du clofibrate sur le profil électrophorétique des fractions enrichies en peroxysomes	31
2) Expression de la catalase et de la D-aminoacide oxydase	31
a) Catalase	31
b) D-aminoacide oxydase	32
DISCUSSION	33
CONCLUSION	42
BIBLIOGRAPHIE	44

Annexe I : Developmental patterns of peroxysomal enzymes in Amphibian liver during spontaneous and triiodothyronine-induced metamorphosis.

Comp. Biochem. Physiol. **93**, 477-484, 1989.

Annexe II : The effect of clofibrate on Amphibian hepatic peroxisomes.

Biology of the Cell (Sous Presse)

Abréviations

BSA = Serumalbumine bovine

Cat = Catalase

CoA = Coenzyme A

DAAOxase = D-aminoacide oxydase

DEHP = Di(2 ethylhexyl)phthalate

EDTA = Acide éthylènediamine tétraacétique

FAD = Flavine adenine dinucléotide

FAOxase = Fatty acyl-coA oxydase

FMN = Flavine mononucléotide

H₂O₂ = Peroxyde d'hydrogène

KCN = Cyanure de potassium

MOPS = Acide morpholino-4 propane sulfonique

NAD⁺, NADH = (réduit) nicotinamide adenine dinucléotide

PBE = Protéine bifonctionnelle = Enoyl coA hydratase/3 hydroxyacyl coA deshydrogénase

PMSF = Phenyl methyl sulfonyl fluoride

SDS = Dodecylsulfate de sodium

T₃ = 3,3',5' triiodo-L-thyronine

T₄ = Thyroxine

Urate ox. = urate oxydase

INTRODUCTION

Définition et Fonctions des peroxysomes

Les peroxysomes ont été découverts par Rodhin (1954) à la suite d'observations ultrastructurales des cellules rénales de Rat. La présence de ces organites dans les hépatocytes de Mammifères fut ensuite constatée par Rouiller et Bernard (1956). Par la suite ces organites furent identifiés dans la plupart des cellules aérobies, animales et végétales. La difficulté rencontrée alors pour les repérer au microscope électronique, en raison de leur matrice granuleuse qui se confond avec le contenu du cytoplasme, fut surmontée définitivement grâce à la mise au point par Novikoff et Goldfisher (1969) et Novikoff et coll. (1972) d'une technique cytochimique ultrastructurale permettant de les visualiser grâce à leur activité catalasique. La taille des peroxysomes varie de 0,1 à 1 μm de diamètre selon les types cellulaires considérés. Certains peroxysomes renferment une structure polytubulaire caractéristique appelée nucléoïde (Hruban, 1964). Cependant dans certains types cellulaires (intestin, cerveau...) les peroxysomes sont dépourvus de nucléoïde et leur taille n'excède pas 0,35 μm de diamètre, leur méritant le nom de microperoxisomes (Novikoff et Novikoff, 1972). Le terme de peroxysome fut introduit par De Duve (1965) et cette dénomination fut alors étendue aux vésicules limitées par une simple membrane et contenant diverses oxydases qui produisent toute du peroxyde d'hydrogène. Ces organites contiennent plus de quarante enzymes différentes (Tolbert, 1981) qui interviennent dans de nombreuses voies métaboliques.

Ils catabolisent les purines (Visentin et Allen, 1969) ainsi que certains acides aminés, notamment ceux de la forme D (Master et Holmes, 1977). Le produit final de la dégradation des purines (xanthine, hypoxanthine) varie d'une espèce à l'autre. La dégradation des purines en urate est commune à l'ensemble des espèces animales, alors que la dégradation de l'urate est moins complète chez les espèces évoluées (Fig. 1). Les

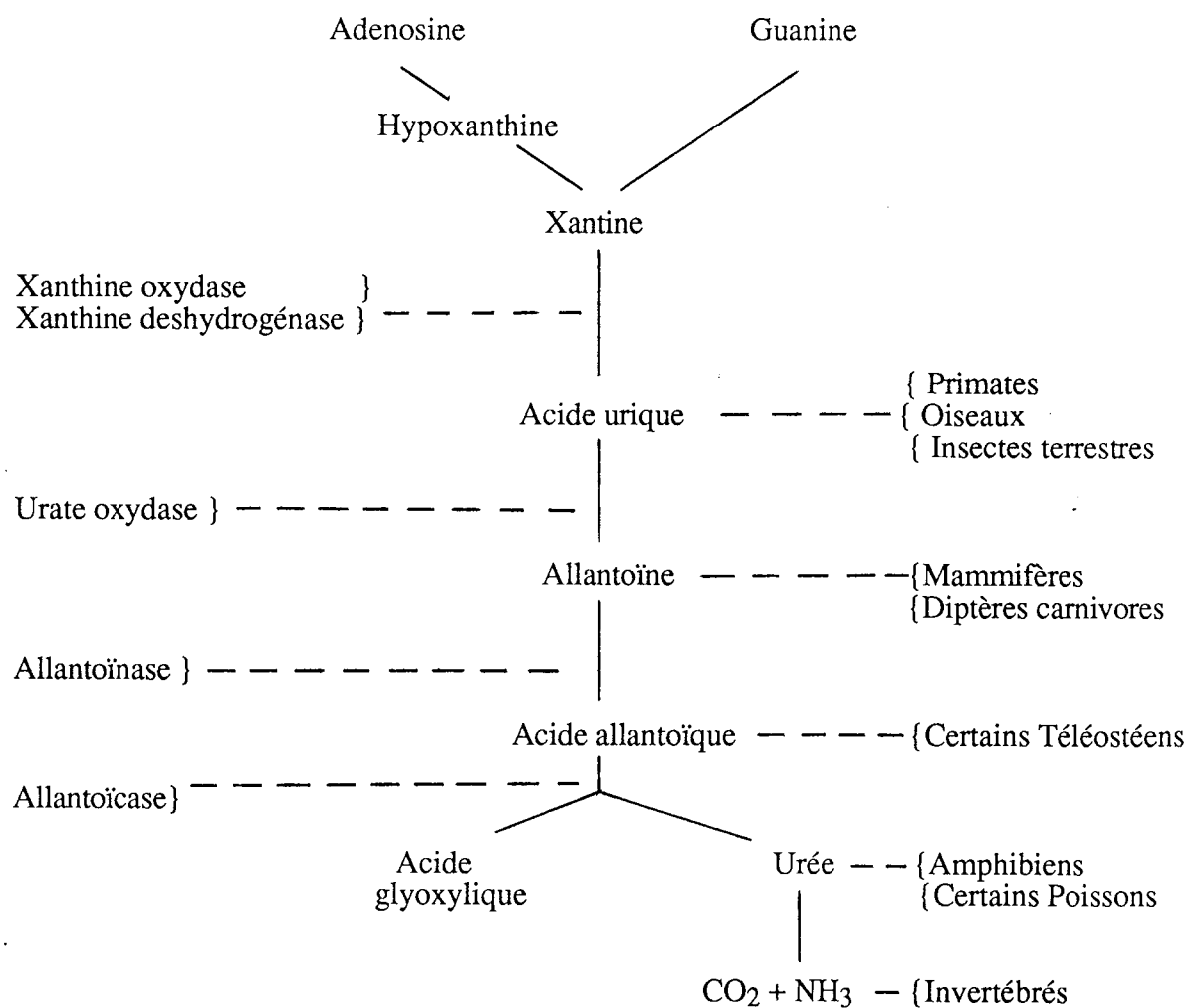


Figure 1 : Réactions du catabolisme des purines
(Scott et coll., 1969)

enzymes impliquées dans la dégradation des purines en urate sont localisées dans le cytoplasme chez les Poissons et les Amphibiens, tandis que celles qui assurent la conversion de l'urate en urée et glyoxylate (uricase, allantoïnase, allantoïcase) sont situées dans les peroxysomes (Fujiwara et coll., 1987). Dans le foie de Rat, la xanthine oxydase et l'urate oxydase ont été localisées dans le nucléoïde des peroxysomes (Angermüller et coll., 1987). Au cours de l'évolution certaines de ces enzymes ont disparu des peroxysomes. Les Vertébrés supérieurs sont dépourvus d'allantoïnase et d'allantoïcase. L'urate oxydase n'est pas détectée dans les peroxysomes hépatiques des Reptiles et de certains Primates, dont l'Homme.

Certaines réactions peroxysomales sont de nature anabolique. Les peroxysomes participent ainsi à la formation des acides biliaires par l'intermédiaire de la β -oxydation peroxysomale qui modifie les chaînes latérales du cholestérol (Pedersen et coll, 1980). Par ailleurs les trois premières étapes de la biosynthèse des plasmalogènes s'effectuent dans les peroxysomes (Hajra et coll., 1982).

Dans les cellules végétales, certains peroxysomes ont la faculté de transformer les graisses en hydrates de carbone par l'intermédiaire du cycle glyoxylique (Beevers, 1969); pour cette raison on les nomme glyoxysomes. L'existence des enzymes-clés de cette néoglucogenèse (isocitrate lyase et malate synthétase) n'a été démontrée dans le règne animal que dans les tissus cartilagineux du Rat et du Poulet (Davis et coll, 1986 ; Davis et coll, 1988), ainsi que dans l'épithélium de la vessie de *Bufo marinus* (Goodman et coll, 1980).

Les peroxysomes jouent également un rôle important dans la β -oxydation des acides gras. Lazarow et De Duve (1976) ont démontré que dans cette voie métabolique interviennent trois enzymes (Fig. 2). La première de ces enzymes est la fatty-acyl coA oxydase qui conduit à la formation d'un trans-2-enoyl coA et d'eau oxygénée (Osumi et Hashimoto, 1978). Les deux réactions suivantes sont catalysées par un complexe enzymatique bifonctionnel comportant l'enoyl coA hydratase et la 3-hydroxyacyl coA deshydrogénase et utilisant le NAD comme cofacteur. La dernière étape de ce cycle fait intervenir une β -ketothiolase qui aboutit à la formation d'un acetyl-coA et d'un acide gras ayant perdu deux atomes de carbone. Les substrats de cette β -oxydation peroxysomale sont des acides gras à très longue chaîne carbonée (Singh et coll., 1987) des acides gras mono- et polyinsaturés à longue chaîne carbonée (Kärki et coll., 1987) ainsi que les acides dicarboxyliques à chaîne longue et moyenne (Vamecq et Draye, 1987). Ce système enzymatique diffère sur plusieurs points avec celui présent dans les mitochondries. La β -oxydation peroxysomale est insensible *in vitro* au cyanure de potassium alors que ce produit bloque le transfert des électrons couplé à la β -oxydation mitochondriale. Les quatre enzymes qui interviennent dans la β -oxydation mitochondriale sont distinctes de celles décrites dans les peroxysomes et n'utilisent comme substrats que des acides gras à

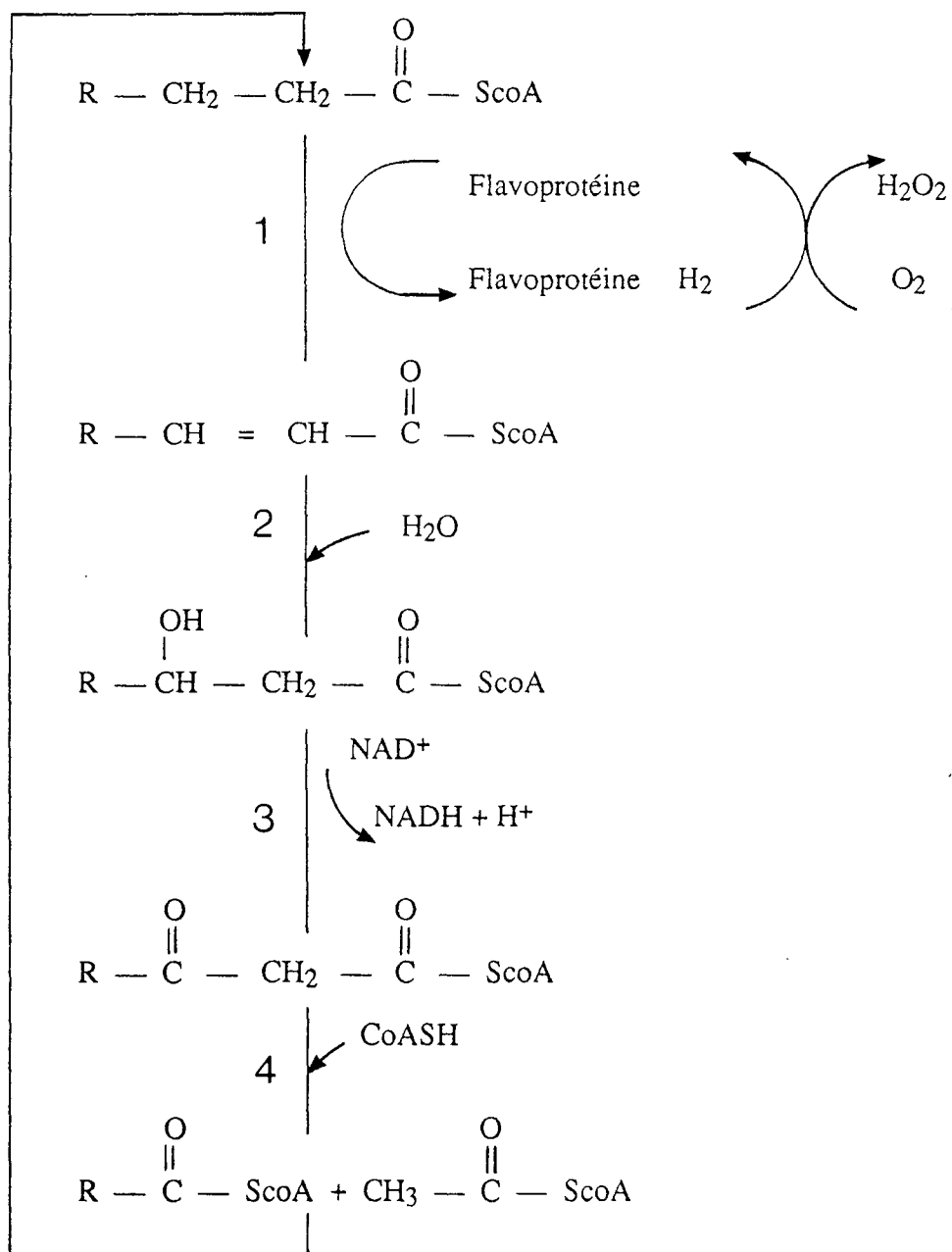


Figure 2 : β -oxydation peroxysomale

- 1 : Fatty-acylCoA oxydase
- 2 : Enoyl-CoA hydratase
- 3 : 3-hydroxyacyl coA déshydrogenase
- 4 : β -ketothiolase

moyenne ou courte chaîne carbonée. Enfin la réalisation de la β -oxydation peroxysomale ne conduit pas à la formation de composés énergétiques stockables.

L'eau oxygénée produite par toutes les oxydases peroxysomales est décomposée par une protéine majeure de la matrice des peroxysomes : la catalase. Cette enzyme est un tétramère de 240 Kd qui possède un hème comme groupement prosthétique. Cette enzyme dégrade l'eau oxygénée selon deux procédés : soit par peroxydation, c'est à dire en oxydant divers substrats tels que alcool, phénol ou nitrite, soit catalytiquement en formant de l'eau et de l'oxygène (Fig. 3).

La consommation d'oxygène par ces organites représente 30 à 50 % de celle de l'ensemble de la cellule (De Duve et Baudhuin, 1966). L'énergie produite au cours de cette respiration peroxysomale est dissipée sous forme de chaleur. L'ensemble de ces réactions contribue à la thermogenèse (Hryb, 1981).

L'intérêt porté aux peroxysomes a permis d'établir plusieurs faits qui suggèrent une contribution active de ces organites dans le métabolisme cellulaire général. La compréhension du rôle physiologique des peroxysomes chez les Mammifères doit être attribuée pour une part importante à la découverte de maladies génétiques liées à la dysgenèse et au dysfonctionnement de ces organites. Ainsi en 1973, Goldfisher et coll. ont montré que les nouveaux-nés atteints du Syndrome de Zellweger ne présentaient pas de peroxysomes dans le foie, le rein et le cerveau. Cette maladie est due à une mutation autosomique à caractère récessif qui conduit à la mort de l'enfant au cours de la première année. De nombreuses autres maladies génétiques peroxysomales sont aujourd'hui répertoriées (Goldfisher, 1988).

Ontogenèse des peroxysomes et biogenèse de leurs enzymes

Lors du développement embryonnaire des Mammifères, le nombre des peroxysomes hépatiques augmente pendant la période péri-natale (Tsukada et coll., 1968; Hruban et Reicheigl, 1969 ; Kralhing et coll., 1979 et David, 1980). Il en est de même dans l'intestin (Pipan et Psenicnik, 1975 ; Calvert et Ménard, 1978) et dans le rein (Miles et Holmes, 1975 ; Goeckermann et Vigil, 1975). Ainsi dans le foie de Rat, le nombre des peroxysomes est multiplié par trois pendant cette période (Dvorak et Mazanec, 1967). Le volume des peroxysomes hépatiques augmente après la naissance (Rohr et coll., 1970) mais David (1980) note que la taille individuelle des peroxysomes a tendance à diminuer dans le foie du Rat après la naissance. Dans le foie de la Souris, Essner (1969) met en évidence deux types de peroxysomes : des petits dépourvus de nucléoïde et qui apparaissent au 16^e jour de gestation et des peroxysomes plus gros avec un nucléoïde qui

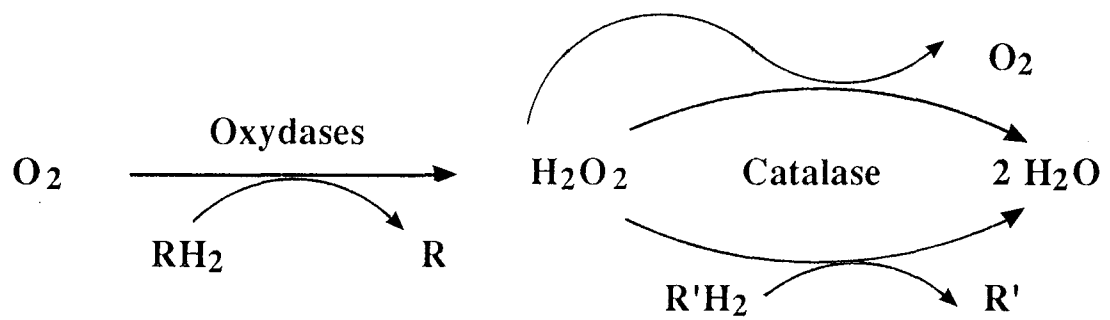


Figure 3 : Peroxysomes et métabolisme de l'eau oxygénée. Le substrat RH_2 est oxydé par les oxydases peroxysomales. L' H_2O_2 formée peut être transformée par la catalase en libérant de l'oxygène moléculaire ou en oxydant un substrat $\text{R}'\text{H}_2$.

cotoient les plus petits peroxysomes dans le foie de fœtus plus âgés. Dans l'épithélium intestinal de la Souris, les microperoxysomes sont mis en évidence dès le 15^e jour de gestation. Leur nombre augmente pour atteindre un maximum au 18^e jour. La fréquence des organites demeure ensuite constante durant les quatre premières semaines de la vie post-natale alors que l'activité catalasique continue de croître (Pipan et Psenicnik, 1975 ; Calvert et Ménard, 1978). Parallèlement à l'élévation du nombre des peroxysomes pendant la période périnatale, il a toujours été constaté une augmentation des activités de la catalase, de la DAAOxase et de l'urate oxydase (Tsukada et coll., 1968 ; Goeckermann et Vigil, 1975 ; Holmes, 1971). Mais si le nombre maximal des peroxysomes est atteint environ trois semaines après la naissance, l'activité des enzymes peroxysomales continue de croître pendant cinq à sept semaines (Patton et Nishimura, 1967). Les peroxysomes hépatiques et rénaux ont aussi été étudiés au cours du développement des Oiseaux (Essner, 1970). Le nombre des peroxysomes et l'activité enzymatique de la catalase augmentent régulièrement après la naissance chez le Poulet.

Ces divers travaux ont largement contribué à une meilleure compréhension de la biogenèse des peroxysomes. Il a ainsi été démontré que des protéines de la membrane, de la matrice et du nucléoïde des peroxysomes sont synthétisées dans le cytoplasme sur des polyribosomes libres (Fujiki et coll., 1984 ; Lazarow et coll., 1982). Elles sont ensuite transportées dans des peroxysomes préexistants, le plus souvent sans modifications post-translationnelles. Des observations ultrastructurales suggéraient l'existence d'une continuité entre les peroxysomes et le réticulum endoplasmique (Novikoff et Skin, 1964). Des travaux plus récents amènent désormais à penser que les peroxysomes se forment par division de peroxysomes préexistants à la manière des mitochondries et des chloroplastes (Lazarow et Fujiki, 1985) (Fig. 4). Mais à l'inverse de ce qui est observé dans les mitochondries et les chloroplastes, les peroxysomes ne renferment pas d'ADN.

Toutes ces données relatives aux peroxysomes sont connues grâce à des travaux effectués surtout chez les Mammifères, le Rat en particulier. Les investigations entreprises sur les peroxysomes d'Amphibiens sont loin d'être aussi exhaustives. Leur présence associée à celle de la catalase a été établie dans le foie et d'autres organes de la plupart des Urodèles et des Anoures. C'est le cas chez le Gymnophione *Ichtyophis glutinosus* (Gorgas et Storch, 1984), chez *Rana pipiens* (Visentin et Allen, 1969 ; Scott et coll., 1969), *Rana catesbeiana* (Dauça et coll., 1982a,b ; Fujiwara et coll., 1987), *Rana ridibunda perezii* (Barja de Quiroga et coll., 1985), *Xenopus laevis* (Dauça et coll., 1982b), *Bombina orientalis* (Hayashi et coll., 1984), *Bufo marinus* (Roels et coll., 1970 ; Jones et coll., 1981) et *Discoglossus pictus* (Barja de Quiroga et coll., 1985). Dauça et coll. (1982a,b) ont étudié au cours du développement post-embryonnaire la fréquence, la morphologie et l'activité catalasique des microperoxysomes intestinaux de trois espèces d'Amphibiens Anoures d'origine géographique très distincte. Il s'agit de

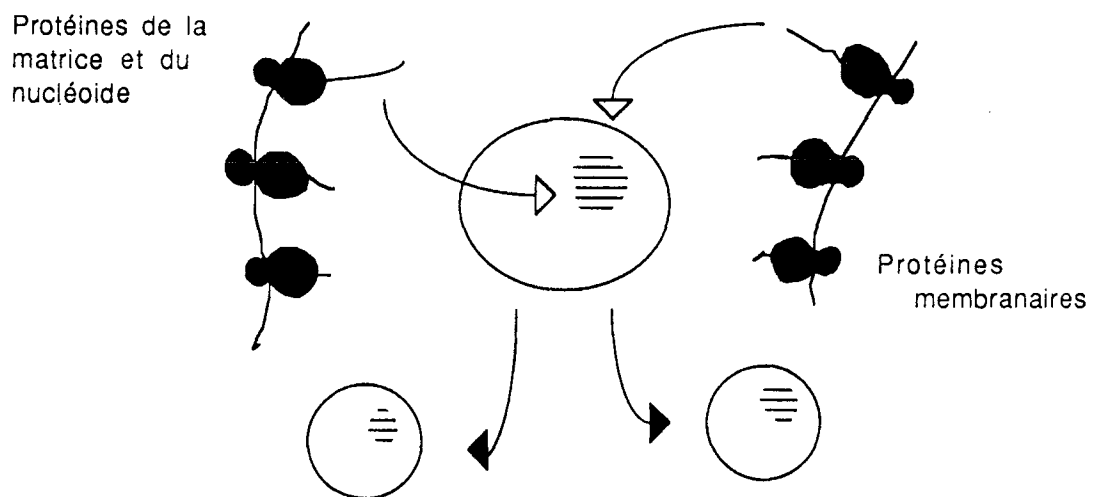


figure 4

Représentation schématique de la
biosynthèse des peroxysomes
(Lazarow P. B. et Fujiki Y. 1985)

Rana catesbeiana que l'on rencontre sur le continent nord-américain, d'*Alytes obstetricans* présent en Europe et de *Xenopus laevis* qui provient du Sud du continent Africain. Une étude comparée des peroxysomes hépatiques, rénaux et de ceux du pancréas a également été réalisée au cours de la métamorphose de *Rana catesbeiana* (Dauça et coll., 1982b). Mais ce dernier travail n'a porté que sur le comportement de la catalase peroxysomale.

La métamorphose des Amphibiens Anoures provoque une succession de bouleversements biochimiques, physiologiques et morphologiques qui transforment dans la plupart des cas un têtard aquatique microphage en un adulte terrestre et carnivore.

Il nous est apparu intéressant d'étudier le comportement des activités de plusieurs oxydases et de la catalase peroxysomales chez deux espèces d'Amphibiens dont la métamorphose s'accompagne ou non d'un changement d'habitat : *Alytes obstetricans* adulte est essentiellement terrestre au stade adulte alors que *Xenopus laevis* vit, dans nos conditions d'élevage, en permanence en pleine eau. Le choix des hépatocytes présente deux avantages : ils forment au climax de la métamorphose une population cellulaire relativement stable qui est par contre profondément remaniée sur le plan structural et fonctionnel. Ils possèdent par ailleurs des peroxysomes nombreux et volumineux.

Action des proliférateurs peroxysomaux

Une hyperthyroïdie provoquée chez le Rat déclenche l'apparition d'une nouvelle population de peroxysomes hépatiques dont les caractéristiques morphologiques et biochimiques diffèrent de celles des peroxysomes préexistants (Just et coll., 1982). Ces peroxysomes induits sont plus petits et très nombreux. Les activités de la catalase, de la D-aminoacide oxydase et des enzymes de la β -oxydation peroxysomale augmentent dans le foie de ces animaux traités par les hormones thyroïdiennes (Fringes et Reith, 1980 ; Just et coll., 1982 ; Just et Hartl, 1983).

Depuis les travaux de Gudernatsch (1912) qui ont démontré le rôle essentiel des hormones thyroïdiennes dans la métamorphose des Amphibiens, l'impact de la thyroxine (T4) ou de la triiodothyronine (T3) sur la biogenèse et le fonctionnement des organites intracellulaires a été très étudié. Ainsi il a été établi que les hormones thyroïdiennes provoquent une prolifération du réticulum endoplasmique, des modifications importantes dans la morphologie des mitochondries (Tata, 1967 ; Cohen, 1970 et Atkinson, 1971) ainsi qu'une augmentation de la masse protéique des mitochondries et des microsomes (Brucker et Cohen, 1976). L'activité de la carbamyl-phosphate synthétase I de la matrice mitochondriale augmente (Cohen, 1970) ainsi que les activités des autres enzymes

spécifiques du cycle de l'uréogénèse, ce qui permet le changement du mode d'excrétion azotée (Cohen et coll., 1978).

L'hypothèse selon laquelle les peroxysomes comme les mitochondries seraient des organes cibles pour les hormones thyroïdiennes a déjà trouvé quelques arguments. Le nombre, la taille et l'activité catalasique des peroxysomes augmentent dans les cellules rénales des tubes proximaux, hépatiques et intestinales de *Rana catesbeiana* pendant la métamorphose naturelle ou induite par les hormones thyroïdiennes (Dauça et coll., 1983). Sur la base de ce résultat nous avons analysé l'évolution biochimique et ultrastructurale des peroxysomes d'*Alytes obstetricans* au cours de son développement induit par la triiodothyronine (T3) afin de préciser l'impact de cette hormone thyroïdienne sur les peroxysomes hépatiques, tout particulièrement sur les oxydases peroxysomales de cet Amphibien Anoure.

Le clofibrate est capable de déplacer les hormones thyroïdiennes de leur site de liaison sur les protéines sériques de transport, et augmente ainsi le taux des hormones libres chez le Rat (Platt et Thorp, 1966 ; Ruegamer et coll., 1969 ; Lehotay et coll., 1984). Le clofibrate est un agent hypolipémiant utilisés chez l'Homme pour baisser le taux des triglycérides et du cholestérol plasmatique. Il est maintenant bien établi que son injection provoque chez les Rongeurs une prolifération des peroxysomes hépatiques ainsi qu'une augmentation importante de l'activité de leurs enzymes impliquées dans la β -oxydation (pour revue, voir Hawkins et coll., 1987). Par contre, les activités des autres oxydases comme l'urate oxydase, la D-aminoacide oxydase et la glycolate oxydase sont inchangées ou diminuent lors d'un traitement par ce facteur hypolipémiant (Van Hoof et coll., 1985). Parmi les substances qui possèdent la propriété d'induire la prolifération des peroxysomes on rencontre de nombreux composés analogues au clofibrate ainsi que d'autres molécules n'appartenant pas à la famille des fibrates. Il s'agit notamment du DEHP (un composé utilisé dans la fabrication des plastiques) (Reddy et coll., 1976), de l'acide acétylsalicylique (Hruban et coll., 1966). Par ailleurs une déficience en vitamine E (Reddy et coll., 1981) ou un régime riche en graisses (Ishii et coll., 1980) déclenchent les mêmes effets.

Il nous est paru opportun de tester l'action du clofibrate sur des têtards et des adultes d'Amphibiens Anoures puisque pendant les premiers stades larvaires, les têtards sont anhormonaux et que c'est une augmentation du taux des hormones thyroïdiennes dans le milieu intérieur qui déclenche la métamorphose. En ce qui concerne les Amphibiens adultes, une seule étude biochimique fait mention des effets inducteurs du clofibrate sur les activités enzymatiques peroxysomales de la catalase, de diverses oxydases et des enzymes de la β -oxydation dans le foie de *Bombina orientalis* (Hayashi, 1984). Nous avons repris ces dosages enzymatiques chez *Rana esculenta* et *Xenopus laevis* adultes traités par le clofibrate. L'effet inducteur du clofibrate sur la prolifération

des peroxysomes dans le foie de ces Vertébrés inférieurs a également été recherchée par cytochimie ultrastructurale de la catalase.

Cette étude ultrastructurale et biochimique qui a permis de caractériser les peroxysomes hépatiques de têtards et d'adultes d'Amphibiens Anoures, soumis à différentes conditions expérimentales, a été complétée par une analyse électrophorétique des protéines peroxysomales.

MATERIELS et METHODES

I. MATERIELS

A) Modèles biologiques et expérimentaux

1) Métamorphose naturelle

Trois espèces d'Amphibiens Anoures ont été utilisées pour la réalisation de ce travail :

Alytes obstetricans (Laurenti)

Rana esculenta (Linné)

Xenopus laevis (Daudin)

Les Xénopes adultes proviennent de l'élevage SEREA-CNRS (Argenton l'Eglise). Les stades larvaires sont issus de pontes obtenues après injection de gonadotrophines chorioniques (ISH Labs, Paris, France) à un couple d'adultes selon les conditions décrites par Singal et Sanders (1974). Les têtards sont nourris d'épinards cuits et leur stade de développement est déterminé à l'aide de la table de Nieuwkoop et Faber (1956). Les juvéniles nouvellement métamorphosés ainsi que les adultes sont conservés en milieu aquatique.

Les adultes de *Rana* sont originaires de l'Est de l'Europe.

Les larves d'Alyte ont été collectées, en été, dans diverses lavognes du Larzac. Ces têtards sont élevés au laboratoire dans de l'eau courante à 12°C, et, alimentés avec de la salade cuite. Les juvéniles sont obtenus par transfert des têtards dans une pièce éclairée, maintenue à 20°C. Les divers stades du développement post-embryonnaires sont appréciés à l'aide de la Table de Taylor et Kollros (1946) établie pour *Rana pipiens* et numérotés de 0 à XXV. Au cours de la prémétamorphose (période précédant la métamorphose ; stade I-XII) les membres postérieurs demeurent rudimentaires. Cette phase est caractérisée par une croissance importante des larves, sans changement morphologique notable. Les stades XIII-XIX concernent la prométamorphose caractérisée par le développement des membres postérieurs et la régression du tube cloacal. A partir du stade XIX, les membres antérieurs deviennent saillants sous la peau. Le climax ou paroxysme de la métamorphose se situe entre les stades XX et XXV. Les événements les plus spectaculaires de la métamorphose apparaissent alors. Les membres antérieurs deviennent visibles et la queue régresse. L'animal devient un juvénile qui quitte le milieu aquatique pour un habitat terrestre.

2) Métamorphose induite par la triiodothyronine

Afin de bloquer toute production d'hormones thyroïdiennes endogènes, les larves d'Alyte prises en prémétamorphose sont placées à 15°C, un mois avant les expériences, dans de l'eau additionnée de 0,58 mM de propylthiouracil (Sigma, Saint-Louis, USA). Ce traitement bloque le développement des animaux au stade prémétamorphose mais n'inhibe pas leur croissance. De ce fait les têtards traités sont beaucoup plus grands que ceux non traités (Hugues et Astwood, 1944). Certaines de ces larves thyrostatiques sont gardées comme témoins alors que d'autres sont transférées à 20°C dans une solution de propylthiouracil enrichie par 5 nM de 3,3,5-triiodo-L-thyronine (T3-Sigma). Cette solution est renouvelée quotidiennement pendant les 17 jours que dure le traitement hormonal. Au bout de 4 jours les premiers effets de la T3 sont visibles. Le têtard cesse de s'alimenter et perd son aspect ventru. Ses membres postérieurs s'allongent. Les transformations morphologiques majeures apparaissent après une semaine de traitement hormonal. Les membres antérieurs font désormais saillie. A partir du 10e jour du traitement, la dysharmonie engendrée par la T3 dans le développement des larves est largement accusée. L'hormone déclenche l'apparition d'un goître qui déforme le plancher buccal. La queue amorce sa régression et les membres antérieurs émergent. Au delà du 15e jour, les larves d'Alyte deviennent de jeunes crapauds dont la queue a presque complètement régressé.

3) Traitement au clofibrate

Le clofibrate (Sigma Chemical Co, Saint-Louis MO, USA) est injecté quotidiennement par voie buccale à raison de 90 mg (*Xenopus laevis*) ou de 60 mg (*Rana esculenta*) pendant 10 jours. Seuls les individus mâles sont utilisés pour ces expériences. Des animaux témoins ne subissant pas d'injection de clofibrate, sont élevés dans les mêmes conditions. Des doses de clofibrate plus faibles (10 mg/J) et plus élevées (200 mg/J) ont été également testées.

Les têtards d'Alyte sont élevés dans une solution contenant 0,5 mM de clofibrate. Au delà de cette concentration, les animaux meurent en moins de 24 heures. Le traitement dure 7 jours et le milieu d'élevage est renouvelé tous les 2 jours.

B) Marqueurs moléculaires

Pour caractériser les protéines peroxysomales, j'ai disposé de 2 anticorps :

- Un anticorps polyclonal anti-catalase de foie de boeuf (don de P.B. Lazarow, The Rockefeller University, New York, USA) caractérisé par M.J. Santos et coll. (1988).
- Un anticorps polyclonal dirigé contre la D-aminoacide oxydase de rein de Rat (don de S. Yokota, Département d'Anatomie, Yamanashi Medical College, Yamanashi, Japon) caractérisé par Usuda et coll. (1986).

II. METHODES

A) Microscopie électronique

Les fragments de foie sont fixés 1 heure soit dans du tampon de Millonig (1961) avec un mélange comprenant 1,54 % de glutaraldehyde et 1,54 % de formaldéhyde, soit avec du tampon cacodylate 0,1 M contenant 2,8 % de glutaraldéhyde. Après plusieurs lavages dans le tampon correspondant, les échantillons sont post-fixés par le tétroxyde d'osmium en solution à 1 %. Avant d'être incluses dans l'araldite-Epon, les pièces sont deshydratées par passages successifs dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes. Après polymérisation, des coupes semi-fines (1 µm) et ultrafines (50-100 nm) sont réalisées sur un ultramicrotome OMU2 (Reichert S.A., Vienne, Autriche). Les coupes semi-fines sont colorées au bleu de toluidine-éosine. Les coupes ultrafines sont

contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (Reynolds, 1963). Elles sont observées au microscope électronique à transmission Zeiss EM 9S2.

B) Cytochimie ultrastructurale de la catalase

La catalase peroxysomale peut être visualisée par une technique cytochimique ultrastructurale mettant à profit son activité peroxydatique.

Les fragments de foie sont fixés comme précédemment dans du tampon cacodylate 0,1 M contenant 2,8 % de glutaraldéhyde puis rincés 1 heure dans ce même tampon.

Les pièces sont ensuite découpées plus finement avec une lame de rasoir. Les coupes ainsi obtenues sont incubées à deux reprises pendant 1 heure dans un milieu contenant 2 mg/ml de 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochlorure à pH 9,7, 0,005 M de cyanure de potassium, 0,05 % de peroxyde d'hydrogène dans du tampon 2-amino-2-méthyl-1,3 propanediol (0,05M) (Novikoff et coll., 1972). Le 3-amino-1,2,4-triazole étant inhibiteur de l'activité peroxydatique de la catalase, il est ajouté à une concentration finale de 200 mM au milieu d'incubation des échantillons témoins. Après incubation les pièces sont rincées puis post-fixées 30 minutes dans du tétroxyde d'osmium à 1 % préparé dans le tampon cacodylate 0,1 M. La suite des opérations est semblable à celle qui concerne la technique de microscopie électronique (Voir paragraphe II.A, p. 14).

C) Préparation des homogénats de foie

Les animaux sont décérébrés et déméduillés puis pesés. Le foie est rapidement prélevé, essuyé sur du papier absorbant et pesé. Il est ensuite homogénéisé à 4°C dans un Potter contenant 11,5 volumes d'eau bidistillée. Au moment de l'emploi, l'homogénat est repris (V/V) dans du Triton X-100 à 2 %. Ce détergent solubilise la membrane peroxysomale et permet une meilleure pénétration des réactifs enzymatiques (Calvert et Ménard, 1978 ; Dauça et coll., 1982a, 1983).

D) Fractionnement cellulaire

Afin d'obtenir des préparations enrichies en peroxysomes, la technique de fractionnement cellulaire (De Duve et coll., 1955) a été mise en oeuvre. Le foie est prélevé puis pesé comme précédemment. Il est ensuite homogénéisé à l'aide d'un Potter

dans une solution à pH 7,4 contenant 250 mM de sucrose, 5 mM de MOPS, 1 mM d'EDTA et 0,1 % d'éthanol (Völkl et Fahimi, 1985). L'organe est dilué 10 fois dans cette solution. Le broyage s'effectue dans de la glace.

Une série de centrifugations à 600, 3000, 15000 puis 100000 g permet de récupérer des culots enrichis respectivement en noyaux, en mitochondries, en peroxysomes, en microsomes ainsi qu'un surnageant final renfermant les protéines solubles (Fig. 5). Ces culots et le surnageant final correspondent aux fractions N, M, L, P et S définies par De Duve et coll. (1955). Les centrifugations sont réalisées à l'aide d'un rotor TFT 50 ou 70 (Kontron) et de l'ultracentrifugeuse Kontron T 2055.

Chaque culot est ensuite repris dans le tampon d'homogénéisation avant d'être utilisé pour les dosages biochimiques.

E) Dosage des protéines

Les dosages de la teneur en protéines des extraits sont effectués selon la technique décrite par Lowry et coll. (1951) ou la technique de Bradford (1976). La quantité de protéines est déterminée par référence à une courbe étalon réalisée avec l'albumine sérique de boeuf.

F) Dosages de l'activité des enzymes peroxysomales

1) La catalase

L'activité enzymatique de la catalase (E.C.1.11.1.6) est estimée selon la méthode de Baudhuin et coll. (1964). La technique consiste en un dosage spectrophotométrique mesurant le catabolisme de H_2O_2 à 400 nm. L'homogénat à tester est incubé pendant 0, 3 et 6 minutes dans un volume final de 1,660 ml contenant du tampon imidazole (21,2 mM) à pH 7 de la BSA à 0,1 % et du peroxyde d'hydrogène (1,18 mM). La réaction est stoppée en ajoutant 0,6 ml d'une solution saturée de sulfate de titane (0,125 %) dans de l'acide sulfurique 2N. L'acide bloque la réaction tandis que le sulfate de titane réagit avec le peroxyde d'hydrogène restant pour former un composé jaune. L'intensité de la coloration est comparée à un témoin dont la quantité de H_2O_2 est mesurée au temps 0. L'unité de mesure de cette réaction est définie comme étant la quantité d'enzyme provoquant la destruction de 90 % du substrat en 1 minute dans un volume de 50 ml. L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en "unité Baudhuin"

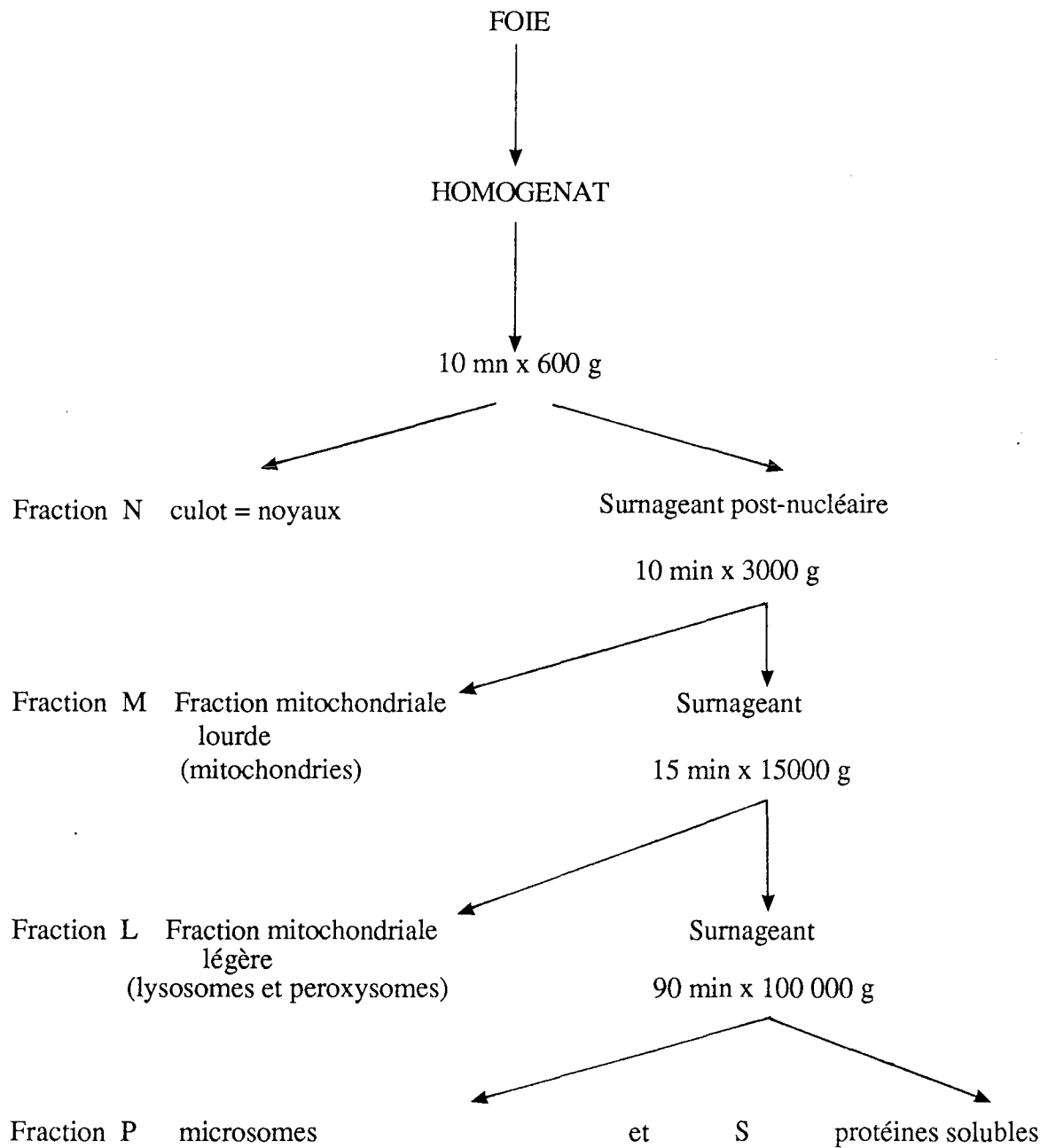


Figure 5 : Fractionnement cellulaire

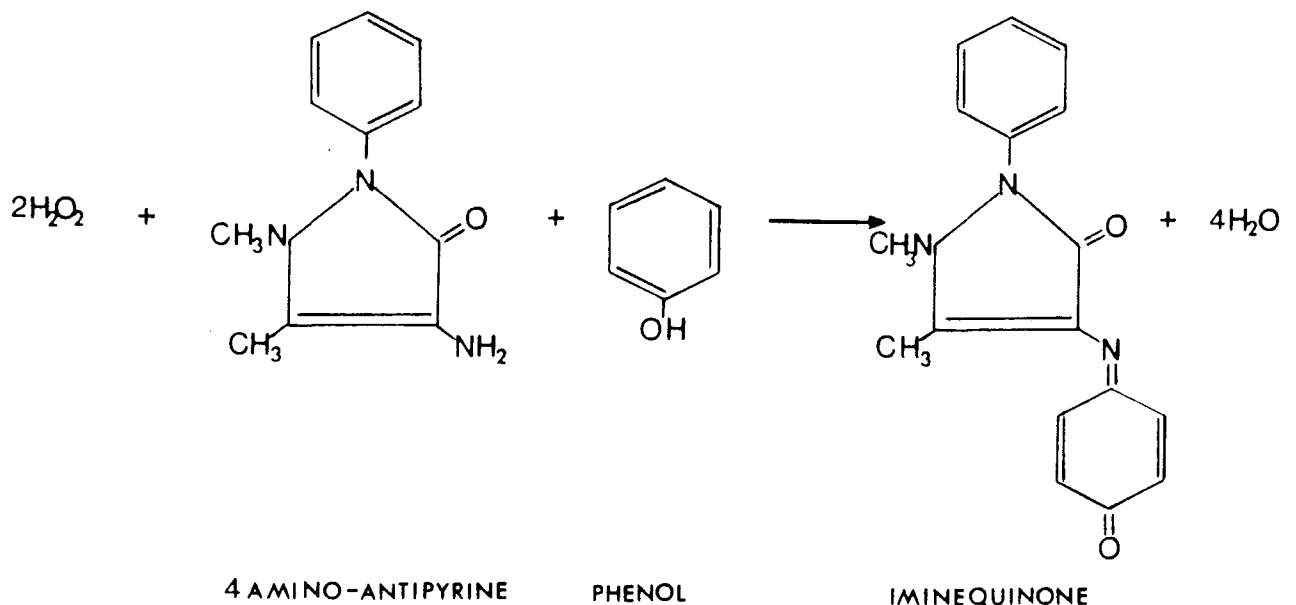
par minute et par gramme de tissu (activité totale) ou par milligramme de protéines (activité spécifique).

2) Les oxydases

Les oxydases dont les activités ont été dosées au cours de cette étude sont la D-aminoacide oxydase (EC 1.4.3.3), l'urate oxydase (EC 1.7.3.3) et la fatty acyl-CoA oxydase. Cette dernière correspond à l'enzyme de la première étape de la β -oxydation peroxysomale. Les activités enzymatiques sont mesurées selon la méthode spectrophotométrique mise au point par Allain et coll. (1974) avec quelques modifications. Le volume réactionnel contient pour un volume total de 1 ml :

- 1,06 mM de phénol
- 0,082 mM de 4-amino antipyrine
- 0,01 mM de flavine adenine dinucléotide (FAD) ou
- 0,01 mM de flavine mononucléotide (FMN)
- 0,8 IU de peroxydase
- 50 mM de tampon phosphate pH 8
- 25 μ l de l'homogénat à tester

La réaction est déclenchée en déposant dans la cuve les substrats correspondant aux différentes enzymes étudiées: 50 mM de D-proline ou 0,1 mM d'acide urique ou encore 0,5 mM de lauroyl coA respectivement pour la DAAOxase, l'uricase et la FAOxase. Le choix du lauroyl-coA est justifié par le fait que cet acide gras comportant 12 atomes de carbone correspond au substrat préférentiel de la FAOxase du foie de Rat (Walumsimbi-Kisitu et Harrison, 1983) et de Poulet (Ishii et coll., 1983). L'imine quinone qui se forme présente une couleur rouge alors que le milieu réactionnel de départ est jaune. La lecture au spectrophotomètre se fait à une longueur d'onde de 500 nm. Le coefficient d'extinction molaire utilisé est de 48.10^5 mol/ml/cm. La réaction peut être schématisée de la façon suivante :



3) La β -oxydation peroxysomale

L'activité de β -oxydation peroxysomale des acide gras est estimée à partir du dosage spectrophotométrique de l'activité enzymatique de l'acyl-CoA hydratase/3 hydroxy acyl-CoA déshydrogénase. Cette enzyme qui intervient dans les étapes 2 et 3 du cycle de la β -oxydation peroxysomale correspond à un complexe bifonctionnel appelé encore PBE. Le dosage biochimique de son activité a été effectué la première fois par Lazarow et De Duve (1976). Le principe de dosage repose sur la réduction de NAD^+ en NADH en présence de KCN, ce dernier étant inhibiteur de la β -oxydation mitochondriale.

L'absorbance de la réaction est suivie à 340 nm. Les essais sont réalisés en présence de tampon phosphate 30 mM (pH 7,4) contenant 200 μM de NAD^+ , 50 μM de Coenzyme A, 1 mM de KCN, 12 mM de dithiotreitol, 0,015 % de BSA et 0,04 % (V/V) de Triton X-100. La réaction débute par l'ajout de 50 μM de lauroyl CoA. Le coefficient d'extinction molaire utilisé est de $6,3 \cdot 10^3$ moles/ml/cm.

Pour l'ensemble de ces dosages, les résultats sont exprimés en milliunités par minute et par gramme de tissu (activité totale) ou par milligramme de protéines (activité spécifique). Pour les oxydases, ces milliunités correspondent à des nanomoles de peroxyde d'hydrogène formé, alors que pour la PBE il s'agit de nanomoles de NADH formé.

G) Etude électrophorétique des protéines

1) Préparation des extraits

Les homogénats de foie ou les culots L enrichis en peroxysomes sont homogénéisés à l'aide d'un Potter dans le tampon de Dreyer (1983) puis lyophilisés. Ce tampon Tris 0,01 M à pH 7,4 renferme 0,1 % de Triton X-100, 0,1 % de β -mercapto-éthanol ainsi que 1 % (w/v) de PMSF. Les extraits sont ensuite résolubilisés dans une solution contenant 0,0153 % (w/v) de bleu de bromophénol, 14 % (v/v) de glycérol, 0,131 M de Tris pH 6,7 dans laquelle on ajoute extemporanément 1/10 du volume de SDS 20 % (w/v) et 1/10^e du volume de dithiotreitol 0,1 M. La solubilisation se fait à raison de 25 μg de protéines pour 10 μl de ce mélange pour une coloration au bleu de Coomassie et 10 μg dans 20 μl dans le cas de la coloration à l'argent. Dans les deux cas, les échantillons sont chauffés 2 minutes à 100°C puis refroidis sur de la glace avant d'être déposés sur le gel.

2) Electrophorèse monodimensionnelle en présence de SDS

L'électrophorèse est réalisée en gel de polyacrylamide de 12,5 % en présence de 0,1 % de dodécylsulfate de sodium. La cuve supérieure et celle inférieure sont remplies avec le tampon d'électrophorèse de O'Farrell (1975) comprenant 25 mM de Tris, 192 mM de glycine, 0,1 % de SDS. Ce tampon est ajusté à pH 8,3.

Les gels sont soumis à une tension de 200 V pendant 30 minutes puis de 400 volts jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel (environ 2 heures 30).

3) Révélation des protéines

Deux techniques de visualisation des protéines ont été utilisées :

- La coloration au bleu de Coomassie : les gels sont placés 30 minutes sous agitation dans une solution de méthanol (50 %) et d'acide acétique (10 %) contenant 0,25 % de bleu de Coomassie (Brillant Blue R., Sigma). Les gels sont ensuite décolorés par plusieurs lavages dans une solution de méthanol (25 %) et d'acide acétique (10 %).

- La coloration argentique décrite par Morrissey (1981) : les gels sont fixés par un mélange d'acide acétique (10 %) et de méthanol (50 %) pendant 30 minutes puis par une solution de glutaraldéhyde à 1 % pendant 30 minutes. Les gels sont mis à rincer toute la nuit dans un grand volume d'eau. Après un bain de 30 minutes dans du dithiotreitol (5 µg/ml), ils sont incubés dans une solution à 0,1 % de nitrate d'argent. Les protéines sont révélées par une solution de carbonate de sodium à 3 % renfermant 0,05 % de formaldéhyde à 37 %. Cette technique de coloration est d'une sensibilité 100 fois supérieure à celle au bleu de Coomassie et permet donc une révélation plus fine des protéines étudiées.

4) Immunodétection de la catalase et de la D-aminoacide oxydase

Après électrophorèse, l'identification de la catalase et de la D-aminoacide oxydase hépatique chez les différentes espèces d'Amphibiens étudiées, a été menée par révélation immunologique après électrotransfert sur filtre de nitrocellulose (Towbin et coll., 1979 ; Burnette, 1981). Le transfert des protéines est réalisé sous une tension de 0,8 mA par cm² d'unité de transfert pendant 1 heure. Le transfert est de type semi-sec ; seuls les papiers filtres et le filtre de nitrocellulose (porosité 0,45 µm) sont imbibés de tampon contenant 48 mM de Tris, 39 mM de glycine, 0,0375 % de SDS et 20 % de

méthanol. Les protéines transférées sur le filtre de nitrocellulose sont ensuite fixées et colorées par une solution d'acide trichloracétique à 3 % contenant 0,2 % de Rouge Ponceau S (Serva). Après coloration le filtre est saturé par incubation dans une solution contenant 5 % de lait en poudre (Régilait) en solution dans du Tris 1M, pH 8 additionné de 1 M de NaCl. Il est ensuite mis en présence des anticorps polyclonaux anti-catalase ou anti-DAAOxase dilués 400 fois.

L'incubation dure toute la nuit à 15°C. Après plusieurs rinçages dans une solution contenant 10 mM de Tris pH 8, 150 mM de NaCl et 0,05 % de Tween 20, les filtres sont incubés 1 heure avec un deuxième anticorps anti-immunoglobulines de lapin marqué à la phosphatase alcaline (Institut Pasteur, Paris) et dilué 7500 fois. La révélation du complexe antigène-anticorps est effectuée en présence de Nitroblue tetrazolium (NBT Sigma) et du 5 bromo-4-chloro 3-indolylphosphate (BCIP Sigma) en solution dans un tampon phosphate (100 mM de Tris pH 9,5 ; 100 mM de NaCl et 5 mM de MgCl₂). La révélation est obtenue en quelques minutes. Elle est arrêtée par action de l'EDTA à 10 mM (pH 8).

5) Electroélution de la catalase

Cette technique permet la concentration et la récupération de protéines ou de molécules préalablement repérées sur les gels d'électrophorèse.

Après électrophorèse monodimensionnelle, les gels sont colorés au bleu de Coomassie. La bande protéique correspondant à la catalase de *Rana esculenta* est repérée puis découpée à l'aide d'une lame de rasoir. Les fragments d'acrylamide contenant l'enzyme sont alors déposés dans l'appareil à électroélution (BioRad, Modèle 422). Ils sont ensuite soumis à un courant constant de 40 mA pendant 3 à 4 heures. La solution renfermant la catalase est récupérée puis lyophilisée.

RESULTATS

I. ETUDE MORPHOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DU COMPORTEMENT DES PEROXYSOMES HEPATIQUES AU COURS DE LA METAMORPHOSE SPONTANEE DES AMPHIBIENS ANOURES

A) Phase larvaire

1) Etude morphologique

Les têtards d'Alyte pris en prémétamorphose possèdent un foie de petite taille, constitué de deux lobes de couleur brunâtre. Les hépatocytes y sont disposés en cordons séparés par un réseau de sigmoïdes sanguins.

La catalase représentant classiquement un marqueur enzymatique des peroxysomes, nous avons cherché à révéler l'existence de ces organites dans les hépatocytes des larves d'Amphibiens Anoures par visualisation cytochimique de leur activité catalasique à l'aide de la méthode mise au point par Novikoff et coll. (1972). Observés au microscope optique, les peroxysomes présentent une répartition aléatoire dans le cytoplasme des hépatocytes des larves d'Alyte (Fig. 6 A).

A l'échelle ultrastructurale, l'observation des peroxysomes n'est pas aisée dès lors que le tissu n'a pas été préalablement préparé pour la cytochimie. En effet, ces organites délimités par une membrane unique, ne se distinguent pas des nombreuses autres vésicules cytoplasmiques. De plus, la structure cristalline ou nucléoïde rencontrée dans la

Figure 6

**Peroxisomes hépatiques des larves d'*Alytes obstetricans* et de
*Xenopus laevis***

A,B : Hépatocytes d'*Alytes* en prémétamorphose (Stades X-XII)

Des structures DAB-positives sont visibles dans le cytoplasme de ces cellules. Leur matrice est granuleuse.

A : Coupe semi-fine x 600

B : Coupe fine x 17500

C : Détail d'un hépatocyte larvaire de *Xenopus laevis*. Les peroxysomes sont plus petits que ceux rencontrés dans le foie d'*Alytes*. Ces organites sont limités par une membrane unique (voir flèche). x 26000

m : mitochondrie ; p : peroxysome ; n : noyau ; RE : réticulum endoplasmique

Figure 6

**Peroxisomes hépatiques des larves d'*Alytes obstetricans* et de
*Xenopus laevis***

A,B : Hépatocytes d'*Alytes* en prémétamorphose (Stades X-XII)

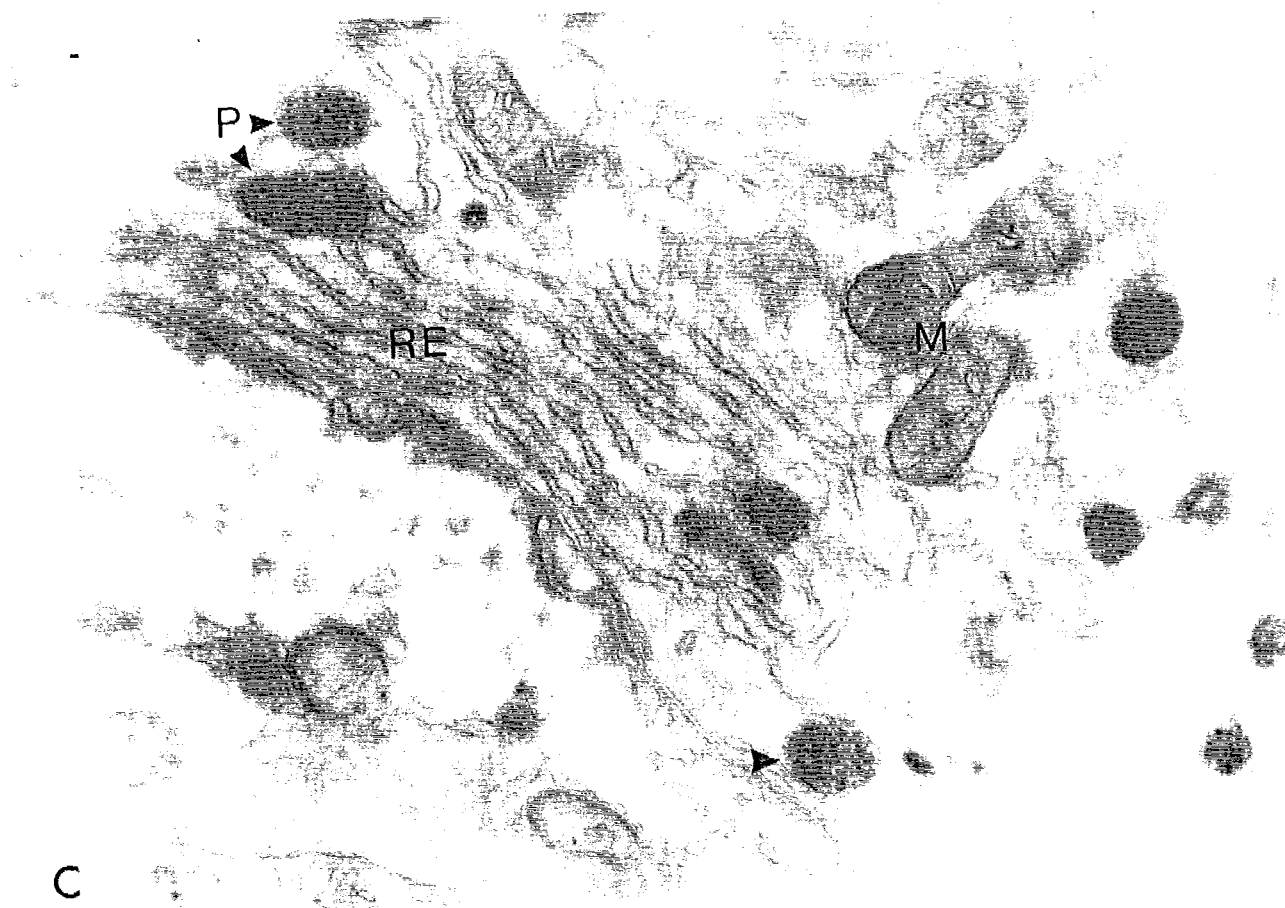
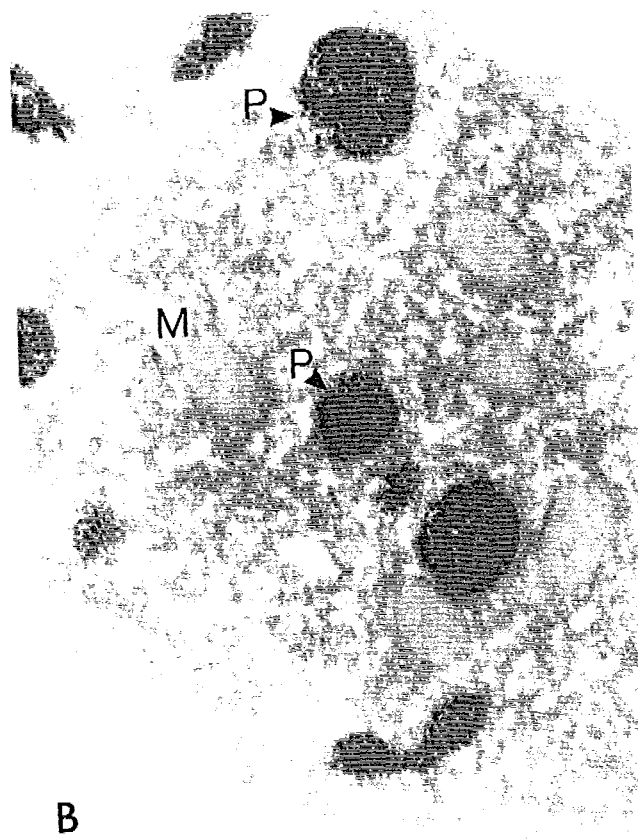
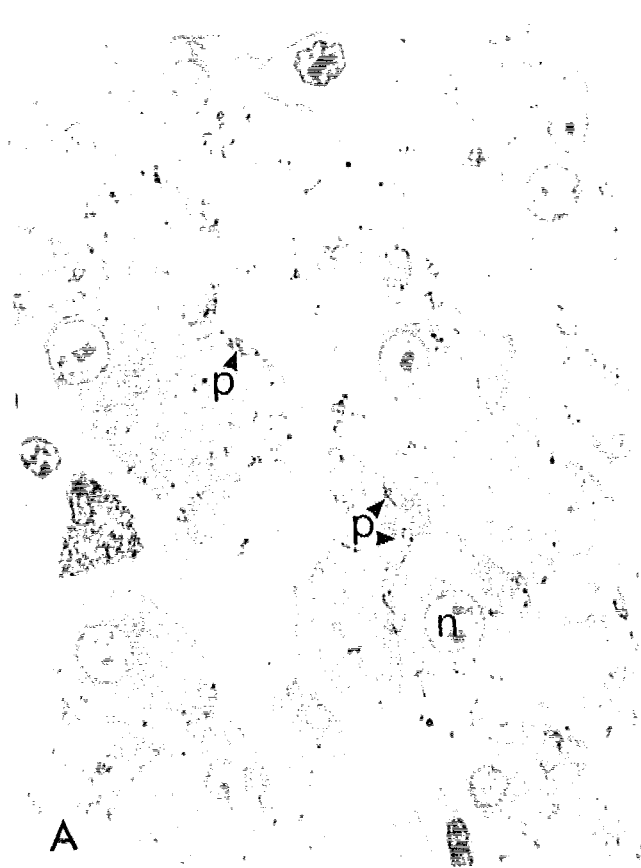
Des structures DAB-positives sont visibles dans le cytoplasme de ces cellules. Leur matrice est granuleuse.

A : Coupe semi-fine x 600

B : Coupe fine x 17500

C : Détail d'un hépatocyte larvaire de *Xenopus laevis*. Les peroxysomes sont plus petits que ceux rencontrés dans le foie d'*Alytes*. Ces organites sont limités par une membrane unique (voir flèche). x 26000

m : mitochondrie ; p : peroxysome ; n : noyau ; RE : réticulum endoplasmique



matrice des peroxysomes hépatiques de certaines espèces animales, comme le Rat par exemple, n'a ici jamais été observée dans les peroxysomes hépatiques des larves d'Alyte. La détection *in situ* de l'activité catalasique révèle au microscope électronique la présence d'organites de forme sphérique ou plus souvent ovoïde. Délimités par une simple membrane, leur matrice granuleuse est caractéristique (Fig. 6 B). Leur diamètre moyen est de $0,68 \pm 0,2 \mu\text{m}$.

Afin d'harmoniser les travaux cytochimiques et biochimiques menés chez *Xenopus laevis*, seuls les stades prométamorphose et adulte ont été considérés. A partir de la prométamorphose, le foie du Xénope est suffisamment gros et peut de ce fait être utilisé pour la cytochimie ultrastructurale ; d'autre part il n'est plus nécessaire de regrouper les foies de plusieurs animaux pour effectuer les dosages biochimiques. Les structures DAB-positives observées dans les hépatocytes larvaires du Xénope (Fig. 6 C) ont un aspect assez semblable à celles rencontrées chez les têtards d'Alyte mais leur taille moyenne est sensiblement inférieure : $0,37 \pm 0,07 \mu\text{m}$. Leur fréquence est cependant beaucoup plus faible. De nombreux hépatocytes semblent être complètement dépourvus de ces organites.

2) Etude biochimique

a) Activité de la catalase

Les activités de la catalase ont été mesurées dans les homogénats préparés à partir du foie des têtards d'Alyte et de Xénope. Les activités totale et spécifique de la catalase hépatique du Xénope sont supérieures à celles obtenues pour la larve d'Alyte (Fig. 7).

b) Activités des oxydases peroxysomales

Les activités de plusieurs oxydases peroxysomales ont été décelées dans le foie des larves d'Alyte et de Xénope : D-aminoacide oxydase (DAAOxase) avec la D-proline comme substrat, urate oxydase et fatty acyl coA oxydase (FAOxase), première enzyme du cycle de la β -oxydation. Pour cette dernière, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le lauroyl-coA comme substrat (Fig. 7).

Les activités totale et spécifique de la DAAOxase sont plus élevées dans les homogénats hépatiques des larves d'Alytes que dans ceux du Xénope. L'inverse est constaté pour l'urate oxydase et la différence des activités entre les deux espèces est très importante. L'activité totale de l'urate oxydase est de l'ordre de dix fois supérieure chez le Xénope et l'activité spécifique trois fois supérieure environ. Dans les homogénats

		Larves naturelles		Larves thyroéostatiques
		Alyte	Xenope	Alyte
Catalase	(a)	34 ± 12 (6)	73 ± 25 (6)	34 ± 9 (4)
	(b)	0,52 ± 0,1	0,92 ± 0,2	0,2 ± 0,008
DAAOxase	(c)	254 ± 124 (7)	79 ± 40 (4)	829 ± 569 (3)
	(d)	3,9 ± 1,8	0,55 ± 0,2	6,8 ± 0,1
Urate oxydase	(c)	263 ± 105 (5)	2275 ± 125 (3)	350 ± 93 (3)
	(d)	3,8 ± 1,5	12,5 ± 1,5	1,89 ± 0,06
FAOxase	(c)	56 ± 1,5 (8)		74 ± 26 (3)
	(d)	0,8 ± 0,3	n.d.	0,64 ± 0,30

(a) = UB/g de foie

(b) = UB/mg de protéines

(c) = mU/g de foie

(d) = mU/mg de protéines

n.d. = non déterminé

Le chiffre entre parenthèses représente le nombre d'animaux utilisés.

Fig. 7 : Comparaison des activités enzymatiques peroxysomales du foie des larves naturelles (*Alytes*, *Xenopus*) et thyroéostatiques (*Alytes*)

hépatiques des larves de Xénope, il n'a pas été possible de détecter la présence de la fatty acyl coA oxydase avec la méthode de dosage utilisée. Par contre l'activité totale de cette enzyme a été mesurée dans le foie des têtards d'Alyte et s'élève à 56 mU par gramme de foie.

B) Métamorphose spontanée

1) Etude morphologique

Alytes obstetricans

Au cours de la vie larvaire le volume des lobes hépatiques augmente. Au climax de la métamorphose les hépatocytes perdent partiellement leur glycogène et leurs gouttelettes lipidiques. Le foie diminue alors de taille. Son volume augmentera à nouveau au début de la vie juvénile.

Les structures DAB-positives sont présentes dans les hépatocytes pendant les différentes phases du développement post-embryonnaire des larves d'*Alytes obstetricans* (Fig. 8). La taille des peroxysomes diminue au cours de la métamorphose spontanée. Elle passe de $0,68 \pm 0,2 \mu\text{m}$ à $0,47 \pm 0,1 \mu\text{m}$. Leur forme devient plus régulière et sphérique chez le juvénile sortie de l'eau (Fig. 8 C). Leur répartition est uniforme au sein du cytoplasme des cellules hépatiques. La fréquence des structures DAB-positives rapportée à la surface cellulaire appréciée sur coupe fine, ne montre pas de différences significatives entre les larves et les jeunes Alytes métamorphosés. Le nombre moyen des peroxysomes est de $8,3 \pm 2$ pour $100 \mu\text{m}^2$ de surface hepatocytaire, chez les larves prises en pré- ou prométamorphose et de $10,7 \pm 2,7$ peroxysomes chez les individus en phase de post-climax. De nombreuses plages claires observées au microscope électronique dans le cytoplasme des hépatocytes correspondent à l'emplacement du glycogène extrait lors du traitement par le tampon cacodylate de sodium (Leskes et coll., 1971).

Xenopus laevis

Les hépatocytes des Xénopes adultes sont caractérisés par une organisation ultrastructurale particulière. L'essentiel de l'espace intracytoplasmique est occupé par du glycogène (Fig. 9). Les rares organites observés sont repoussés vers le noyau ou contre la membrane plasmique. Certains hépatocytes sont par ailleurs très riches en granules lipidiques.

Le diamètre moyen des structures DAB-positives rencontrées dans les hépatocytes larvaires est de $0,37 \pm 0,07 \mu\text{m}$. Dans les hépatocytes des individus adultes, il a été

Figure 8

Peroxysomes hépatiques d'*Alytes obstetricans* au cours de la métamorphose naturelle

La présence des peroxysomes a été recherchée dans le foie de l'Alyte au cours du développement post-embryonnaire. Ces organites sont visualisés cytochimiquement grâce à leur activité catalasique.

A : Alyte en prémétamorphose (stades X-XII)

Les peroxysomes sont volumineux et plus ou moins sphériques
x 4600 Détail : 18500

B : Alyte en prométamorphose (stades XVIII-XX)

Quelques organites DAB-positifs sont allongés
x 3900

C : Alyte juvénile

Les peroxysomes sont plus petits et régulièrement sphériques
x 10000 et x 11500

m : mitochondrie ; n : noyau ; p : peroxysome ; re : reticulum endoplasmique

Figure 8

**Peroxisomes hépatiques d'*Alytes obstetricans* au cours de la
métamorphose naturelle**

La présence des peroxysomes a été recherchée dans le foie de l'Alyte au cours du développement post-embryonnaire. Ces organites sont visualisés cytochimiquement grâce à leur activité catalasique.

A : Alyte en prémétamorphose (stades X-XII)

Les peroxysomes sont volumineux et plus ou moins sphériques

x 4600 Détail : 18500

B : Alyte en prométamorphose (stades XVIII-XX)

Quelques organites DAB-positifs sont allongés

x 3900

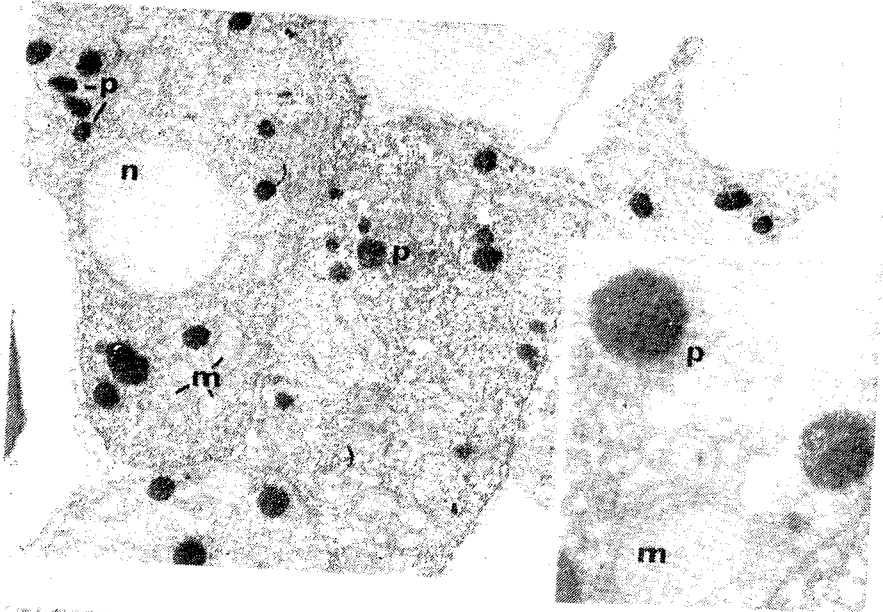
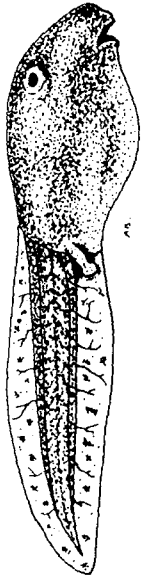
C : Alyte juvénile

Les peroxysomes sont plus petits et régulièrement sphériques

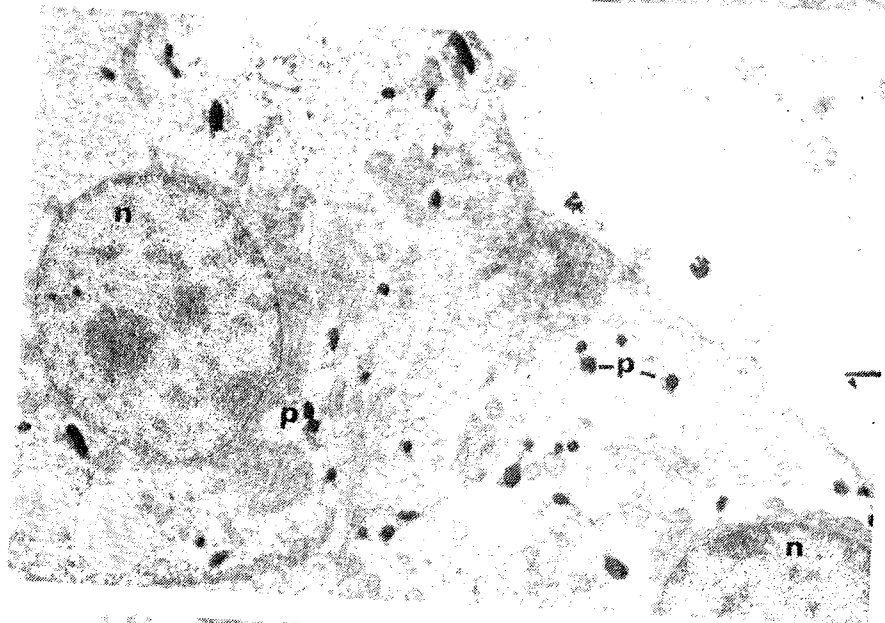
x 10000 et x 11500

m : mitochondrie ; n : noyau ; p : peroxysome ; re : reticulum endoplasmique

A



B



C

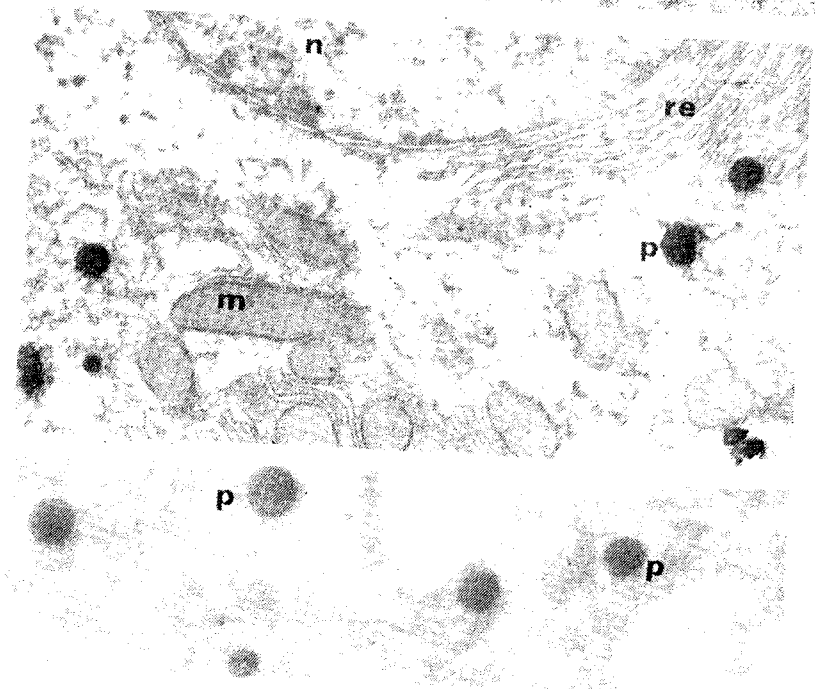
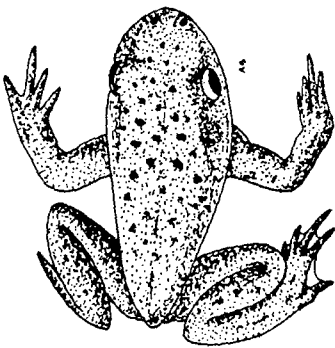


Figure 9

**Peroxisomes hépatiques de *Xenopus laevis* au cours de la
métamorphose naturelle**

A : Peroxisomes dans un foie de Xénope en prométamorphose (Stade 56-60)
x 12000

B, C et D : Hépatocytes adultes

Les peroxysomes sont peu nombreux et ont tendance à se regrouper autour des mitochondries. Leur morphologie est variable.

B : x 11200 ; C : x 3100 ; D : x 7500

m : mitochondrie ; n : noyau ; p : peroxysomes ; CB : canalicule biliaire

Figure 9

**Peroxisomes hépatiques de *Xenopus laevis* au cours de la
métamorphose naturelle**

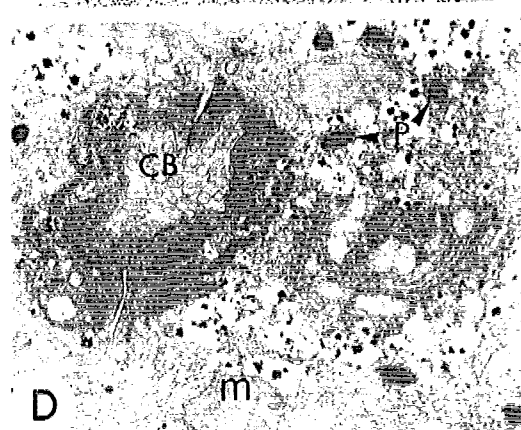
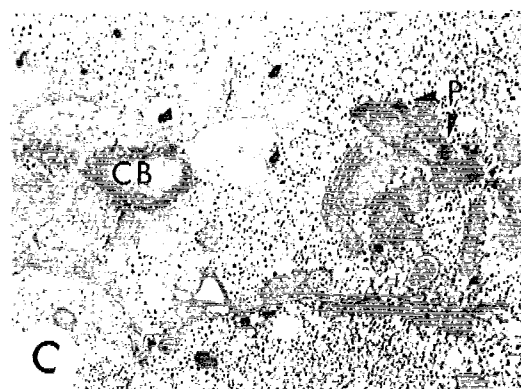
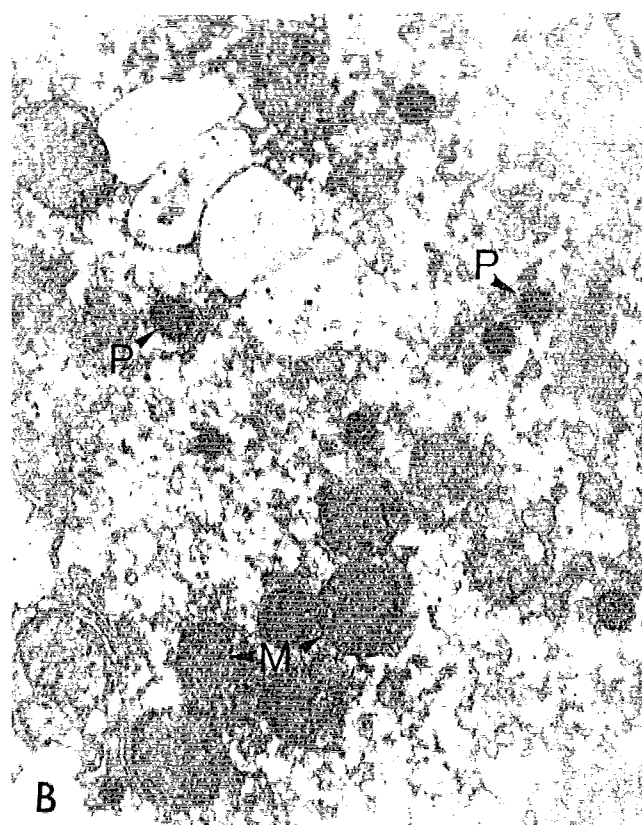
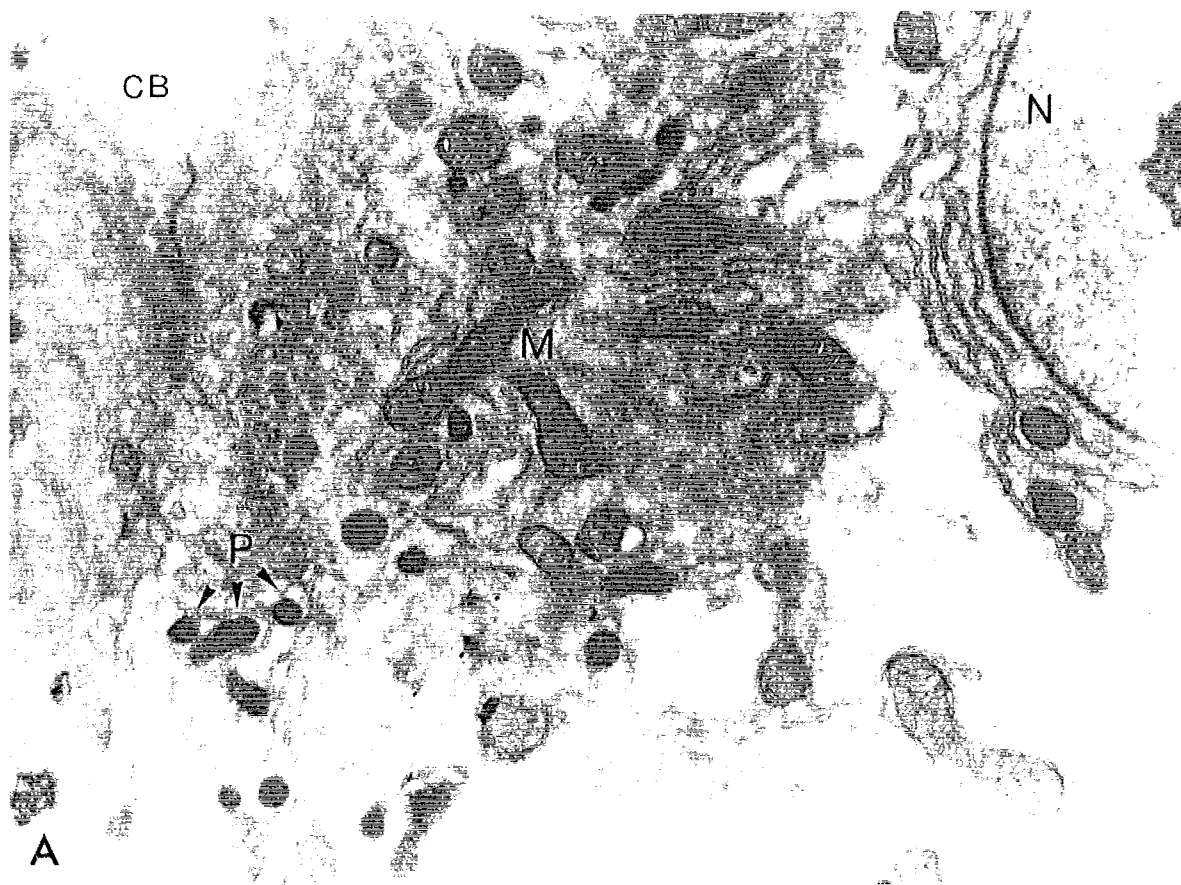
A : Peroxisomes dans un foie de Xénope en prométamorphose (Stade 56-60)
x 12000

B, C et D : Hépatocytes adultes

Les peroxysomes sont peu nombreux et ont tendance à se regrouper autour des mitochondries. Leur morphologie est variable.

B : x 11200 ; C : x 3100 ; D : x 7500

m : mitochondrie ; n : noyau ; p : peroxysomes ; CB : canalicule biliaire



estimé à $0,43 \pm 0,08 \mu\text{m}$. Aucun nucléoïde n'a pu être observé dans la matrice de ces peroxysomes. Comme nous l'avons déjà souligné, le nombre des peroxysomes est très faible dans les cellules larvaires et cette fréquence n'augmente pas au stade adulte.

2) Dosages biochimiques

a) Teneur protéique

Le dosage des protéines a été effectué sur des homogénats hépatiques à partir d'animaux pris aux différents stades de la métamorphose. La teneur en protéine augmente au cours de la métamorphose spontanée dans le foie d'Alyte et de Xénope comme le montre la figure 10.

b) Activité catalasique

L'activité totale de la catalase s'élève durant la métamorphose naturelle de l'Alyte. Rapportée à la quantité de protéines contenue dans les homogénats de foie, l'activité catalasique présente un pic en prométamorphose puis diminue chez le juvénile à un niveau toutefois supérieur à celui observé chez le têtard.

Chez le Xénope adulte, au contraire, les activités totale et spécifique de la catalase sont inférieures à celles du têtard (Fig. 11 A et E).

c) Activités des oxydases peroxysomales

L'activité totale de la D-proline oxydase augmente de 3,8 fois au cours de la métamorphose naturelle chez l'Alyte. Cette augmentation est de 15,8 fois chez le Xénope (Fig. 11 B et F).

Au cours du même phénomène, l'activité spécifique de l'urate oxydase diminue dans le foie des deux espèces lors du climax. Mais cette diminution de l'activité de l'urate oxydase est plus importante chez *Xenopus laevis* que chez *Alytes obstetricans* (Fig. 11 C et G).

En ce qui concerne la FAOxase (la première enzyme de la β -oxydation peroxysomale) son activité spécifique diminue chez l'Alyte au moment où il quitte le milieu aquatique pour l'habitat terrestre (Fig. 11 D). Dans les homogénats hépatiques des larves et adultes de Xénope, l'activité enzymatique de la FAOxase n'a pas été décelée. En effet, plusieurs essais réalisés avec différentes concentrations de substrat, d'enzyme et de

Stade de développement	<i>Alytes obstetricans</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Prémétamorphose	69 ± 8 (a)	n.d. (b)
Prométamorphose	74 ± 8	$92 \pm 8,7$
Juvénile	$125 \pm 9,6$	n.d.
Adulte	n.d.	122 ± 32

(a) : moyenne $\pm$ erreur standard de la quantité des protéines hépatiques exprimée en mg protéines/g de foie

(b) : non déterminé

Figure 10 : Evolution de la teneur en protéines du foie d'Alyte et de Xénope au cours du développement post-embryonnaire

Figure 11

Activités enzymatiques de la catalase et des oxydases dans le foie d'*Alytes obstetricans* (A, B, C et D) et dans celui de *Xenopus laevis* (E, F et G) au cours de la métamorphose naturelle

A et E : Catalase (cat)

B et F : D-amino acide oxydase

C et G : Urate oxydase

D : Fattyacyl coA oxydase

Alyte = 1 : prémétamorphose ; 2 : prométamorphose ; 3 : juvénile

Xénope = 1 : prométamorphose ; 2 : adulte

Figure 11

Activités enzymatiques de la catalase et des oxydases dans le foie d'*Alytes obstetricans* (A, B, C et D) et dans celui de *Xenopus laevis* (E, F et G) au cours de la métamorphose naturelle

A et E : Catalase (cat)

B et F : D-amino acide oxydase

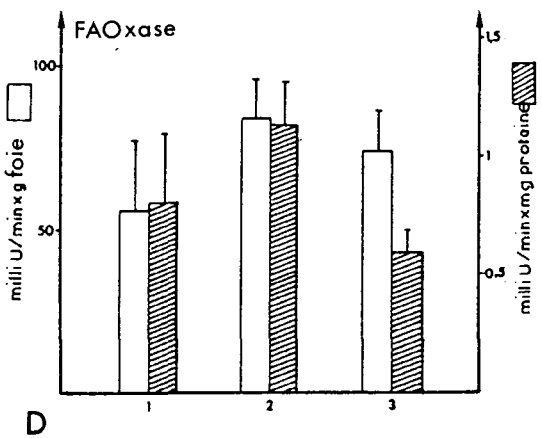
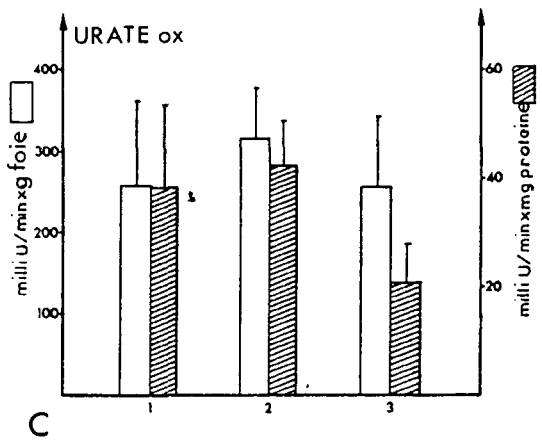
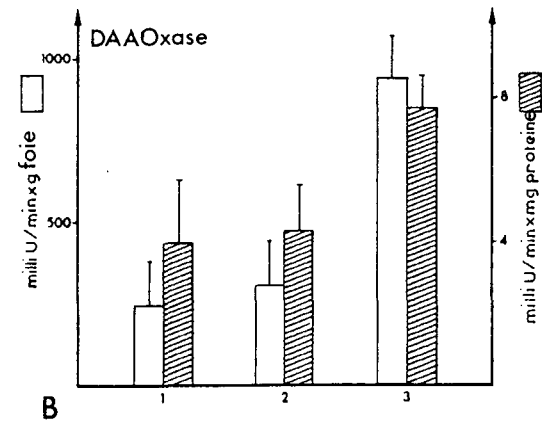
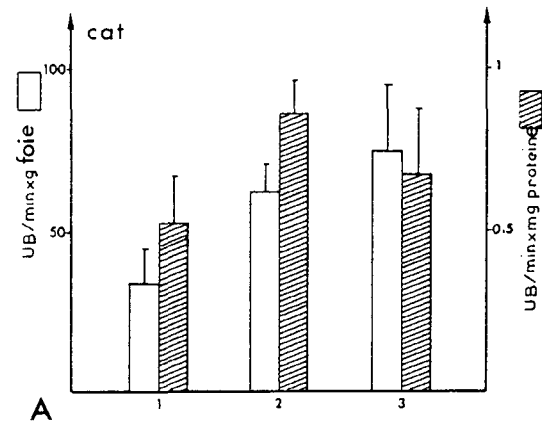
C et G : Urate oxydase

D : Fattyacyl coA oxydase

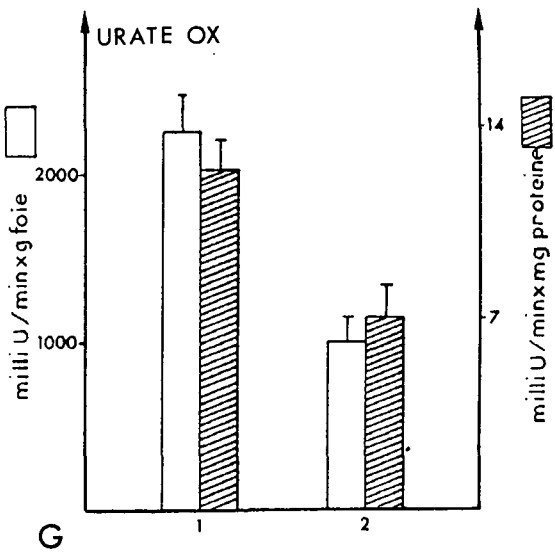
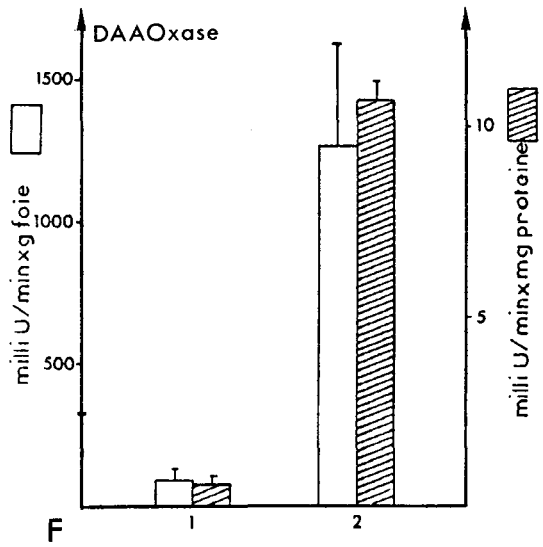
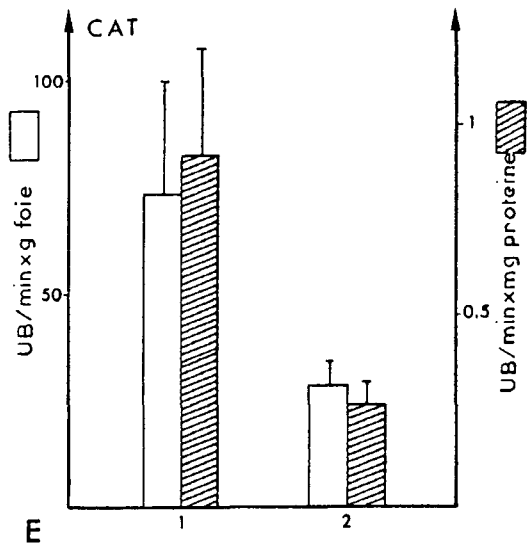
Alyte = 1 : prémétamorphose ; 2 : prométamorphose ; 3 : juvénile

Xénope = 1 : prométamorphose ; 2 : adulte

ALYTE



XENOPE



détergent Triton X-100 ainsi que différentes conditions de pH n'ont pas permis de détecter l'activité de cette enzyme.

II. ETUDE MORPHOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DU COMPORTEMENT DES PEROXYSOMES HEPATIQUES AU COURS DE LA METAMORPHOSE INDUITE DES AMPHIBIENS ANOURES

Cette étude n'a été réalisée que chez l'Alyte. En effet, les stades larvaires précoces du Xénope posent des problèmes techniques en raison de leur taille réduite. D'autre part les observations précédentes faites lors de la métamorphose naturelle et montrant les difficultés à caractériser les peroxysomes dans le foie de cette espèce, nous ont amené à faire ce choix restrictif.

A) Larve traitée au propylthiouracyl

1) Etude morphologique

Les peroxysomes mis en évidence par l'activité de leur catalase dans les cellules hépatiques des larves thyrostatiques d'Alyte ne présentent pas de différences morphologiques notables avec ceux observés chez les larves naturelles (Fig.12 A). Leur diamètre moyen estimé sur coupes fines est de $0,67 \pm 0,13 \mu\text{m}$. Leur fréquence est de $7,6 \pm 2$ pour $100 \mu\text{m}^2$.

2) Etude biochimique

a) Activité de la catalase

L'activité totale de la catalase rapportée au gramme de foie frais est de 34 unités de base chez les larves thyrostatiques d'Alyte. Cette activité est semblable à celle mesurée chez les larves naturelles. Cependant l'activité spécifique de l'enzyme (UB/mg protéines) est plus faible dans le foie des larves thyrostatiques ($0,2 \pm 0,08$) que dans celui des têtards naturels ($0,52 \pm 0,1$).

Figure 12

**Peroxisomes hépatiques d'*Alytes obstetricans* au cours de la
métamorphose induite par la triiodothyronine**

A : Larve d'*Alytes* traitée au propylthiouracyl et servant de témoin.

x 8000

Les structures DAB-positives sont sphériques et de taille importante

B : Larve d'*Alytes* traitée par la T3 pendant 4 jours

x 3240

C : Larve d'*Alytes* traitée par la T3 pendant 8 jours.

x 3150

D : Larve d'*Alytes* traitée par la T3 pendant 15 jours.

x 8600

Les peroxysomes ont diminué de taille.

CB : canalicule biliaire ; m : mitochondrie ; n : noyau ; p : peroxysome ;

RE : réticulum endoplasmique.

Figure 12

**Peroxisomes hépatiques d'*Alytes obstetricans* au cours de la
métamorphose induite par la triiodothyronine**

A : Larve d'*Alytes* traitée au propylthiouracil et servant de témoin.

x 8000

Les structures DAB-positives sont sphériques et de taille importante

B : Larve d'*Alytes* traitée par la T3 pendant 4 jours

x 3240

C : Larve d'*Alytes* traitée par la T3 pendant 8 jours.

x 3150

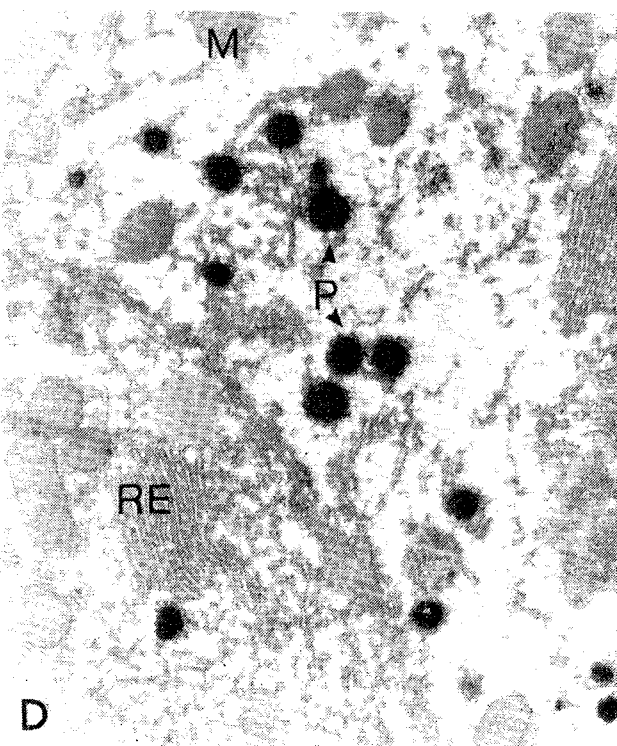
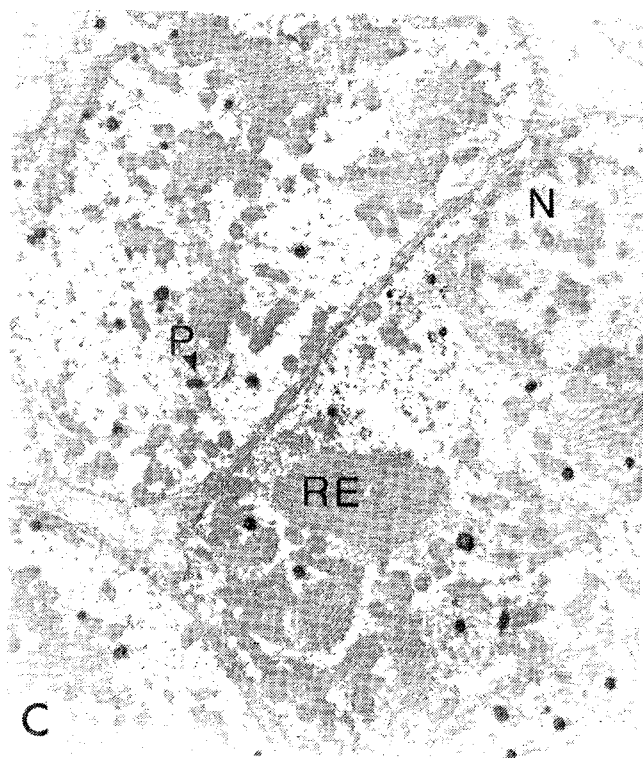
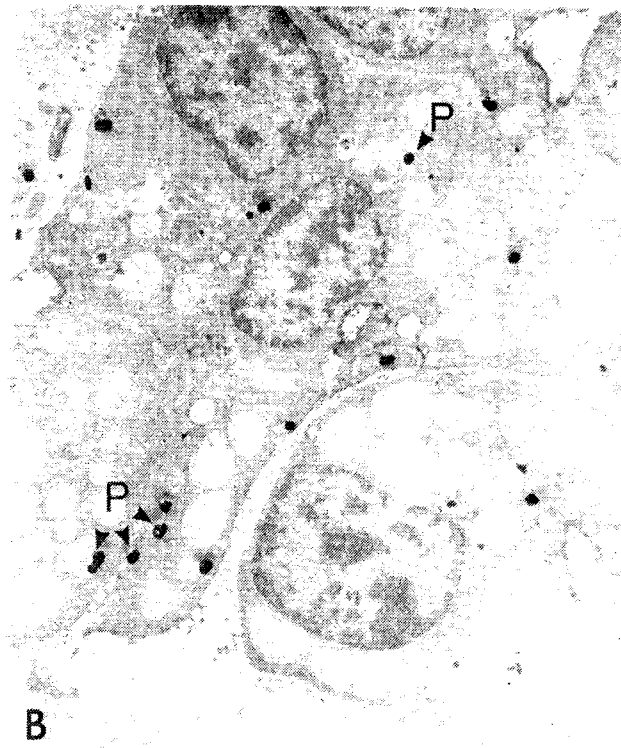
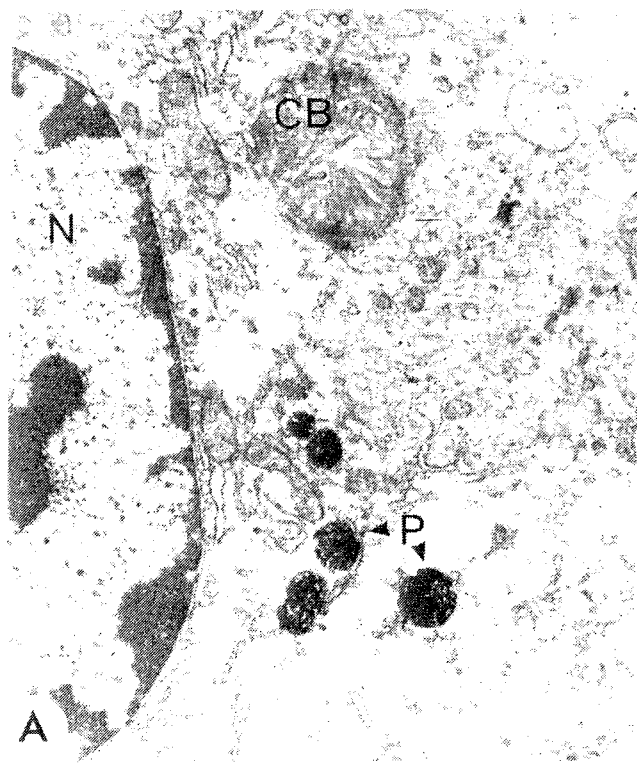
D : Larve d'*Alytes* traitée par la T3 pendant 15 jours.

x 8600

Les peroxysomes ont diminué de taille.

CB : canalicule biliaire ; m : mitochondrie ; n : noyau ; p : peroxysome ;

RE : réticulum endoplasmique.



b) Activité des oxydases peroxysomales

Les activités des trois oxydases peroxysomales détectées dans le foie des têtards naturels ont été déterminées dans les homogénats hépatiques des larves thyrostatiques d'Alyte. De l'examen des résultats obtenus résumés dans la figure 7, il ressort que des différences individuelles importantes sont observées chez les larves d'Alyte traitées au propylthiouracyl. Cependant si les activités spécifiques de la FAOxase sont voisines dans le foie des larves traitées ou non, celles de la DAAOxase sont plus importantes dans les homogénats hépatiques des larves thyrostatiques, alors que l'inverse est constaté pour les activités spécifiques de l'urate oxydase.

B) Impact de la triiodothyronine

1) Etude morphologique

L'analyse des structures DAB-positives (Fig. 12) dans les hépatocytes des larves d'Alyte au cours du traitement par la triiodothyronine révèle l'existence d'une évolution morphologique des peroxysomes semblable à celle observée lors de la métamorphose naturelle. La taille de ces organites passe de $0,67 \pm 0,13 \mu\text{m}$ à $0,48 \pm 0,14 \mu\text{m}$ dans les hépatocytes alors que leur nombre évolue peu si l'on compare les témoins thyrostatiques aux animaux traités pendant 15 jours. Toutefois la mesure de la fréquence des peroxysomes rapportée à une surface cellulaire de $100 \mu\text{m}^2$ montre une baisse significative de cette valeur de $7,6 \pm 2$ à $5,7 \pm 2$ peroxysomes, lors des premiers jours du traitement hormonal (à 4 jours).

2) Etude biochimique

Les résultats concernant les activités de la catalase, de la D-aminoacide oxydase, de l'urate oxydase et de la fatty acyl CoA oxydase dosées dans le foie des têtards d'Alyte lors du traitement par la triiodothyronine sont résumés dans la figure 13.

a) Activité de la catalase

Après 4 jours de traitement par la T3, les activités totale et spécifique de la catalase du foie d'*Alytes obstetricans* diminuent sensiblement par rapport aux animaux témoins élevés dans la solution ne contenant que du

Figure 13

Activités enzymatiques de la catalase (A), de l'urate oxydase (B), de la DAAOxase (C) et de la FAOxase (D) chez *Alytes obstetricans* au cours de la métamorphose induite par la triiodothyronine

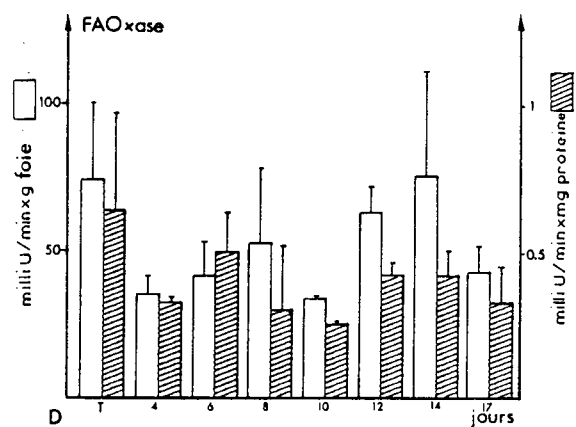
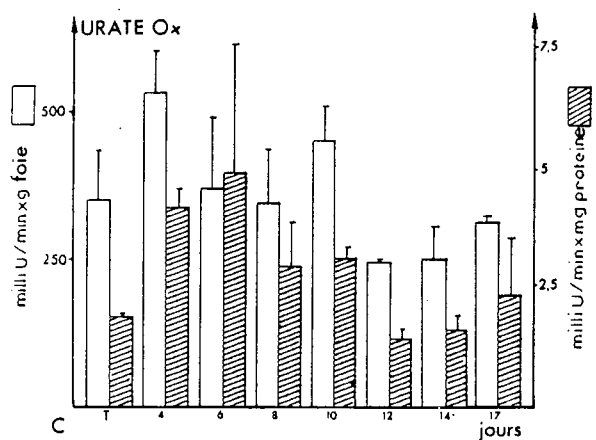
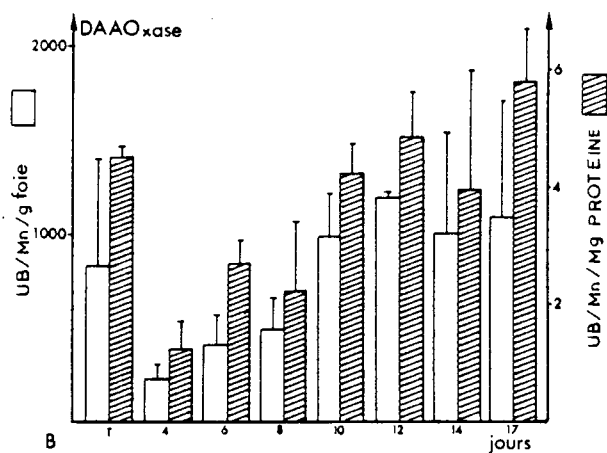
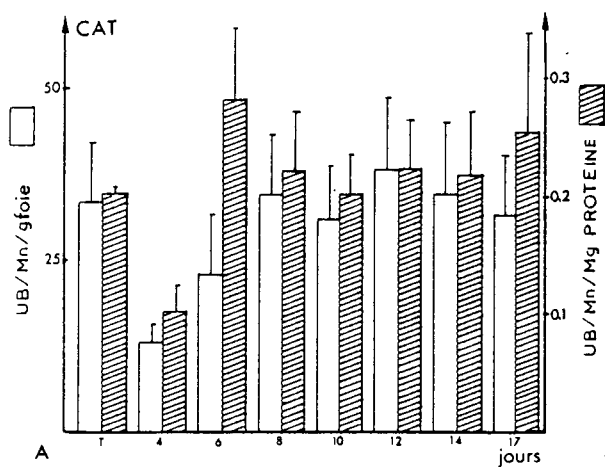
T : animal témoin dans le propylthiouracyl
1,2,3, jours de traitement à la T3

Figure 13

Activités enzymatiques de la catalase (A), de l'urate oxydase (B), de la DAAOxase (C) et de la FAOxase (D) chez *Alytes obstetricans* au cours de la métamorphose induite par la triiodothyronine

T : animal témoin dans le propylthiouracyl

1,2,3, jours de traitement à la T3



ALYTE

propylthiouracyl. A partir du 6e jour de traitement, les activités catalasiques doublent puis se maintiennent à une valeur élevée jusqu'au 17e jour, terme du traitement hormonal (Fig. 13 A).

b) Activités des oxydases peroxysomales

Une baisse importante des activités totale et spécifique de la DAAOxase et de la FAOxase est constatée au 4e jour du traitement hormonal. Pour la FAOxase, ces activités se stabilisent par la suite autour de 50 mU par gramme de foie alors que pour la DAAOxase les activités totale et spécifique augmentent progressivement et atteignent une valeur maximale après 10-12 jours de traitement voisine de 1100 mU et 6 mU par gramme de foie et par milligramme de protéines respectivement. Le profil de l'activité spécifique de l'urate oxydase est marquée par une augmentation de l'ordre de 2,1 fois à partir du 4e jour de traitement. Cette activité tend ensuite à décroître du 5e jour au 17e jour du traitement hormonal (Fig. 13 B, C et D).

III. EFFETS DU CLOFIBRATE SUR LES PEROXYSOMES HEPATIQUES DES ANOURES

A) Etude morphologique

1) **Stade larvaire**

Les larves d'*Alytes obstetricans* se sont révélées être les plus adaptées pour cette expérimentation de par leur taille et leur résistance à la toxicité du clofibrate. Pour maintenir les têtards d'Alyte en vie, l'ajout de clofibrate dans l'eau d'élevage doit être inférieur à 1 mM. Avec 0,5 mM de clofibrate, les larves s'alimentent normalement pendant les sept jours que dure le traitement.

L'histologie du foie des animaux traités est normale. L'observation des organites DAB-positifs dans les hépatocytes de ces animaux au terme du traitement ne fait pas apparaître de différences significatives par rapport à ce qui est observé dans le foie des têtards témoins. Même si des concentrations de peroxysomes polymorphes sont parfois rencontrées dans les hépatocytes de certaines larves traitées, la taille et la densité moyenne des organites n'évoluent pas de façon significative au cours du traitement par le clofibrate (Fig. 14).

Figure 14

Peroxysomes hépatiques des larves d'*Alytes obstetricans* traitées par le clofibrate

A : Larve témoin
x 1800

B et C : Larve traitée par le clofibrate

Les structures DAB-positives mises en évidence par leur activité catalasique sont très semblables à celles détectées chez les animaux témoins

B : x 3600 ; C : x 9500

CB : canalicule biliaire ; m : mitochondrie ; n : noyau ; p : peroxyosome

Figure 14

Peroxisomes hépatiques des larves d'*Alytes obstetricans* traitées par le clofibrate

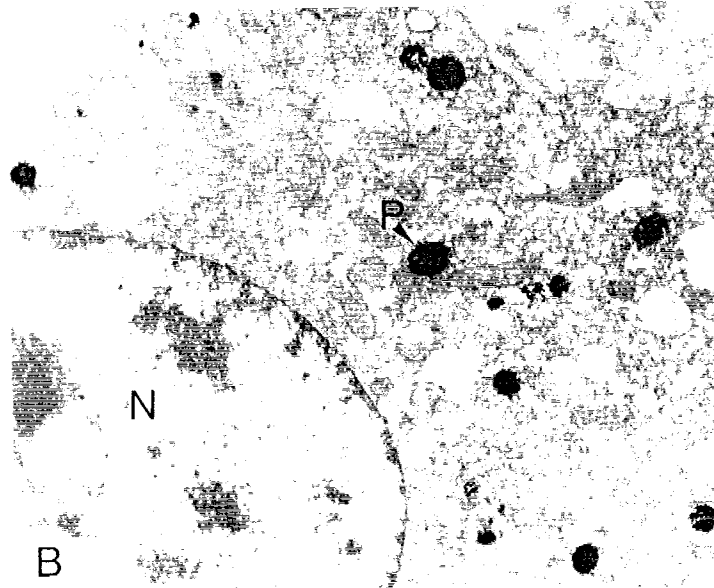
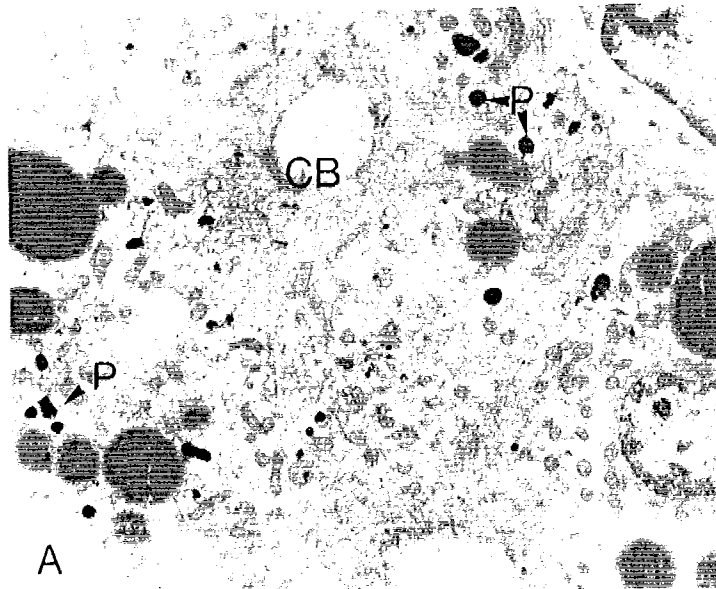
A : Larve témoin
x 1800

B et C : Larve traitée par le clofibrate

Les structures DAB-positives mises en évidence par leur activité catalasique sont très semblables à celles détectées chez les animaux témoins

B : x 3600 ; C : x 9500

CB : canalicule biliaire ; m : mitochondrie ; n : noyau ; p : peroxysome



2) Stade adulte

Le clofibrate est injectée par voie orale à raison de 0,1 % du poids corporel de *Rana esculenta* et 0,2 % de celui de *Xenopus laevis*. La durée du traitement est de 10 jours. Au terme de ce traitement l'impact de cette substance chimique sur les peroxysomes hépatiques de *Rana esculenta* et de *Xenopus laevis* est analysé à l'aide des techniques de cytochimie ultrastructurale et de biochimie. Des essais préalables d'injection de doses de clofibrate plus fortes (0,4 %) ont abouti à une mort rapide des Grenouilles. Des doses très faibles (0,02 %) n'engendrent aucune modification dans le comportement des peroxysomes hépatiques de ces animaux.

Rana esculenta

Chez les animaux témoins, les analyses cytochimiques ultrastructurales révèlent la présence d'un nombre limité de structures DAB-positives dans les hépatocytes (Fig. 15 A). De forme plus ou moins sphérique, la taille de leur diamètre varie de 0,45 μm à 0,75 μm ($\pm 0,08$). Mais à côté de ces peroxysomes volumineux qui représentent 55 % de la population peroxysomale existent des structures catalase-positives plus petites dont le diamètre moyen est de $0,32 \pm 0,06 \mu\text{m}$.

Après 10 jours de traitement par le clofibrate une prolifération spectaculaire du nombre des peroxysomes est constatée dans les tous les hépatocytes (Fig. 15 B). Ces peroxysomes sont caractérisés par un grand polymorphisme. La plupart d'entre eux sont ovoïdes, d'autres sont allongés. Ici encore on peut mettre en évidence deux populations de taille. La grande majorité (91 %) des peroxysomes hépatiques des animaux traités au clofibrate sont de petite taille. Leur diamètre est compris entre 0,15 et 0,40 μm ($\pm 0,08$). Quelques peroxysomes volumineux de diamètre moyen $0,57 \pm 0,08$ sont aussi observés (9 %). Des figures de fragmentation ou de fusion de peroxysomes sont fréquemment rencontrées (Fig. 15 D). Des associations entre les peroxysomes et d'autres organites tels les mitochondries, les peroxysomes et le réticulum endoplasmique granuleux sont également mises en évidence (Fig. 15 C). De plus dans ces cellules stimulées, une prolifération du réticulum endoplasmique lisse est aussi constatée.

Xenopus laevis

D'une façon générale, le cytoplasme des hépatocytes des Xénopes témoins et traités est très pauvre en organites, l'essentiel de l'espace cytoplasmique étant occupé par du glycogène. Les hépatocytes des animaux traités au clofibrate ne montrent pas de prolifération notable des peroxysomes par rapport aux animaux témoins (Fig. 16). Que

Figure 15

**Effets du clofibrate sur les peroxysomes hépatiques de
*Rana esculenta***

A : Animal témoin

Les peroxysomes sont peu nombreux et assez grands comparativement aux mitochondries . x 8000

B, C et D : *Rana* traitée par le clofibrate

Les peroxysomes sont très nombreux, petits et polymorphes (B : x 10500). Des associations s'établissent entre mitochondrie, réticulum endoplasmique et peroxysome (C : x 19000). Certains peroxysomes semblent se fragmenter (D : x 34500).

m : mitochondrie ; n : noyau ; p : peroxysome ; RE : réticulum endoplasmique ;
M : mitochondrie.

Figure 15

**Effets du clofibrate sur les peroxysomes hépatiques de
*Rana esculenta***

A : Animal témoin

Les peroxysomes sont peu nombreux et assez grands comparativement aux mitochondries . x 8000

B, C et D : *Rana* traitée par le clofibrate

Les peroxysomes sont très nombreux, petits et polymorphes (B : x 10500). Des associations s'établissent entre mitochondrie, réticulum endoplasmique et peroxysome (C : x 19000). Certains peroxysomes semblent se fragmenter (D : x 34500).

m : mitochondrie ; n : noyau ; p : peroxysome ; RE : réticulum endoplasmique ;
M : mitochondrie.

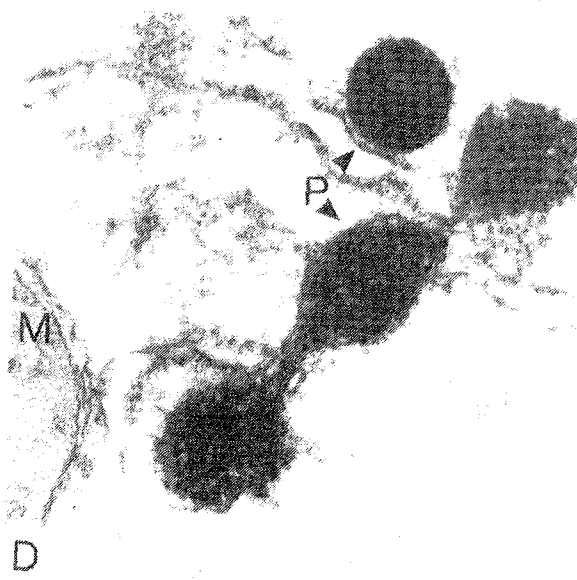
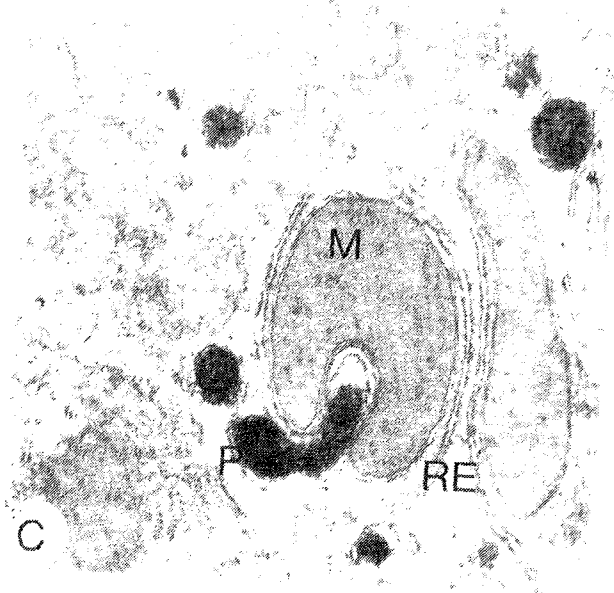
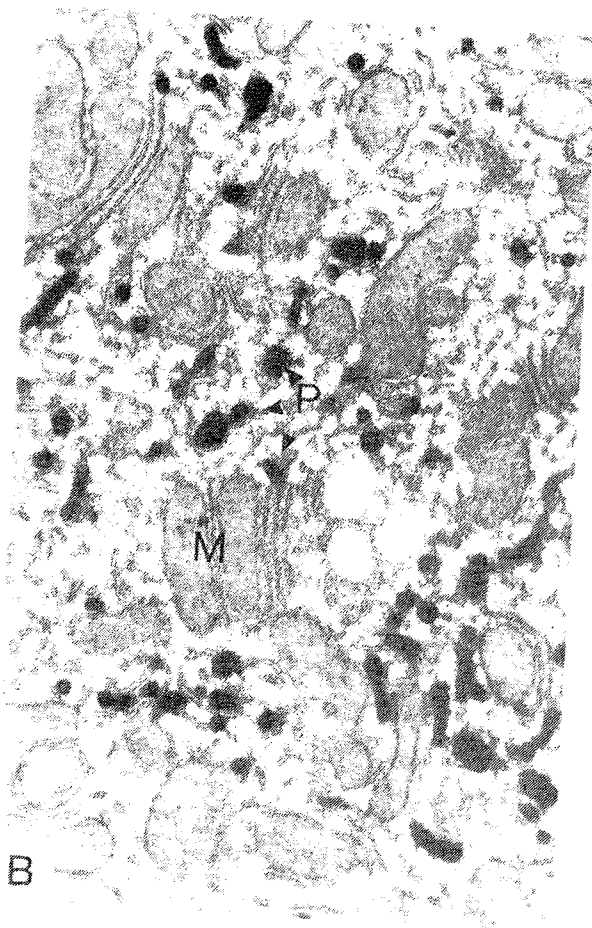
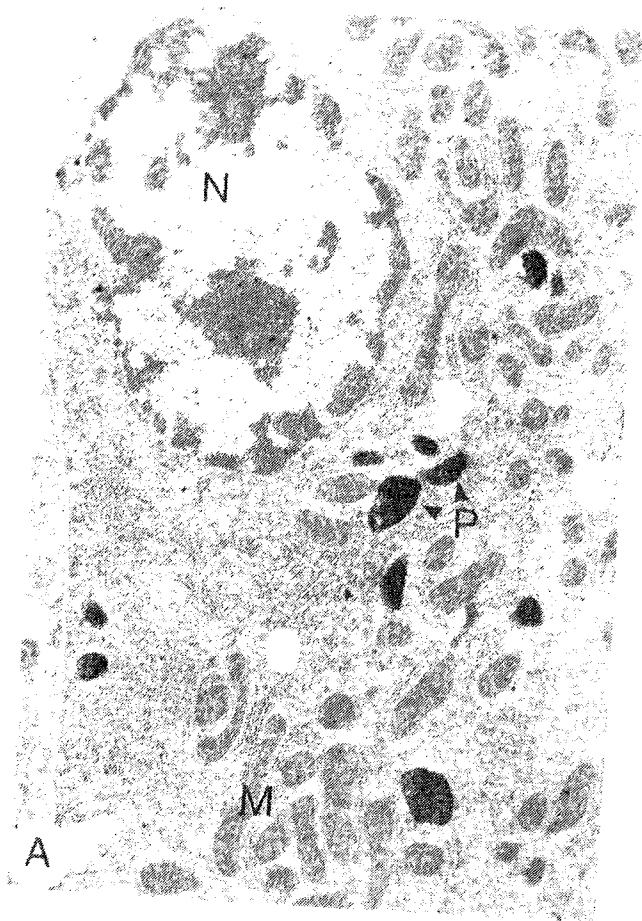


Figure 16

**Effet du clofibrate sur les peroxysomes hépatiques de
*Xenopus laevis***

A : Animal témoin

Les organites DAB-positifs sont très peu nombreux dans le cytoplasme des hépatocytes. Ils sont parfois groupés autour de mitochondries.

x 6000

B : *Xenopus* traité par le clofibrate

Quelques peroxysomes sont visibles à proximité de gouttelettes lipidiques

x 17000

G : glycogène ; GL : gouttelette lipidique ; P : peroxysome ; M : mitochondrie

Figure 16

**Effet du clofibrate sur les peroxysomes hépatiques de
*Xenopus laevis***

A : Animal témoin

Les organites DAB-positifs sont très peu nombreux dans le cytoplasme des hépatocytes. Ils sont parfois groupés autour de mitochondries.

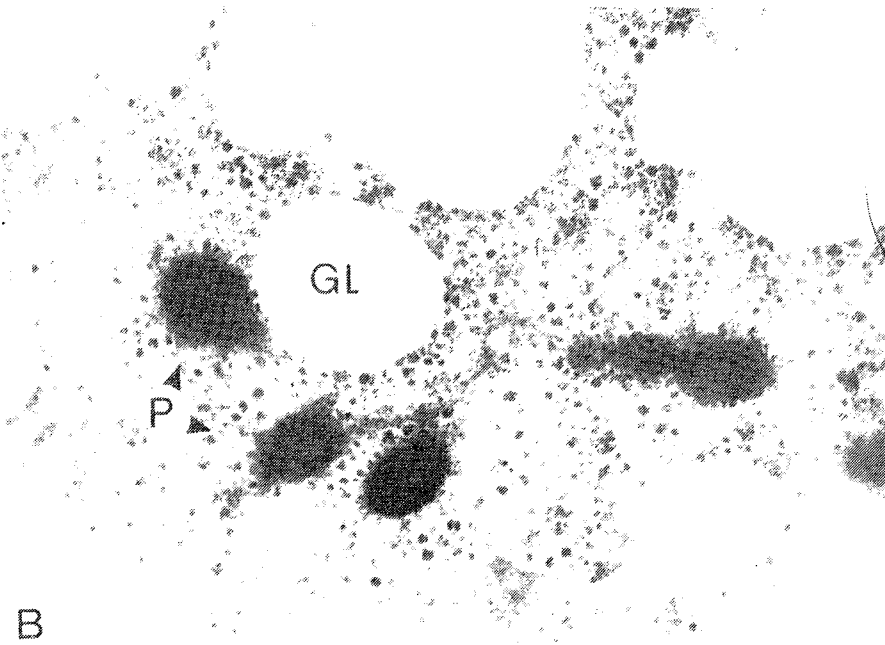
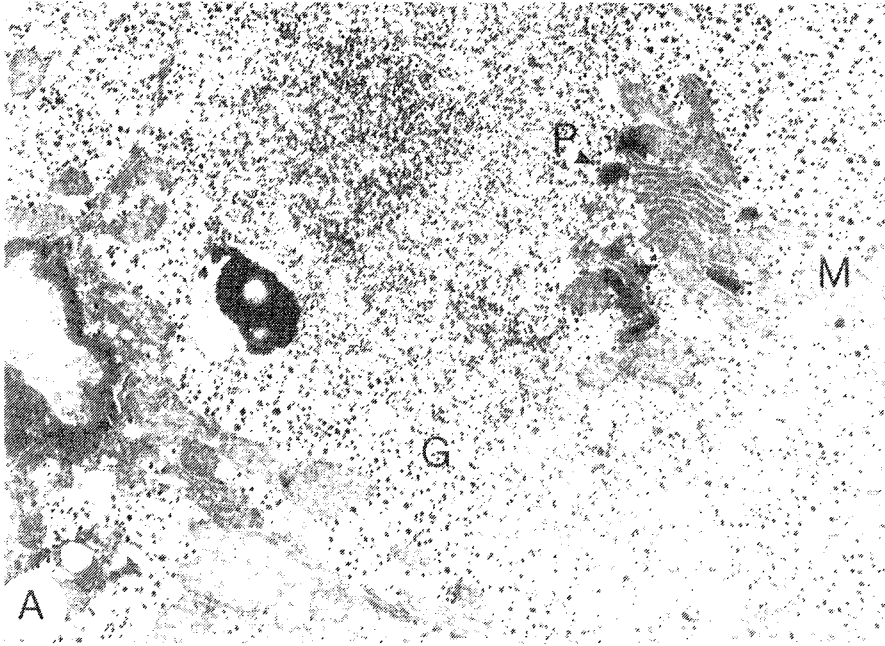
x 6000

B : *Xenopus* traité par le clofibrate

Quelques peroxysomes sont visibles à proximité de gouttelettes lipidiques

x 17000

G : glycogène ; GL : gouttelette lipidique ; P : peroxysome ; M : mitochondrie



les animaux soient ou non traités par le clofibrate, la forme des peroxysomes est variée et leur taille est toujours inférieure à $0,44 \mu\text{m} \pm 0,12$.

B) Etude Biochimique

1) Stade larvaire

Les dosages biochimiques des activités de la catalase, de la FAOxase, de la PBE et de la DAAOxase ont été effectués sur les homogénats hépatiques provenant de larves d'Alytes élevées pendant une semaine dans une solution enrichie en clofibrate (0,5 mM). Pour les trois premières enzymes, il n'apparaît pas de différences statistiquement significatives entre les têtards traités et les témoins. Seule l'activité enzymatique de la DAAOxase hépatique diminue significativement chez les animaux traités par le clofibrate (Fig. 17).

2) Stade adulte

a) Poids corporel et hépatique

Le poids corporel des Grenouilles adultes et celui de leur foie décroissent durant le traitement par le clofibrate. Chez les adultes de Xénope, le clofibrate ne semble pas avoir d'impact sur le poids corporel et hépatique (Fig. 18).

b) Teneur protéique

Sous l'action du clofibrate, aucun changement significatif n'est observé dans la teneur protéique du foie, que ce soit chez la Grenouille verte ou chez le Xénope. Par contre une légère augmentation de la teneur protéique est constatée dans la fraction L enrichie en peroxysomes chez les animaux traités (Fig. 18).

c) Activités enzymatiques peroxysomales

Les activités totales et spécifiques de quatre enzymes ont été dosées : catalase, FAOxase, PBE et DAAOxase.

Têtards d'Alyte (prémétamorphose)

		Témoins	Traités au clofibrate
Catalase	(a)	60 ± 22 (4)	64 ± 14 (5)
	(b)	$0,65 \pm 0,14$	$0,64 \pm 0,11$
DAAOxase	(a)	203 ± 92 (4)	$87 \pm 15^{++}$ (5)
	(b)	$2,1 \pm 0,46$	$0,87 \pm 0,23^{+}$
FAOxase	(c)	52 ± 14 (3)	64 ± 9 (6)
	(d)	$0,57 \pm 0,08$	$0,67 \pm 0,09$
PBE	(c)	$0,18 \pm 0,01$ (3)	$0,15 \pm 0,02$ (5)
	(d)(x10 ⁻³)	$1,7 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,4$

++ p < 0,05
 + p < 0,05

(a) = UB/g de foie
 (b) = UB/mg de protéines
 (c) = mU/g de foie
 (d) = mU/mg de protéines

Figure 17 : Activités des enzymes peroxysomales dans des homogénats de foie de têtards d'Alyte traités ou non par le clofibrate

		Poids corporel	Poids du foie	Index hépatique	(a) Protéines hépatique totales	(b) Protéines peroxysomales
<i>Rana esculenta</i>	Témoins	53 ± 10	2,5 ± 0,6	3,9 ± 1	118 ± 35	7,2 ± 2,8
	Traités	+38 ± 8	*1,1 ± 0,4	*2,3 ± 0,5	111 ± 32	11,5 ± 0,7
<i>Xenopus laevis</i>	Témoins	55 ± 7	2 ± 0,4	3,6 ± 0,5	134 ± 24	4 ± 2,2
	Traités	59 ± 10	2,2 ± 0,8	3,7 ± 0,8	101 ± 18	5,8 ± 1,2

+ p < 0,05

* p < 0,01

(a) mg de protéines / g de foie

(b) mg de protéines / g de foie

Figure 18 : Effet du clofibrate sur le poids corporel, le poids et la teneur en protéines du foie de *Rana esculenta* et *Xenopus laevis*

α - Homogénat hépatique

Les homogénats obtenus à partir des tissus hépatiques provenant des adultes de *Rana* et *Xenopus*, traités pendant 10 jours par le clofibrate présentent une activité catalasique spécifique 1,4 et 2,1 fois plus élevée que celle rencontrée chez les témoins respectifs (Fig. 19).

L'activité totale de la DAAOxase augmente dans les hépatocytes de *Rana esculenta* et de *Xenopus laevis* sous l'effet du clofibrate alors que l'activité spécifique reste constante chez *Xenopus* mais augmente chez *Rana*.

Les activités totales et spécifiques des enzymes de la β -oxydation augmentent également chez *Rana* à la suite de ce traitement. Les activités spécifiques de la FAOxase et de la PBE sont augmentées respectivement de 1,4 et 2,3 fois (Fig. 19).

Il a été impossible de détecter les activités de ces deux enzymes dans les homogénats obtenus à partir du foie de Xénopes adultes traités ou non par le clofibrate dans nos conditions de dosage spectrophotométrique.

β - Fraction L, enrichie en peroxysomes

Les dosages enzymatiques ont été réalisés ici non plus sur des homogénats entiers mais sur des fractions cellulaires enrichies en peroxysomes. Les résultats obtenus sont schématisés sur les Figures 20 et 21. Les dosages réalisés sur les fractions N (noyaux), M (mitochondries), L (peroxysomes), P (microsomes) et S (protéines solubles) ont concerné les activités des quatre enzymes dont la présence avait été recherchée dans les homogénats, c'est-à-dire la catalase, la DAAOxase, la FAOxase et la PBE. Les activités spécifiques les plus élevées concernant les enzymes peroxysomales se retrouvent systématiquement dans la fraction L. Il est à noter toutefois qu'une forte activité catalasique est observée dans la fraction S des protéines solubles. Ceci étant sans doute lié à la présence de catalase cytoplasmique d'une part et d'autre part au fait que la catalase peroxysomale s'échappe facilement de ces organites lors de l'homogénéisation et de la centrifugation des tissus hépatiques (Hayashi et coll., 1975).

Pour *Rana* comme pour *Xenopus*, le traitement des adultes par le clofibrate induit une augmentation des activités spécifiques de la catalase et de la FAOxase. Si les activités de la PBE et de la DAAOxase hépatiques sont augmentées chez *Rana*, il n'en est pas de même chez *Xenopus*. l'accroissement des activités totales et spécifiques des deux enzymes de la β -oxydation peroxysomale est nette au niveau de la fraction L pour *Rana esculenta*. Elle est plus faible pour *Xenopus laevis* mais contrairement aux résultats négatifs obtenus précédemment avec les homogénats, les activités de ces deux enzymes sont détectées dans la fraction L provenant d'animaux témoins ou traités par le clofibrate (Fig. 22).

Espèces	homogenats	Catalase		Lauroyl-coA oxydase		Enzyme peroxysomale bifonctionnelle		D-aminoacide oxydase	
		U/g de foie	U/mg prot	mU/g de foie	mU/mg prot	mU/g de foie	mU/mg prot	mU/g de foie	mU/mg prot
<i>Rana esculenta</i>	H _C	135 ± 21	1,39 ± 0,63	111 ± 10	0,96 ± 0,08	46 ± 10	0,49 ± 0,27	958 ± 279	7,56 ± 1,09
	H _T	269 ± 51	1,92 ± 0,33	115 ± 26	1,34 ± 0,35	87 ± 12	1 ± 0,02	1449 ± 28	11,7 ± 4
	H _T /H _C	1,99*	1,38	1,03	1,39 ⁺	1,89 ⁺	2,04 ⁺	1,51*	1,54
<i>Xenopus laevis</i>	H _C	51 ± 8	0,48 ± 0,08	ND	ND	ND	ND	398 ± 10	6,9 ± 2,8
	H _T	97 ± 9,4	1,01 ± 0,28	ND	ND	ND	ND	630 ± 149	6,7 ± 2,8
	H _T /H _C	1,90*	2,10 ⁺	-	-	-	-	1,58*	0,97

Figure 19 : Effets du clofibrate sur les activités enzymatiques peroxysomales mesurées dans les homogénats du foie de *Rana esculenta* et *Xenopus laevis*

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± erreur standard.

H_C : homogenats de foie d'animaux témoins ; H_T : homogénats de foie d'animaux traités.

⁺ : P < 0,05 ; * : P < 0,01 (test de Student) ; ND : non déterminé

Figure 20

**Représentation schématique des activités enzymatiques
peroxysomales dans les fractions cellulaires obtenues à partir
d'homogénat de foie de *Rana esculenta* adultes.**

En hachuré les animaux témoins, en clair les adultes de *Rana* traitées par le
clofibrate

A : Catalase

B : Fatty acyl coA oxydase

C : Enzyme bifonctionnelle de la β -oxydation peroxysomale

D : D-aminoacide oxydase

N : noyau ; M : fraction mitochondriale lourde ; L : fraction mitochondriale légère ;

P : fraction microsomale ; S : fraction des protéines solubles

Figure 20

**Représentation schématique des activités enzymatiques
peroxysomales dans les fractions cellulaires obtenues à partir
d'homogénat de foie de *Rana esculenta* adultes.**

En hachuré les animaux témoins, en clair les adultes de *Rana* traitées par le
clofibrate

A : Catalase

B : Fatty acyl coA oxydase

C : Enzyme bifonctionnelle de la β -oxydation peroxisomale

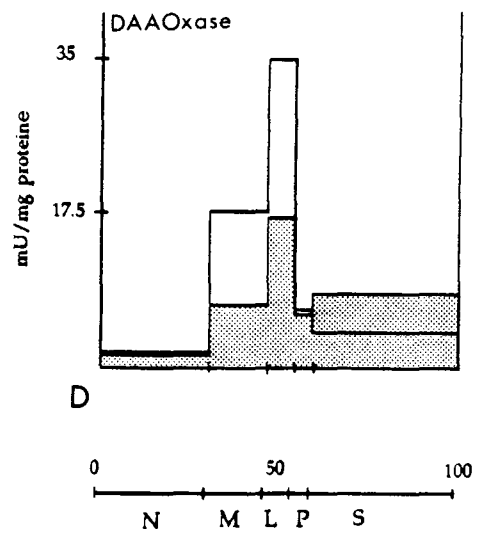
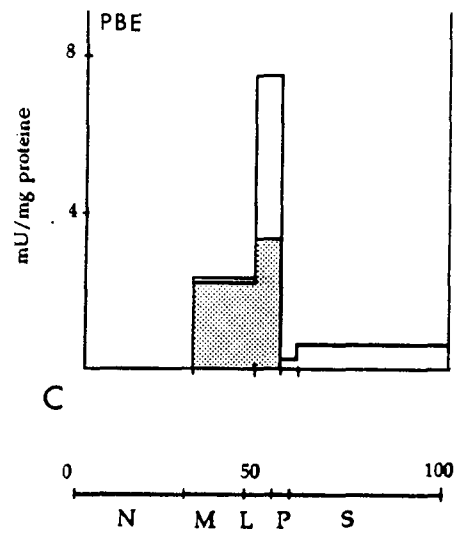
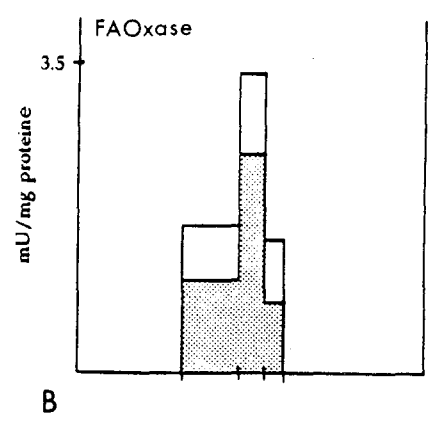
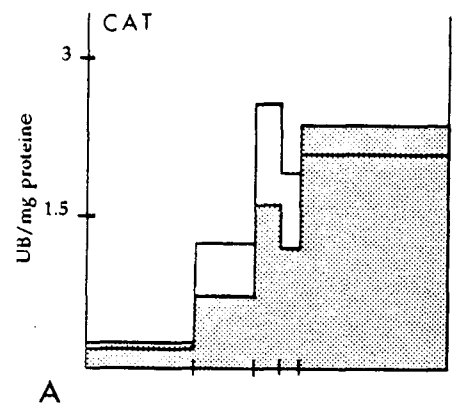
D : D-aminoacide oxydase

N : noyau ; M : fraction mitochondriale lourde ; L : fraction mitochondriale légère ;

P : fraction microsomale ; S : fraction des protéines solubles

RANA

Activités spécifiques



Quantité relative de protéines

Figure 21

**Représentation schématique des activités enzymatiques
peroxysomales dans les fractions cellulaires obtenues à partir
d'homogénat de foie de *Xenopus laevis* adultes.**

En hachuré les animaux témoins, en clair les adultes de *Xenopus* traités par le
clofibrate

A : Catalase

B : Fatty acyl coA oxydase

C : Enzyme bifonctionnelle de la β -oxydation peroxisomale

D : D-aminoacide oxydase

N : noyau ; M : fraction mitochondriale lourde ; L : fraction mitochondriale légère ;

P : fraction microsomale ; S : fraction des protéines solubles

Figure 21

**Représentation schématique des activités enzymatiques
peroxysomales dans les fractions cellulaires obtenues à partir
d'homogénat de foie de *Xenopus laevis* adultes.**

En hachuré les animaux témoins, en clair les adultes de *Xenopus* traités par le
clofibrate

A : Catalase

B : Fatty acyl coA oxydase

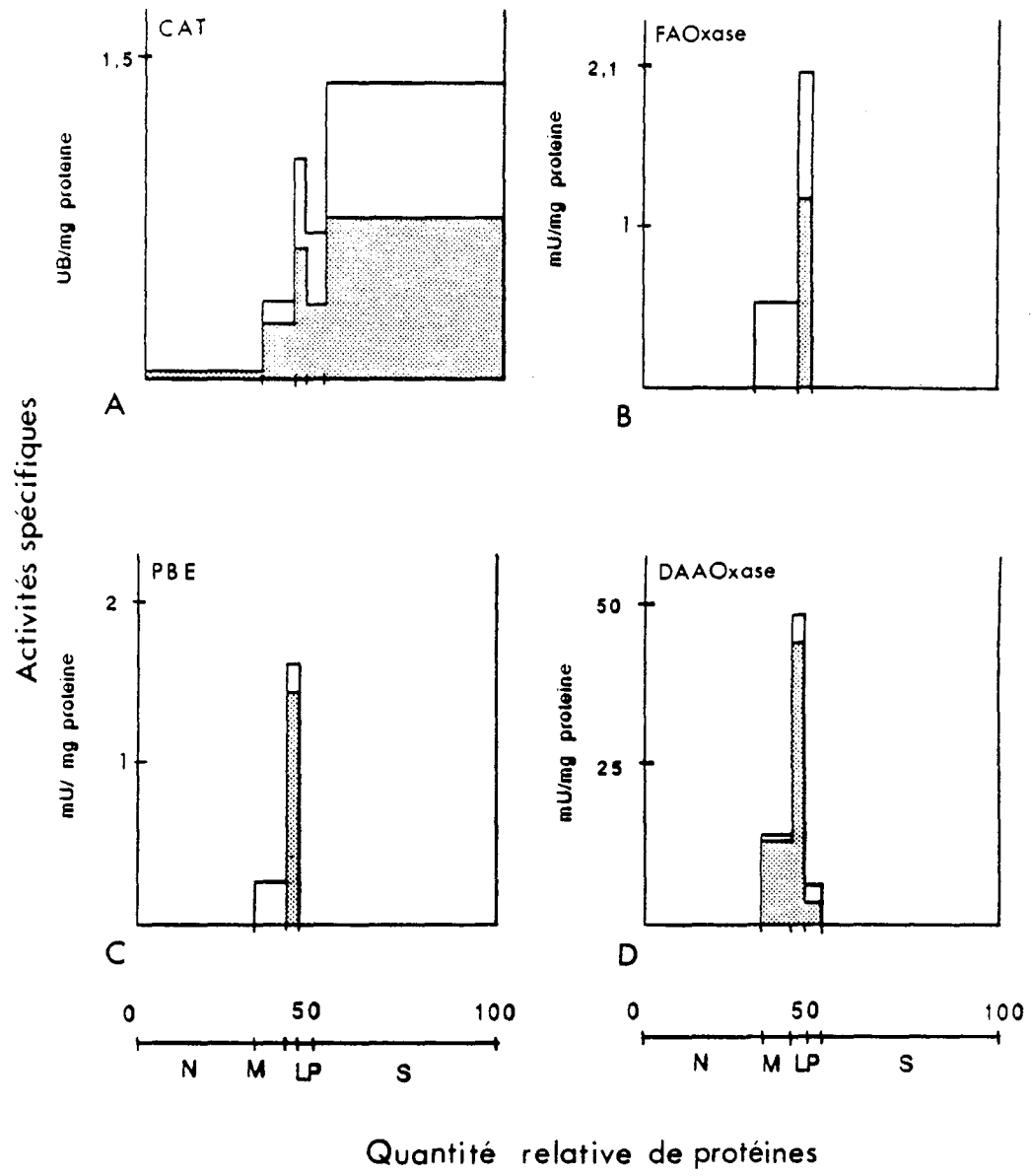
C : Enzyme bifonctionnelle de la β -oxydation peroxisomale

D : D-aminoacide oxydase

N : noyau ; M : fraction mitochondriale lourde ; L : fraction mitochondriale légère ;

P : fraction microsomale ; S : fraction des protéines solubles

XENOPE



Espèces	Fraction mitochondriale légère	Catalase		Lauroyl-coA oxydase		Enzyme peroxysomale bifonctionnelle		D-aminoacide oxydase	
		U/g de foie	U/mg protein	mU/g de foie	mU/mg protein	mU/g de foie	mU/mg protein	mU/g de foie	mU/mg protein
<i>Rana esculenta</i>	L _C	8,38 ± 2,12	1,59 ± 0,2	20,94 ± 3	2,49 ± 0,29	32 ± 4	3,3 ± 0,7	88 ± 17	17 ± 4,6
	L _T	28 ± 1	2,56 ± 0,2	39,52 ± 2,50	3,4 ± 0,2	61 ± 2	7,5 ± 0,2	289 ± 39	35 ± 9
	L _T /L _C	3,34*	1,61 ⁺	1,98 ⁺	1,36 ⁺	1,9*	2,27*	3,28*	2,05*
<i>Xenopus laevis</i>	L _C	2,35 ± 1,2	0,60 ± 0,1	8,33 ± 3	1,23 ± 0,19	12,01 ± 1	1,4 ± 0,15	182 ± 29	43,5 ± 5,7
	L _T	6 ± 0,58	1,09 ± 0,29	10,21 ± 2,91	2,03 ± 0,37	46 ± 2	1,6 ± 0,5	254 ± 60	48 ± 1
	L _T /L _C	2,55*	1,81 ⁺	1,22	1,65 ⁺	3,83*	1,14	1,39	1,10

Figure 22 : Evolution des activités enzymatiques peroxysomales dans les fractions mitochondriales légères du foie de *Rana* et de *Xenopus* traités au clofibrate

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± erreur standard.

L_C : fraction mitochondriale légère d'animaux témoins ; L_T : fraction mitochondriale légère d'animaux traités

+ P < 0,05 ; * : P < 0,01 (test de Student)

C) Etude électrophorétique

1) Impact du clofibrate sur le profil électrophorétique des fractions enrichies en peroxysomes

L'étude par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide à 12,5 %, en présence de SDS, des protéines extraites des fractions enrichies en peroxysomes a été entreprise chez les adultes de *Rana esculenta* traités ou non par le clofibrate. Une centaine de polypeptides ont pu être discriminés. Leurs masses moléculaires relatives varient de 23000 à 205000 dalton. Après coloration au Bleu de Coomassie ou à l'argent, il est apparu que deux polypeptides respectivement de 19 et 37 Kd ne sont détectés que dans les extraits des protéines peroxysomales hépatiques provenant des animaux traités par le clofibrate (Fig. 23).

Une attention particulière a été portée à la région correspondant aux protéines de 80 Kd puisque Reddy et Kumar (1979) ont montré que la synthèse d'un polypeptide de 80 Kd est induite sous l'action des proliférateurs peroxysomaux et que cette induction est visible sur des gels d'électrophorèse. Mais aucune différence dans la synthèse des polypeptides ayant ce poids moléculaire n'a pu être observée chez *Rana esculenta* traités au clofibrate quand les électrophorégrammes sont comparés à ceux des témoins.

2) Expression de la catalase et de la D-aminoacide oxydase

La mise à notre disposition de deux anticorps polyclonaux anti-catalase de foie de boeuf et anti-DAAOxase de rein de rat, nous a permis de rechercher la position de ces deux polypeptides dans nos préparations. Après électrophorèse des protéines extraites soit des homogénats ou des fractions peroxysomales, et électrotransfert sur filtre de nitrocellulose, nous avons réalisé des immunodétections de ces deux enzymes et comparé leur expression d'une part dans les diverses espèces d'Anoures utilisées au cours de notre travail (*Alytes obstetricans*, *Xenopus laevis* et *Rana esculenta*) ainsi qu'au cours du traitement par le clofibrate.

a) Catalase

La détection immunologique de la catalase sur filtre de nitrocellulose révèle l'existence de différences de masses moléculaires pour cette protéine selon l'espèce considérée. Elle est de 60 kDa pour *Alytes*, de 55 kDa pour *Xenopus* et de

Figure 23

Etude électrophorétique

A : Comparaison après coloration au Bleu de Coomassie des protéines extraites de fractions enrichies en peroxysomes de foie de *Rana esculenta* traitée (piste 2) ou non (piste 1) par le clofibrate.

B : Immunodétection de la D-amino acide oxydase après transfert sur filtre de nitrocellulose à l'aide d'un anticorps anti-DAAOxase de rein de Rat.

Piste 1 : foie de Rat servant de témoin

Piste 2 : foie de *Rana esculenta*

Piste 3 : foie de *Xenopus laevis*

Piste 4 : foie d'*Alytes obstetricans*

C : Immunodétection de la catalase après transfert sur filtre de nitrocellulose, à l'aide d'un anticorps anti-catalase de foie de Boeuf

Piste 1 : foie de rat servant de témoin

Piste 2 : foie d'*Alytes obstetricans*

Piste 3 : foie de *Xenopus laevis*

Piste 4 : foie de *Rana esculenta*

D : Coloration au Bleu de Coomassie de la catalase de foie de *Rana esculenta* obtenue après électroélution.

E : Détection immunologique après transfert sur filtre de nitrocellulose de la catalase de *Rana esculenta*, obtenue après électroélution.

Une bande unique est détectée.

Mr : masse moléculaire relative

Protéines de poids moléculaires connus : Myosine (205 000) ; β -galactosidase (116 000) ; Phosphorylase b (97 000) ; Serumalbumine bovine (66 000) ; Ovalbumine (45 000) ; Anhydrase carbonique (29 000).

Figure 23

Etude électrophorétique

A : Comparaison après coloration au Bleu de Coomassie des protéines extraites de fractions enrichies en peroxyosomes de foie de *Rana esculenta* traitée (piste 2) ou non (piste 1) par le clofibrate.

B : Immunodétection de la D-amino acide oxydase après transfert sur filtre de nitrocellulose à l'aide d'un anticorps anti-DAAOxase de rein de Rat.

Piste 1 : foie de Rat servant de témoin

Piste 2 : foie de *Rana esculenta*

Piste 3 : foie de *Xenopus laevis*

Piste 4 : foie d'*Alytes obstetricans*

C : Immunodétection de la catalase après transfert sur filtre de nitrocellulose, à l'aide d'un anticorps anti-catalase de foie de Boeuf

Piste 1 : foie de rat servant de témoin

Piste 2 : foie d'*Alytes obstetricans*

Piste 3 : foie de *Xenopus laevis*

Piste 4 : foie de *Rana esculenta*

D : Coloration au Bleu de Coomassie de la catalase de foie de *Rana esculenta* obtenue après électroélution.

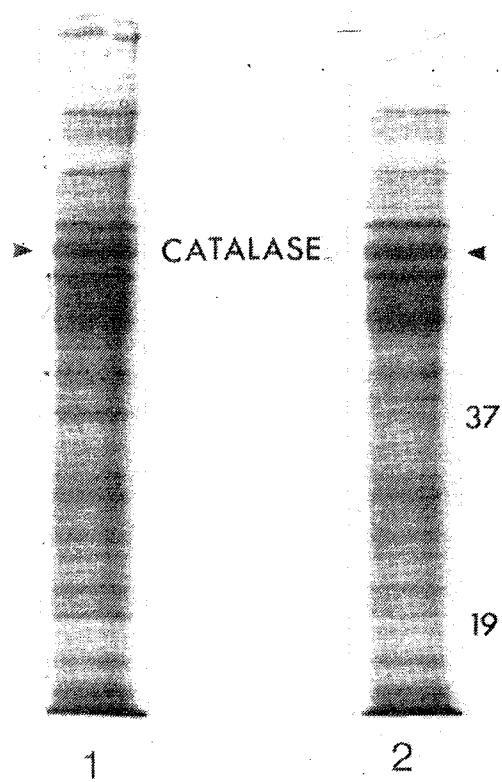
E : Détection immunologique après transfert sur filtre de nitrocellulose de la catalase de *Rana esculenta*, obtenue après électroélution.

Une bande unique est détectée.

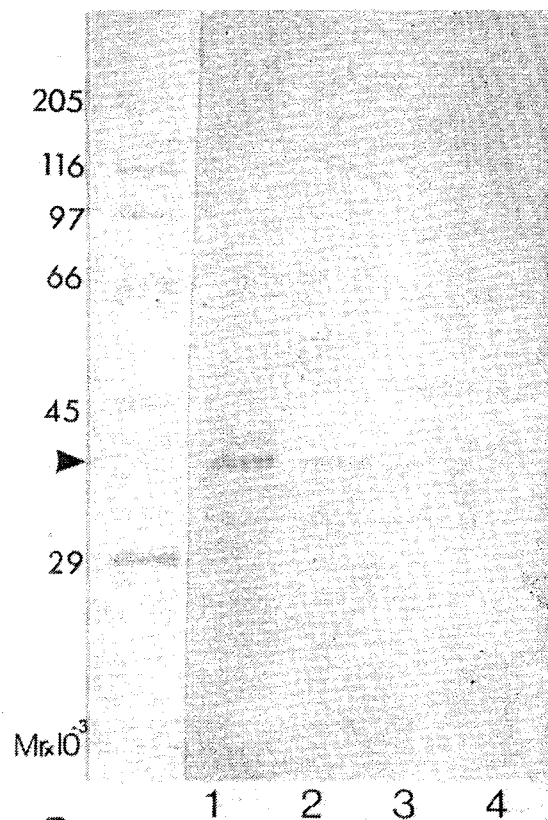
Mr : masse moléculaire relative

Protéines de poids moléculaires connus : Myosine (205 000) ; β -galactosidase (116 000) ; Phosphorylase b (97 000) ; Serumalbumine bovine (66 000) ; Ovalbumine (45 000) ; Anhydrase carbonique (29 000).

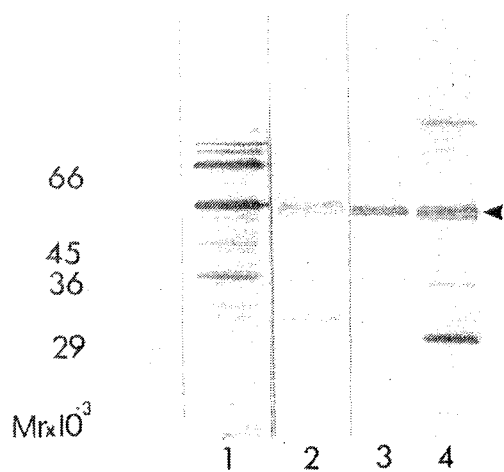
A



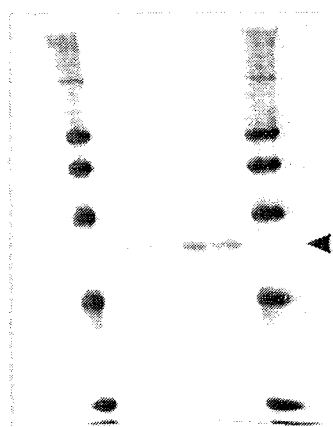
B



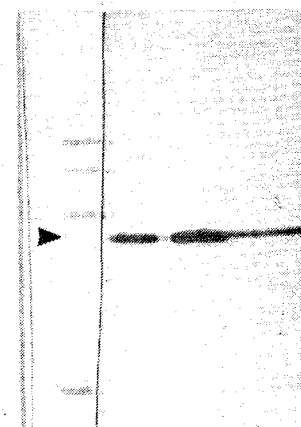
C



D



E



53 kDa pour *Rana* (Fig. 23 C). Cet anticorps croise avec un polypeptide majeur de 60 Kd contenu dans l'extrait de foie de Rat servant de témoin.

La masse moléculaire relative de la catalase de *Rana* a été confirmée après électroélution de la bande protéique correspondant à cette enzyme. L'électrophorèse et l'immunoréplique du produit de l'électroélution (Fig. 23 D et E) montre qu'il s'agit bien du monomère de la catalase avec une masse moléculaire relative de 53000. Cette préparation pourra être utilisée pour la fabrication d'un anticorps polyclonal dirigé contre la catalase hépatique de *Rana esculenta*.

Utilisant pour l'électrophorèse monodimensionnelle la même quantité de protéines déposées, il a été constaté après immunoréplique, que la concentration de la catalase était la même dans les fractions de peroxysomes extraites du foie de *Rana* ayant ou non subi un traitement par le clofibrate. Cette observation a également été faite chez le Xénope.

b) D-aminoacide oxydase

La recherche systématique de la DAAOxase dans les homogénats de foie ou dans les fractions hépatiques enrichies en peroxysomes de *Rana*, de *Xenopus* et d'*Alytes* n'a abouti qu'à un seul résultat positif. Il concerne l'extrait de peroxysomes hépatiques de *Rana* dans lequel une molécule de masse moléculaire de 35 kDa croise avec l'anticorps (Fig. 23 B). Cet anticorps ayant été préparé à partir de rein de Rat, nous l'avons testé également sur des homogénats rénaux provenant de ces diverses espèces d'Anoures. L'anticorps croise avec une protéine de 35 kDa contenue dans le rein des juvéniles de *Rana* et d'*Alytes*. Aucun résultat n'est obtenu avec les protéines extraites du rein de Xénope.

DISCUSSION

La visualisation des peroxysomes détectés par l'activité peroxydatique de la catalase, a permis de montrer que ces organites étaient présents dans le foie d'*Alytes obstetricans* et de *Xenopus laevis* au cours du développement post-embryonnaire. Leur présence est confirmée dans les hépatocytes et dans les cellules rénales des tubules proximaux de la plupart des Urodèles et des Anoures (Hruban et Reicheigl, 1969 ; Scott et coll., 1969 ; Roels et coll., 1970). Des microperoxysomes ont été décrits dans la thyroïde et le pancréas de *Pleurodeles waltlii* (Picheral, 1972), dans le pancréas de *Salamandra salamandra* et de *Rana esculenta* (Trandaburu, 1980), et dans le tissu interrénal de *Salamandra salamandra* et de *Triturus cristatus* (Berchtold, 1975).

Du point de vue morphologique, la structure cristalline appelée nucléoïde que l'on rencontre dans la matrice des peroxysomes hépatiques de Rat, n'a jamais été observée dans les peroxysomes hépatiques de l'Alyte ou du Xénope. Mais ceci n'est pas une règle générale chez les Amphibiens puisque Visentin et Allen (1969) ont montré la présence de nucléoïde dans la matrice des peroxysomes hépatiques de *Rana pipiens* adultes alors que chez le Crapaud *Bufo marinus*, Roels et ses collaborateurs (1970) n'en ont jamais observé.

Au cours de la métamorphose naturelle, la taille et la fréquence des peroxysomes ne varient pas de la même manière entre les deux espèces étudiées. Ainsi chez l'Alyte, si la fréquence des structures DAB-positives n'augmente pas de façon significative, leur taille diminue de la prémétamorphose au stade post-climax. La situation observée au cours du développement post-embryonnaire du Xénope est très différente. Que ce soit au stade larvaire ou adulte, l'essentiel de l'espace cytoplasmique des hépatocytes de ces animaux est occupé par du glycogène (Spornitz, 1974). Les organites sont très peu

nombreux dans ces cellules et tout particulièrement les peroxysomes. La taille des peroxysomes hépatiques est plus petite chez le Xénope que chez l'Alyte et ne présente pas de variations significatives au cours du développement post-embryonnaire naturel.

Les travaux de Dauça et coll. (1982 b) ont montré que la taille et le nombre des peroxysomes hépatiques augmentaient au cours de la métamorphose spontanée de *Rana catesbeiana*. Cette divergence avec ce que nous avons observé dans le foie d'*Alytes obstetricans* peut s'expliquer d'une part par le fait qu'il s'agit de deux espèces différentes et d'autre part à cause de la méthodologie utilisée, puisque pour *R. catesbeiana* la mesure de la fréquence des peroxysomes n'a pas été rapportée à une surface bien définie.

L'étude biochimique a montré que l'activité catalasique ainsi que celles de plusieurs oxydases peroxysomales impliquées dans la production d'eau oxygénée, pouvaient être décelées dans le foie de ces Amphibiens au cours de la métamorphose naturelle. De tels dosages n'avaient jusqu'à présent été réalisés que chez des animaux adultes.

En ce qui concerne la catalase, son activité enzymatique, rapportée au gramme de foie, croît au cours de la métamorphose spontanée de l'Alyte et diminue au contraire chez le Xénope pendant la même période. l'activité spécifique mesurée dans le foie diminue cependant chez l'Alyte au stade final de la métamorphose. Cette baisse de l'activité peut être mise en parallèle avec l'augmentation constatée du taux des protéines hépatiques au cours de la métamorphose (Atkinson, 1971). Une telle opposition constatée ici dans le comportement de l'activité enzymatique de la catalase avait déjà été observée par Dauça et coll. (1982 b) concernant *Rana catesbeiana* et *Xenopus laevis*. D'autres différences ont pu être mises en évidence au cours de notre étude. Si l'activité de la première enzyme du cycle de la β -oxydation peroxysomale a pu être détectée dans les homogénats hépatiques au cours de la métamorphose de l'Alyte, la même technique de dosage n'a pas permis de mesurer l'activité de la FAOxase dans les préparations hépatiques du Xénope. Casteels et coll. (1989) font état de la même difficulté à doser cette enzyme chez *Bombina orientalis*. Selon ces auteurs, certaines substances contenues dans l'homogénat hépatique interféreraient avec la détection du peroxyde d'hydrogène, substance dont la concentration est mesurée lors du dosage de la fatty acyl coA oxydase. Par contre chez les deux espèces étudiées, les activités totales et spécifiques de la D-aminoacide oxydase et de l'urate oxydase ont pu être dosés dans le foie tout au long de la métamorphose naturelle. Scott et coll. (1969) et Visentin et Allen (1969) avaient déjà détecté la présence de ces enzymes chez d'autres espèces d'Amphibiens adultes.

La présence dans les hépatocytes d'une oxydase peroxysomale ayant comme substrat la D-proline est inattendue. Néanmoins les travaux de Hoeprich (1965) et plus récemment ceux de Konno (1990) ont montré l'existence d'acides aminés de type D dans le sang et l'urine des Mammifères. Ils seraient produits par la flore intestinale. L'urate

oxydase intervient dans le cycle de dégradation des purines et catalyse l'oxydation de l'acide urique en allantoïne. Cette dégradation des purines en urate est commune à l'ensemble des Vertébrés alors que la dégradation de l'urate est plus ou moins complète chez les Vertébrés Supérieurs (White et coll., 1973). La présence d'un même complexe enzymatique dans le foie des Amphibiens regroupant l'allantoïnase et l'allantoïcase a été rapportée par Takada et Noguchi (1983). L'allantoïnase hydrolyse l'allantoïne en acide allantoïque qui sera finalement catabolisé chez les Amphibiens en acide glyoxylique et en urée par le complexe allantoïnase/allantoïcase (Noguchi et coll., 1986).

Les variations des activités de la catalase et des oxydases étudiées suggèrent qu'au fur et à mesure du développement post-embryonnaire des Amphibiens, ces enzymes sont de plus en plus impliquées dans le métabolisme hépatique. Les différences observées au cours de la métamorphose d'*Alytes obstetricans* et de *Xenopus laevis* concernant la morphologie des peroxysomes ainsi que le comportement des enzymes qu'ils renferment sont à analyser dans le contexte du changement d'habitat qui se produit pour l'une et l'autre espèce au cours de cette crise du développement. En effet chez l'Alyte, la larve aquatique ammonotélique se transforme en juvénile terrestre et uréotélique alors que le Xénope reste aquatique et ammonotélique pendant toute son existence. L'existence d'un éventuel lien entre ces deux événements avait déjà été suggérée par Dauça et coll. (1982 a). Ces auteurs avaient constaté l'existence d'un accroissement important du nombre des microperoxysomes et de l'activité catalasique intestinale chez *Rana catesbeiana* et *Alytes obstetricans* devenus terrestres alors que ceci n'était pas constaté pour l'épithélium intestinal de *Xenopus laevis* au climax de la métamorphose.

Les travaux effectués chez les Oiseaux montrent que le nombre des peroxysomes hépatiques et rénaux ainsi que l'activité de la catalase augmentent régulièrement jusqu'à l'éclosion (Stephens et Bils, 1967 ; Essner, 1969). Il en est de même dans le foie (Tsukuda et coll., 1968 ; Hruban et Reicheigl, 1969 ; Krahling et coll., 1979 ; David, 1980), dans le rein (Miles et Holmes, 1975) et dans l'intestin (Pipan et Psenicnik, 1975 ; Calvert et Ménard, 1978) des Mammifères au cours de la période péri-natale. Ces données ont amené Master et Holmes (1977) à postuler que les peroxysomes sont plus ou moins immatures à la naissance et qu'ils n'acquièrent leurs potentialités définitives correspondant à celles rencontrées chez l'adulte qu'un ou deux mois après la naissance.

Impact de la triiodothyronine

Pendant les deux semaines du traitement hormonal des larves d'*Alytes obstetricans*, la taille des organites DAB-positif diminue. Un accroissement de l'activité spécifique et totale de la catalase et de la DAAOxase est aussi constaté. Pendant la même période les activités (totale et spécifique) de l'urate oxydase diminuent alors que l'activité

de la FAOxase ne semble pas sensible à l'action de la T₃. Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec ceux obtenus lors de la métamorphose naturelle. Néanmoins, les activités de la catalase, de la DAAOxase et de la FAOxase sont plus faibles dans les homogénats de foie des animaux traités par rapport aux larves naturelles. Il est également important de noter que pour ces trois enzymes peroxysomales, une diminution de leurs activités est constatée au début du traitement hormonal lorsque l'on compare les animaux traités pendant 4 jours par la T₃ avec ceux restés dans le propylthiouracyl. Pendant cette même période, la fréquence des peroxysomes est plus faible. Les travaux de Dauça et coll. (1983) font état d'une augmentation progressive du nombre des peroxysomes, ainsi que de l'activité catalasique hépatique au cours d'un traitement hormonal par la thyroxine mais ne mentionnent pas cette baisse de l'activité au début de l'expérimentation. Cependant les deux expériences n'ont pas été menées de la même manière : les espèces utilisées sont différentes et l'hormone thyroïdienne choisie était la T₄ et non pas la T₃. Cette dernière est considérée comme l'hormone la plus active chez les Amphibiens (Kistler et coll., 1973). Enfin contrairement à ce que nous avons mis en oeuvre, les têtards de *Rana catesbeiana* n'avaient pas été mis au contact du propylthiouracyl pendant plusieurs semaines avant le début du traitement hormonal.

L'action des hormones thyroïdiennes sur les peroxysomes hépatiques des Mammifères a fait l'objet de plusieurs travaux. L'injection de T₃ ou de T₄ chez le Rat provoque une augmentation du nombre des peroxysomes dans les hépatocytes ainsi qu'une élévation importante des activités totales de la catalase et de la DAAOxase, alors que celle de l'uricase diminue (Fringes et Reith, 1980 ; Just et coll., 1982). De plus, après traitement hormonal, la densité des peroxysomes purifiés par ultracentrifugation différentielle dans un gradient de sucrose est plus faible que celle des organites obtenus avant action de la T₃. L'hormone thyroïdienne a induit l'apparition d'une nouvelle population de peroxysomes dont la taille est plus faible (Just et coll., 1982). Dans les mêmes conditions, l'activité enzymatique de la β -oxydation peroxysomale augmente également (Just et Hartl, 1983). Des expériences d'exposition au froid sur le Rat, traitement qui engendre chez les Mammifères une élévation du taux des hormones thyroïdiennes plasmatiques, entraînent aussi des modifications peroxysomales. La fréquence de ces organites augmente ainsi que l'activité spécifique des enzymes impliquées dans la β -oxydation peroxysomale des acides gras. Par contre le volume moyen de ces organites diminue (Goglia et coll., 1989 a et b). L'ensemble des résultats obtenus soit chez les Amphibiens soit chez les Mammifères montre que les peroxysomes sont des organites cibles des hormones thyroïdiennes puisque sous leur effet une prolifération hépatique de peroxysomes de petite taille est constatée et que dans le même temps les activités de leurs principales enzymes sont augmentées, exception faite de l'urate oxydase (Just et coll., 1982; Just et Hartl, 1983 ; Ciolek et coll., 1989).

Impact du clofibrate

Chez les Rongeurs, l'injection de clofibrate induit une prolifération des peroxyosomes ainsi qu'une élévation importante des activités enzymatiques de la β -oxydation peroxyosomale. Très peu d'études ayant été réalisées avec cette substance chez les Vertébrés inférieurs, nous avons testé les effets du clofibrate sur le foie des larves d'*Alytes obstetricans* et des adultes de *Rana esculenta* et de *Xenopus laevis*.

La toxicité du produit vis-à-vis des larves d'*Alytes* est importante puisque lorsqu'elles sont élevées dans de l'eau contenant 1 mM de clofibrate, elles meurent au bout de quelques heures. La dose maximale utilisée (0,5 mM) ne provoque pas de prolifération des peroxyosomes hépatiques. Au plan biochimique, les seuls effets du clofibrate se résument à une baisse de l'activité de la DAAOxase.

Chez les adultes de *Rana*, les résultats peuvent être comparés à ceux obtenus dans le foie des Rongeurs traités au clofibrate. Toutefois l'effet hypolipémiant n'a pas été recherché dans le sang de ces animaux. L'injection buccale de clofibrate chez *Rana* provoque une prolifération des peroxyosomes hépatiques. A la suite du traitement, les organites sont de petite taille et très polymorphes. Il n'est pas rare d'observer des prolongements établissant une communication entre deux organites DAB-positifs. Des constatations identiques ont été faites par Hruban et coll. (1964) à la suite du traitement des Rongeurs par ces facteurs utilisés dans les mêmes conditions expérimentales. Par contre aucune modification n'est constatée en ce qui concerne le nombre et la taille des peroxyosomes hépatiques des Xénopes traités par le clofibrate.

L'étude de l'impact du clofibrate sur les activités enzymatiques peroxyosomales a été réalisée non seulement sur les homogénats de foie entier mais également sur les culots enrichis en peroxyosomes obtenus par fractionnement cellulaire. Cette approche technique permet d'effectuer des dosages enzymatiques plus précis puisque certaines enzymes peroxyosomales sont présentes dans plusieurs compartiments cellulaires (Vamecq, 1989). D'autre part, la concentration enzymatique dans ces culots semi-purifiés de peroxyosomes nous a permis de doser l'activité des enzymes de la β -oxydation qui était jusqu'alors masquée dans les homogénats entier de foie du Xénope. Parallèlement à la prolifération des peroxyosomes mise en évidence par la cytochimie de la catalase dans les hépatocytes de *Rana*, les activités de la catalase, de la DAAOxase et des enzymes de la β -oxydation sont plus élevées chez les animaux traités au clofibrate que chez les témoins. Cette augmentation est respectivement de 3,4 , 3,3 , 2 et 1,9 fois lorsque l'on considère les activités totales. Ces élévations des activités enzymatiques sous l'effet du clofibrate sont cependant moindres que celles qui sont observées dans le foie des Rongeurs soumis au même traitement. Hayashi et ses collaborateurs (1984) arrivent aux mêmes conclusions

biochimiques après une étude réalisée chez un autre Amphibien Anoure, *Bombina orientalis*, traité au clofibrate.

Chez les Xénopes témoins, les activités de la fatty acyl coA oxydase et de l'enoil coA hydratase/3 hydroxyacyl coA déshydrogénase ont pu être détectées dans la fraction enrichie en peroxysomes. On peut donc penser, que outre des substances inhibitrices présentes dans l'homogénat entier de foie de Xénope, le dosage spectrophotométrique des activités de la FAOxase et de la PBE n'est pas suffisamment sensible pour permettre une mesure de ces activités dans les homogénats. L'enrichissement en peroxysomes permet de franchir ce seuil de sensibilité. Dans les culots de peroxysomes appartenant aux Xénopes traités par le clofibrate, l'activité de la FAOxase est significativement augmentée de 1,8 fois et celle de la catalase de 2,9 fois. Lazarow et coll. (1982) ont montré qu'il peut y avoir dissociation, sous l'effet d'agents hypolipémiants, entre l'augmentation des activités enzymatiques peroxysomales et la prolifération des peroxysomes. C'est ce qui semble se produire dans le foie de *Xenopus laevis* dont la singularité du comportement de leurs peroxysomes hépatiques a déjà été soulignée.

Les agents hypolipémiants tel le clofibrate agissent en stimulant la synthèse des enzymes de la β -oxydation peroxysomale (Dwivedi et coll., 1989 ; Malki et coll., 1990 ; Moody, 1978). Reddy et coll. (1979) ont montré par électrophorèse monodimensionnelle sur gel d'acrylamide que la synthèse d'un polypeptide de 80 Kd était induite sous l'effet d'agents proliférateurs des peroxysomes dans le foie des Rats. Par la suite, l'utilisation d'un anticorps anti-PBE a révélé que cette protéine est l'enoil coA hydratase/3 hydroxyacyl coA deshydrogénase (Reddy et coll., 1981). L'observation des profils électrophorétiques correspondants aux protéines des homogénats de foie total ou de culots enrichis en peroxysomes hépatiques des adultes de *Rana* et de *Xenopus* traités par le clofibrate n'a pas permis de mettre en évidence une telle induction. Ceci est peut-être dû à la faible induction enzymatique provoqué par le clofibrate sur les hépatocytes des Amphibiens comparativement à ce qui est observé chez les Rongeurs. Par contre certaines différences ont pu être révélées au niveau des profils électrophorétiques des protéines hépatiques entre les animaux traités par le clofibrate et les témoins. Ainsi deux polypeptides de 19 et 37 Kd ne sont présents que dans le foie des animaux traités. La nature de ces protéines n'est pas encore connue. Cette approche électrophorétique nous a permis de caractériser à l'aide des anticorps correspondants deux protéines peroxysomales : la catalase, marqueur enzymatique peroxysomal (De Duve et Baudhuin, 1966) et une flavoprotéine, la D-aminoacide oxydase.

Dans des conditions natives d'électrophorèse, Barja de Quiroja et coll. (1985) ont montré qu'il existait des différences dans les profils électrophorétiques de la catalase de *Rana ridibunda* et de *Discoglossus pictus*, deux autres espèces d'Amphibiens Anoures. La discrimination par électrophorèse dénaturante des protéines extraites du foie de *Rana*

esculenta, *Alytes obstetricans* et *Xenopus laevis* et leur électrotransfert sur filtre de nitrocellulose, a révélé dans notre étude par immunoréplique que l'anticorps polyclonal anticatalase de boeuf reconnaît une bande majoritaire qu'elle que soit l'espèce considérée ; cependant des différences sont observées dans leurs masses moléculaires relatives. L'expression de la catalase est la même chez le têtard et le juvénile d'Alyte. De la même manière, aucune différence n'apparaît dans l'expression de la catalase chez les adultes de *Rana* ou de *Xenopus* traités ou non par le clofibrate.

La catalase des Mammifères est dans sa forme native un tétramère de 240 kDa. Sa biosynthèse s'effectue dans le cytosol à partir de ribosomes libres qui synthétisent des monomères (Goldman et Blobel, 1978). Les quatre sous-unité sont alors transportées selon un mécanisme encore inconnu vers la matrice d'un peroxysome puis sont assemblées autour d'un hème dans leur configuration définitive. Chez la Souris, la catalase hépatique se présente sous cinq formes différentes (Master, 1982) correspondantes toutes à l'expression d'un seul et même gène (Holmes et Duley, 1975). Cette multiplicité de la molécule est obtenue soit par désialisation (Jones et Masters, 1975), soit à la suite de processus protéolitiques qui s'effectuent dans le cytosol (Mainferme et Wattiaux, 1982). La séquence nucléotidique complète de la catalase du foie de Rat a été obtenue par Furuta et coll. (1986) et son poids moléculaire a été estimée à 59758 daltons. Le fait que les masses moléculaires de la catalase déterminées dans le foie des trois espèces d'Amphibiens étudiées soient différentes entre elles et avec celle correspondante dans le foie de Rat laisse supposer l'existence de modification dans la structure de la molécule entre les Vertébrés inférieurs (Amphibiens) et les Vertébrés supérieurs (Mammifères).

En ce qui concerne la DAAOxase, son expression est très variable d'une espèce ou d'un organe à l'autre. Elle n'est révélée en fait dans nos conditions expérimentales que dans le foie et le rein de *Rana* adulte ainsi que dans le rein d'*Alytes* juvénile. Sa masse moléculaire relative est dans tous les cas égale à 35000. L'activité de cette enzyme ayant été dosée dans le foie des trois espèces étudiées, sa présence dans l'organe de ces Amphibiens ne fait aucun doute. On peut supposer que la réaction immunologique entre un anticorps dirigé contre l'enzyme purifiée à partir du rein de Rat et la DAAOxase hépatique ou rénal d'Amphibien n'est pas suffisamment spécifique. Toutefois les réactions croisées obtenues sur filtre de nitrocellulose montrent qu'il existe certaine homologie entre la DAAOxase des Mammifères et celle présente chez les Amphibiens Anoures.

Le clofibrate et les hormones thyroïdiennes exercent sur les peroxysomes hépatiques des Amphibiens et des Mammifères des effets assez comparables. La prolifération de ces organites sous l'effet de ces facteurs est bien établie dans les deux groupes d'animaux. Elle est plus flagrante lors du traitement par le clofibrate que lors

d'une élévation normale ou provoquée de la concentration plasmatique des hormones thyroïdiennes mais dans les deux situations expérimentales, la population des peroxysomes obtenue correspond à des organites de petites tailles (Flatmark et coll., 1981). En ce qui concerne les inductions enzymatiques peroxysomales chez les Amphibiens, notre étude a montré une augmentation des activités de la catalase, la DAAOxase ainsi que celles des enzymes de la β -oxydation au contact de la T_3 ou du clofibrate. L'activité enzymatique de l'urate oxydase va au contraire en diminuant chez les Amphibiens traités par le clofibrate (Hayashi, 1984) comme elle diminue après traitement à la triiodothyronine (Ciolek et coll., 1989). Chez les Rats ayant subi l'un ou l'autre traitement, les variations des activités enzymatiques sont comparables mais elles présentent des amplitudes différentes. Les valeurs des activités des enzymes de la β -oxydation peroxysomale notamment sont multipliées par dix sous l'action du clofibrate (Lazarow et de Duve, 1976) alors que cette induction est trois fois moins importante avec les hormones thyroïdiennes (Just et Hartl, 1983).

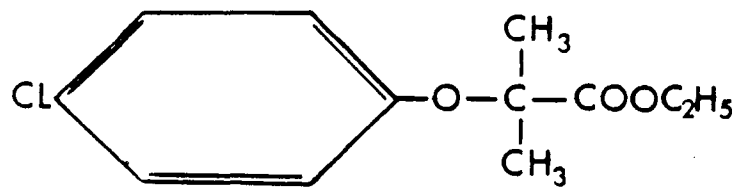
Chez le Rat ces effets ne se limitent pas au compartiment peroxisomal. Après traitement par le clofibrate ou par les hormones thyroïdiennes, des études ont montré une élévation de l'activité enzymatique de la glycerol 3 phosphate oxydase mitochondriale (Hess et coll., 1965), un accroissement du nombre des mitochondries (Kurupt et coll., 1970), une augmentation de la consommation en oxygène du tissu hépatique (Kähönen et coll., 1971), et une stimulation de la synthèse protéique (Platt et Thorp, 1966). La relation entre les effets du clofibrate chez un Rat traité et l'état thyroïdien de l'animal n'est pas clairement établie. Best et Duncan (1964) ont noté que le clofibrate agit sur le taux de cholestérol sanguin d'animaux thyroïdectomisés. Platt et Thorp (1966), Svoboda et Azarnoff (1969) affirment que l'effet du clofibrate est aboli chez des Rats sans thyroïde. Des résultats plus récents concernant la malate deshydrogénase ($NADP^+$) dont l'activité est induite par les hormones thyroïdiennes, ont montré qu'elle l'était également chez des Rats thyroïdectomisés et traités par le clofibrate (Lehotay et coll., 1987). Toutefois l'activité qui est détectée dans ces conditions est plus faible que celle mesurée chez des Rats traités par le clofibrate mais qui ont conservé leur thyroïde. Mackerer (1977) avait déjà souligné que certains effets du clofibrate étaient renforcés par la présence de thyroxine. Nos résultats concernant les têtards d'*Alytes* traités par le clofibrate sont à ce titre intéressants car ces animaux constituent en prémétamorphose un modèle biologique an hormonal. Aucune prolifération des peroxysomes hépatiques ni aucune induction enzymatique n'ont été observées chez ces larves. La présence de récepteurs aux hormones thyroïdiennes, à ce stade, a cependant été démontrée par Yaoita et Brown (1990) chez la larve du Xénope.

Cette comparaison des effets du clofibrate et des hormones thyroïdiennes sur les peroxysomes laisse supposer pour ces deux molécules un mécanisme d'action qui soit

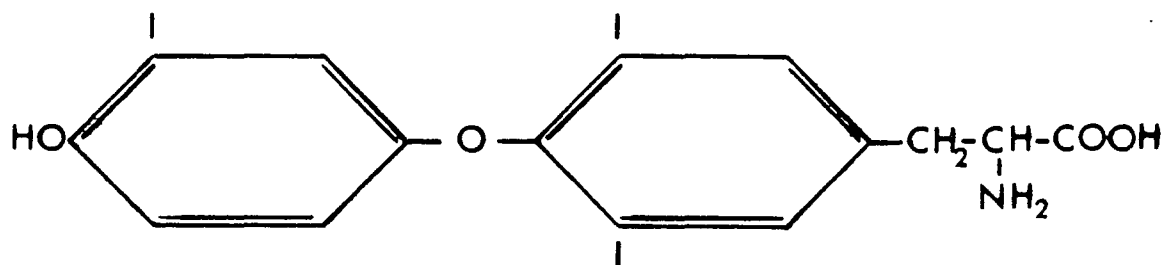
assez comparable. Des résultats, anciens (Platt et Thorp, 1966) mais qui ont été confirmés depuis (Lehotay, 1984) ont mis en évidence une interaction particulière entre ces deux substances. L'hormone thyroïdienne est en effet déplacée de la protéine plasmatique assurant son transport dès que le clofibrate est présent. La fraction hormonale libre augmente alors, entraînant ainsi le déclenchement des modifications dans les hépatocytes. Les proliférateurs peroxysomaux sont généralement des acides carboxyliques amphiphatiques. Il a été montré que la région carboxylique est indispensable à leur action inductrice (Baumgart et coll., 1990). Or le clofibrate et la T₃ appartiennent tous deux à la classe des acides arylcarboxyliques (Goudonnet et coll., 1990) (Fig. 24). Ces similitudes dans la structure chimique des deux molécules permettent sans doute de fournir un premier support pour expliquer la dualité des effets du clofibrate et de la triiodothyronine sur les peroxysomes.

Un élément nouveau dans la comparaison des effets du clofibrate et de la T₃ est apporté par Issemann et Green (1990) qui ont cloné et séquencé un récepteur aux substances inductrices de la prolifération des peroxysomes. Ce récepteur présente des caractéristiques communes à plusieurs autres types de récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs aux hormones thyroïdiennes et stéroïdes. Tous les membres de cette superfamille ainsi que ce nouveau récepteur, mis en évidence chez la Souris, présentent une très forte homologie dans la séquence des acides aminés de la région de la molécule responsable de sa fixation à l'ADN nucléaire. Ce récepteur qui s'exprime chez la Souris surtout dans le foie, le rein et le coeur, est activé spécifiquement par plusieurs substances inductrices des peroxysomes dont le nafénopine et l'acide clofibrique. La thyroxine et la triiodothyronine semblent n'avoir aucun effet sur son activation. Lalwani et coll. (1983, 1987) avaient déjà mis en évidence un récepteur à la nafenopine dans le foie de Rat dont les caractéristiques et notamment la spécificité vis à vis des substances inductrices sont différentes de celles observées par Issemann et Green (1990) chez la Souris.

Les proliférateurs de peroxysomes agissent rapidement sur la transcription génique ce qui induit notamment une amplification de l'activité des enzymes de la β -oxydation peroxysomale (Reddy et coll., 1986). L'injection de T₃ aboutit au même résultat avec toutefois une amplitude plus faible. Cette réponse aux proliférateurs peroxysomaux ou à la T₃ est associée à la présence de récepteurs cytoplasmiques distincts mais qui présentent des similitudes de structure. L'existence de tels récepteurs aux proliférateurs des peroxysomes est un argument supplémentaire qui laisse supposer que les hormones thyroïdiennes ainsi que ces substances prolifératrices présentent des mécanismes d'action moléculaires au niveau génique qui sont comparables mais pas strictement identiques. Les protéines nucléaires qui contribuent à la fixation de ces récepteurs sur l'ADN diffèrent sans doute d'un proliférateur peroxysomal à l'autre.



A



B

figure 24

Comparaison de la structure du clofibrate (A) et de la 3,3',5 triiodo-L-thyronine (B).

CONCLUSION

Ce travail nous a permis de montrer que les Amphibiens Anoures possèdent dès le stade prémétamorphose et pendant toute la métamorphose des peroxysomes hépatiques produisant de l'eau oxygénée que dégrade la catalase.

L'emploi d'une technique cytochimique révélant *in situ* l'activité de la catalase a démontré que ces organites étaient bien plus nombreux dans les hépatocytes d'*Alytes obstetricans* que dans ceux de *Xenopus laevis*. L'activité de cette enzyme chez l'Alyte va en augmentant des stades larvaires à ceux adultes alors que l'inverse est observé chez le Xénope. Le dosage des activités enzymatiques de plusieurs oxydases peroxysomales a révélé d'autres différences entre le comportement des peroxysomes hépatiques d'Amphibiens dont la métamorphose s'accompagne d'un changement d'habitat comme l'Alyte et ceux des espèces qui demeurent aquatiques après métamorphose comme c'est le cas pour le Xénope. Il s'établit ainsi une relation étroite entre ce changement d'habitat chez les Amphibiens et la participation active des peroxysomes hépatiques au métabolisme cellulaire.

Le traitement des larves d'Anoures par la triiodothyronine nous a permis de préciser le rôle que pouvait jouer cette hormone sur les peroxysomes hépatiques ainsi que sur les enzymes qu'ils renferment. En effet les larves d'*Alytes obstetricans* traitées par le propylthiouracyl, agent antithyroïdien qui empêche toute production d'hormones endogènes, représentent des systèmes biologiques quasiment anhormonaux sur lesquels on peut faire agir directement la T₃ exogène et en observer les effets. Les peroxysomes

hépatiques d'*Alytes* réagissent à ce traitement hormonal puisque l'on a constaté au cours de cette étude, une variation de leur taille qui va en diminuant ainsi qu'une augmentation des activités enzymatiques de la catalase et de la DAAOxase. Il existe donc un contrôle des hormones thyroïdiennes sur les peroxysomes hépatiques et leur contenu.

La stimulation des mitochondries comme réponse finale à l'action des hormones thyroïdiennes est bien établie chez les Mammifères (Sestoft, 1980). Elle engendre plusieurs processus métaboliques dont l'oxydation des acides gras, une consommation d'oxygène et une production de chaleur. Le comportement des peroxysomes tel qu'il a été décrit dans cette étude laisse supposer que ces organites participent également à ce métabolisme général chez les Amphibiens.

Les peroxysomes hépatiques de *Rana esculenta* adulte sont sensibles à l'action du clofibrate et prolifèrent. L'induction des enzymes peroxysomales, notamment celles concernant la β -oxydation, est franche après 10 jours de traitement par le clofibrate. Dans les mêmes conditions expérimentales, les peroxysomes du foie de *Xenopus laevis* restent rares alors qu'une élévation des activités enzymatiques peroxysomales a été constatée. La régulation de l'abondance des peroxysomes et de leur contenu enzymatique sous l'action du clofibrate est différente chez ces deux espèces d'Amphibiens Anoures. Son étude présente donc un intérêt pour la compréhension du mécanisme moléculaire qui rend compte de l'effet proliférateur du clofibrate.

Comme nous l'avons montré, la triiodothyronine et le clofibrate ont sur les peroxysomes hépatiques des effets convergents mais de moindre amplitude. Des résultats semblables ont été obtenus chez les Mammifères ce qui laisse supposer un mode d'action moléculaire assez semblable pour ces deux agents. Le fait que les deux molécules présentent des similitudes de structure, renforce cette hypothèse. La découverte récente dans le foie de Souris d'un récepteur aux proliférateurs de peroxysomes présentant des caractéristiques structurales semblables à celles du récepteur à la triiodothyronine, permettra sans doute d'élucider les mécanismes moléculaires d'action précis de ces substances sur les peroxysomes.

En ce qui concerne les Amphibiens, la mise en oeuvre d'anticorps antiperoxysomes spécifiques permettra d'approfondir l'expression des enzymes peroxysomales au cours de la métamorphose naturelle ou induite par la T₃. La recherche d'un récepteur au clofibrate dans le foie des Amphibiens peut également être envisagée et ouvre de nouvelles perspectives. La comparaison de sa structure avec celle du récepteur présent chez la Souris fournira des éléments intéressants concernant l'évolution de ces complexes biologiques des Vertébrés inférieurs aux Vertébrés supérieurs.

BIBLIOGRAPHIE

- Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S.G., Richmond, W. and Fu, P.C. (1974) - Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **20**, 470-475.
- Angermüller, S., Bruder, G., Völkl, A., Wesch, and Fahimi, H.D. (1987) - Localization of xanthine oxidase in cristalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *Eur. J. Cell. Biol.* **45**, 137-144.
- Atkinson, B.G. (1971) - Patterns of macromolecular biosynthesis during amphibian metamorphosis. *In* : Relationships of endocrines to growth and development, Ed. Breitenbach R.P. and Kenney A.D.
- Barja de Quiroga, G., Gil, P. and Alonso-Bedate, M. (1985) - Catalase enzymatic activity and electrophoretic patterns in adult amphibians. A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol.* **80B**, 853-858.
- Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R., Jacques, P. and De Duve, C. (1964) - Intracellular distribution of monoamine oxidase as partate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue. *Biochem. J.* **92**, 179-184.
- Baumgart, E., Völkl, A., Pill, J. and Fahimi, H.D. (1990) - Proliferation of peroxisomes without simultaneous induction of the peroxisomal fatty acid β -oxidation. *FEBS* **264**, 5-9.
- Beevers, H. (1969) - Glyoxysome of castor bean endosperm and their relation to gluconeogenesis. *Ann. Acad. Sci. New York* **168**, 313-324.

- Berchtold, J.P. (1975) - Observations on peroxisomes in interrenal (adrenocortical) cells of *Triturus cristatus* and *Salamandra salamandra* (Urolèle Amphibians). *Cell. Tissue Res.* **162**, 349-356.
- Best, M. and Duncan, C. (1964) - Hypolipemia and hepatomegaly from ethyl chlorophenoxy isobutyrate (CPIB) in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* **64**, 634.
- Bradford, M.M. (1976) - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brucker, R.F. and Cohen, P.P. (1976) - Alterations in enzyme and cytochrome profiles of *Rana catesbeiana* liver organelles during thyroxine-induced metamorphosis. Changes in membrane-localized phosphohydrolases, oxidoreductases and cytochrome levels in response to *in vivo* thyroxine administration. *J. Biol. Chem.* **251**, 6161-6169.
- Burnette, W.N. (1981) - "Western Blotting" : electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Calvert, R. and Menard, D. (1978) - Cytochemical and biochemical studies on the differentiation of microperoxisomes in the small intestine of the fetal mouse. *Dev. Biol.* **65**, 342-352.
- Casteels, M., Schepers, L., Parmentier, G., Eyssen, H.J. and Mannaerts, G.P. (1989) - Activation and peroxisomal β -oxidation of fatty acids and bile acid in intermediates in liver from *Bombina orientalis* and from the rat. *Comp. Biochem. Physiol.* **92B**, 129-132.
- Ciolek, E., Vamecq, J., Van Hoof, F., Dauça, M. et Bautz, A. (1989) - Developmental patterns of peroxisomal enzymes in Amphibian liver during spontaneous and triiodothyronine-induced metamorphosis. *Comp. Biochem. Physiol.* **93B**, 477-484.
- Cohen, P.P. (1970) - Biochemical differentiation during amphibian metamorphosis. *Science* **168**, 533-543.

- Cohen, P.P., Brucker, R.F. and Morris, S.M. (1978) - Cellular and molecular aspects of thyroid hormone action during amphibian metamorphosis. *In* : Hormonal proteins and peptides. Li, H. Ed, Academic Press New York, Vol. 6, pp. 273-381.
- Dauça, M., Calvert, R., Menard, D., Hugon, J.S. and Hourdry, J. (1982) - Development of peroxisomes in Amphibians. I. Cytochemical and biochemical studies in the small intestine. *J. exp. Zool.* **220**, 235-241.
- Dauça, M., Calvert, R., Menard, D., Hugon, J.S. and Hourdry, J. (1982) - Development of peroxisomes in Amphibian. II. Cytochemical and biochemical studies on the liver, Kidney and pancreas. *J. exp. Zool.* **223**, 57-65.
- Dauça, M., Calvert, R., Menard, D., Hugon, J.S. and Hourdry, J. (1983) - Development of peroxisomes in Amphibians. III. Study on liver, kidney and intestine during thyroxine-induced metamorphosis. *J. exp. Zool.* **227**, 413-422.
- David, H. (1980) - Morphometric analysis of peroxisomes in the liver cells of male rats during postnatal development. *Expert. Pathol.* **18**, 321-328.
- Davis, W.L., Jones, R.G. and Goodman, D.B.P. (1986) - Cytochemical localization of malate synthase in Amphibian fat body adipocytes : possible glyoxylate cycle in a vertebrate. *J. Histochem. Cytochem.* **34**, 689-692.
- Davis, W.L., Mathhews, J.L., Farmer, G.R., Martin, J.H., Jones, R.G. and Goodman, D.B.P. (1988) - Cytochemistry and biochemistry of the glyoxylate cycle (GC) in avian liver : the effect of cholecalciferol. *J. Histochem. Cytochem.* **36**, 855-
- Dreyer, C. and Hauser, P. (1983) - Two-dimensional gel analysis of the fate of oocyte nuclear proteins in the development of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **100**, 412-425.
- De Duve, C. (1965) - Functions of microbodies (peroxisomes). *J. Cell. Biol.* **27**, 25-26.
- De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelman, F. (1955) - Tissue fractionation studies - 6-intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.* **60**, 604-617.

- De Duve, C. and Baudhuin, P. (1966) - Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* **46**, 323-357.
- Dvorak, M. and Mazanec, K. (1967) - Differenzierung der Feinstruktur der Leberzelle in der frühen postnatalen periode. *Z. Zellforschung* **80**, 370-384.
- Dwivedi, R.S., Alvares, K., Nemali, M.R., Subbarao, V., Reddy, M.K., Usman, M.I., Rademaker, A.W., Reddy, J.K. and Rao, M.S. (1989) - Comparison of the peroxisome proliferator-induced pleiotropic response in the liver of nine strains of mice. *Toxicol. Pathol.* **17**, 16-26.
- Essner, E. (1969) - Localization of peroxidase activity in microbodies of fetal mouse liver. *J. Histochem. Cytochem.* **17**, 454-466.
- Essner, E. (1970) - Observations on hepatic and renal peroxisomes (microbodies) in the developing chick. *J. Histochem. Cytochem.* **18**, 80-92.
- Dauça, M., Calvert, R., Menard, D., Hugon, J.S. and Hourdry, J. (1982) - Development of peroxisomes in Amphibian. II. Cytochemical and biochemical studies on the liver, Kidney and pancreas. *J. exp. Zool.* **223**, 57-65.
- Flatmark, T., Christiansen, E.N. and Kryvi, H. (1981) - Polydispersity of rat liver peroxisomes induced by the hypolipidemic and carcinogenic agent clofibrate. *Eur. J. Cell. Biol.* **24**, 62-69.
- Fringes, B. and Reith, A. (1980) - The formation of microbodies under triiodothyronine influence in rat liver. *Eur. J. Cell. Biol.* **22**, 166, 1980.
- Fujiki, Y., Rachubinski, R.A. and Lazarow, P.B. (1984) - Synthesis of a major integral membranes polypeptide of rat liver peroxisomes on free polysomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7127-7131.
- Fujiwara, S., Ohashi, H. and Noguchi, T. (1987) - Comparison of intraperoxisomal localization form and properties of Amphibian (*Rana catesbeiana*) uricase with those of other animal uricases. *Comp. Biochem. Physiol.* **86**, 23-26.

- Fujiwara, S., Hayashi, S., Noguchi, T., Hanada, N. and Takehara, T. (1989) - Subcellular distribution of hepatic allantoinase varies among fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **93B**, 213-215.
- Furuta, N., Hayashi, H., Huikata, M., Miyazawa, S., Osumi, T. and Hashimoto, T. (1986) - Complete nucleotide sequence of cDNA and deduced aminoacid sequence of rat liver catalase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 313-317.
- Goeckermann, J.A. and Vigil, E.L. (1975) - Peroxisome development in the metanephric kidney of mouse. *J. Histochem. Cytochem.* **23**, 957-973.
- Goglia, F., Liverini, G., Lanni, A., Iossa, S. and Barletta, A. (1989) - Morphological and functional modifications of rat liver peroxisomal subpopulations during cold exposure. *Exp. Biol.* **48**, 127-133.
- Goglia, F., Liverini, G., Lanni, A., Iossa, S. and Barletta, A. (1989) - Effects of 3,5,3'-triiodothyronine (T₃) on rat liver peroxisomal compartment during cold exposure. *Exp. Biol.* **48**, 135-140.
- Goldfisher, S., Moore, C.L., Johnson, A.B., Spiro, A.J., Valsamis, M.P., Wisniewski, H.K., Norton, W.T., Rapin, I. and Gartner, L.M. (1973) - Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebrohepato renal syndrome. *Science*, **182**, 62-64
- Goldfisher, S.L. (1988) - Peroxisomal diseases. *The Liver Biology and Pathobiology*. Ed by I.M. Arias, W.B. Jakoby, H. Hopper, D. Schachter and D.A. Shafritz. Raven Press, NY.
- Goldman, B.M. and Blobel, S. (1978) - Biogenesis of peroxisomes : intracellular site of synthesis of catalase and uricase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5066-5070.
- Goodman, D.B.P., Davis, W.L. and Ruth, G.J. (1980) - Glyoxylate cycle in toad urinary bladder : possible stimulation by aldosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1521-1524.
- Gorgas, K. and Storch, V. (1984) - Marginal plates in hepatic peroxisomes of *Ichthyophis glutinosus* (Amphibia : Gymnophiona). A cytochemical study. *Cell. Tissue Res.* **238**, 413-416.

- Goudonnet, H., Magdalou, J., Mounie, J., Naoumi, A., Viriot, M.L., Escousse, A., Siest, G. and Truchot, R. (1990) - Differential action of thyroid hormones and chemically related compounds on the activity of UDP-glucuronosyltransferases and cytochrome P-450 isozyme in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **1035**, 12-19.
- Gudernatsch, J.F. (1912) - Feedings experiments on tadpoles I. The influence of specific organs given as food on growth and differentiation. A contribution to the knowledge of organs with internal secretion. *Arch. (Wilhelm Roux) Entwickl. Mech. Organ.* **35**, 457-483.
- Hajra, A.K. and Bishop, J.E. (1982) - Glycerolipid biosynthesis in peroxisomes *via* the acyl dehydroxyacetone phosphate pathway. *Am. Acad. Sci. NY* **386**, 170-182.
- Hawkins, J.H., Jones, W.E., Bonner, F.W. and Gibson, G.G. (1987) - The effect of peroxisome proliferators on microsomal peroxisomal and mitochondrial enzyme activities in the liver and kidney. *Drug. Metab. Rev.* **18**, 441-515.
- Hayashi, H., Suga, T. and Niinobe, S. (1975) - Studies on peroxisomes. V. Effect of ethyl-p-chlorophenoxyisobutyrate on the centrifugal behavior of rat liver peroxisomes. *J. Biochem.* **77**, 1199-1204.
- Hayashi, H., Fukui, K., Yamasaki, F. and Suga, T. (1984) - Peroxisomes in the liver of Frog *Bombina orientalis*. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 2346-2352.
- Hess, R., Stäubli, W. and Riess, W. (1965) - Nature of the hepatomegalic effect produce by ethyl-chlorophenoxyisobutyrate in the rat. *Nature* **208**, 856-858.
- Hoeprich, P.D. (1965) - Alanine : cycloserine antagonism. VI. demonstration of D-alanine in the serum of guinea pigs and mice. *J. Biol. Chem.* **240**, 1654-1660.
- Holmes, R.S. (1971) - Ontogeny of mouse liver peroxisomes and catalase isoenzymes. *Nature* **232**, 218-220.
- Holmes, R.S. and Duley, J.A. (1975) - Biochemical and genetic studies of peroxisomal multiple enzyme systems : α -hydroxyacid and catalase. *In* : Isozymes-I-Molecular structure, Markert C.L. Ed, Acad. Press, New York, pp 194-211.

- Hruban, Z. and Swift, H. (1964) - Uricase : localization in hepatic microbodies. *Sciences* **146**, 1316-1317.
- Hruban, Z., Swift, H. and Slesers. (1966) - Ultrastructural alterations of hepatic microbodies. *Lab. Invest.* **15**, 1884-1901.
- Hruban, Z. and Recheigl., M. (1969) - Microbodies and related particles. Morphology biochemistry and physiology. *Internat. Rev. Cytol.* **1**, 1-296.
- Hryb, D.J. (1981) - Peroxisomal respiration and energy conservation. *FEBS Letters* **128**, 1-4.
- Hughes, A.M. and Astwood, E.B. (1944) - Inhibition of metamorphosis in tadpoles by thiouracil. *Endocrinology* **34**, 138-139.
- Ishii, H., Fukumori, N., Horie, S. and Suga, T. (1980) - Effects of fat content in the diet on hepatic peroxisomes of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **617**, 1-11.
- Ishii, H., Ishii, S., Kazama, M. and Suga, T. (1983) - Peroxisomal fatty acyl-coA oxidation in chicken liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **226**, 484-491.
- Issemann, I. and Green, S. (1990) - Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**, 645-650.
- Jones, G.L. and Masters, C.J. (1975) - On the nature and characteristics of the multiple forms of catalase in mouse liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **169**, 7-21.
- Jones, R.G., Davis, W.L. and Goodman, D.B.P. (1981) - Microperoxisomes in the epithelial cells of the amphibian urinary bladder : an electron microscopic demonstration of catalase and malate synthase. *J. Histochem. Cytochem* **19**, 1150-1156.
- Just, W.W., Hartl, F.V. and Schimassek, M. (1982) - Rat liver peroxisomes. I. New peroxisome population induced by thyroid hormones in the liver of male rats. *Eur. J. Cell Biol.* **26**, 249-254.

- Just, W.W. and Hartl, F.V. (1983) - Rat liver peroxisomes. II. Stimulation of peroxisomal fatty acid β -oxidation by thyroid hormones. *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.* **364**, 1541-1547.
- Kähönen, M.T., Ylikahri, H. and Hassinen, I. (1971) - Ethanol metabolism in Rats treated with ethyl- α -p-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate). *Life Sci.* **10**, 661-670.
- Kärki, T., Hakkola, E., Hassinen, I.E. and Hitwen, J.K. (1987) - β -oxidation of polyunsaturated fatty acids in peroxisomes. Subcellular distribution of Δ_3 , Δ_2 enoylCoA isomerase activity in rat liver. *FEBS Letter*, **215**, 228-232, 1987.
- Kistler, A., Yoshizato, K. and Frieden, E. (1977) - Preferential binding of tri-substituted thyronine analogs by bullfrog tadpole fin cytosol. *Endocrinology* **100**, 134-137.
- Konno, R., Niwa, A. and Yasumura, Y. (1990) - Intestinal bacterial origin of D-alanine in urine of mutant mice lacking D-amino-acid oxidase. *Biochem. J.* **268**, 263-265.
- Krahling, J.B., Gee, R., Gauger, J.A. and Tolbert, N.E. (1979) - Post-natal development of peroxisomal and mitochondrial enzymes in rat liver. *J. Cell. Physiol.* **101**, 375-390.
- Kurupt, C.K.R., Aithal, H.M. and Ramasarma, T. (1970) - Increase in hepatic mitochondria on administration of ethyl- α -chlorophenoxy-isobutyrate to the rat. *Biochem. J.* **116**, 773-779.
- Laemmli, U.K. (1970) - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lalwani, N.D., Fahl, W.E. et redy, J.K. (1983) - Detection of a nafenopin-binding protein in rat liver cytosol associated with the induction of peroxisome proliferation by hypolipidemic compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**, 388-393.
- Lalwani, N.D., Alvares, K., Reddy, M.K., Reddy, M.N., Parikh, I. and Reddy, J.K. (1987) - Peroxisomal proliferator-binding protein : identification and partial characterization of nafenopin clofibric acid and ciprofibrate-binding proteins from rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5242-5246.

- Lazarow, P.B. and De Duve, C. (1976) - A fatty acyl-coA oxidizing system in rat liver peroxisomes : enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2043-2046.
- Lazarow, P.B., Robbi, M., Fujiki, Y. and Wong, L. (1982) - Biogenesis of peroxisomal proteins *in vivo* and *in vitro*. *Ann. Acad. Sci NY* **386**, 285-300.
- Lazarow, P.B., Shio, H. and Leroy-Houyet, M.A. (1982) - Specificity in the action of hypolipidemic drugs : increase of peroxisomal β -oxidation largely dissociated from hepatomegaly and peroxisome proliferation in rat. *J. Lipid Res.* **23**, 317-326.
- Lazarow, P.B. and Fujiki, Y. (1985) - Biogenesis of peroxisomes. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **1**, 489-530.
- Lehotay, D.C., Paul, H.S., Adibi, S.A. and Levey, G.S. (1984) - Influence of clofibrate on thyroid hormone and muscle protein turnover. *Metabolism* **33**, 1048-1051.
- Lehotay, D.C., Gindler, J.S. and Paul, M.S. (1987) - Effects of clofibrate on malic enzyme and phosphodiesterase activities. *Horm. Metabol. Res.* **19**, 591-674.
- Leskes, A., Siekevitz, P. and Palade, G.E. (1971) - Differentiation of endoplasmic reticulum in hepatocytes. I. Glucose-6-phosphatase distribution in situ. *J. Cell. Biol.*, **49**, 264-287.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, R.J. (1951) - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Mackerer, C.R. (1977) - Effect of clofibrate administration on several biochemical parameters of normal and thyroidectomized rats. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 301-306.
- Mainferme, F. and Wattiaux, R. (1982) - Effect of lysosomes on rat-liver catalase. *Eur. J. Biochem.* **127**, 343-346.
- Malki, M.C., Bardot, O., Lhuguenot, J.C. and Latruffe, N. (1990) - Expression of liver peroxisomal proteins as compared to other organelle marker enzymes in rats treated with hypolipidemic agents. *Biol. Cell.* **69**, 83-92.

- Masters, C.J. (1982) - On the turnover and multiplicity of peroxisomal catalases. *Ann. Acad. Sci. NY* **386**, 301-313.
- Masters, C.J. and Holmes, R.S. (1977) - The metabolic roles of peroxisomes in mammalian tissues. *Int. J. Biochem.* **8**, 549-553.
- Miles, J.L. and Holmes, R.S. (1975) - The ontogeny of L- α -hydroxyacid oxidase isozymes in the mouse. *J. exp. Zool.* **192**, 119-125.
- Millonig, G. (1961) - Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation. *J. Appl. Phys.* **32**, 1637.
- Moody, D.E. and Reddy, J.K. (1978) - The hepatic effects of hypolipidemic drugs (clofibrate, nafenopin, tibric acid and WY-14, 643) on hepatic peroxisome and peroxisome associated enzymes. *Am. J. Pathol.* **90**, 435-446.
- Morrissey, J.H. (1981) - Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : a modified procedure with enhanced sensitivity. *Anal. Biochem.* **117**, 307-310.
- Nieuwkoop, P.D. and Faber, J. (1956) - Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North Holland Publ. Co, Amsterdam.
- Noguchi, T., Fujiwara, S. and Hayashi, S. (1986) - Evolution of allantoïnase and allantoïcase involved in urate degradation in liver peroxisome. *J. Biol. Chem.* **261**, 4221-4223.
- Novikoff, A.B. and Shin, W.Y. (1964) - The endoplasmic reticulum in the golgi zone and its relations to microbodies, golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *J. Microscopie* **3**, 187-206.
- Novikoff, A.B. and Golfisher, S. (1969) - Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *J. Histochem. Cytochem.* **17**, 675-680.
- Novikoff, A.B., Novikoff, P.M., Davis, C., Quintana (1972) - Studies on microperoxisomes. II. A cytochemical method for light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **20**, 1006-1023.

- O'Farrell, P.H. (1975) - High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
- Osumi, T. and Hashimoto, T. (1978) - Acyl-coA oxidase of rat liver : a new enzyme for fatty acid oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**, 479-485, 1978.
- Patton, G.W. and Nishimura, E.T. (1967) - Developmental changes of hepatic catalase in the rat. *Cancer Res.* **27**, 117-123.
- Pedersen, J.I. and Gustafsson, J. (1980) - Conversion of 3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy 5 β -cholestanoic acid into cholic acid by rat liver peroxisomes. *FEBS Lett.* **121**, 345-348.
- Picheral, B. (1972) - Les tissus élaborateurs d'hormones stéroïdes chez les Urodèles. V. Mise en évidence et localisation cytochimique d'une activité de type peroxydasique endogène dans la cellule du tissu glandulaire du testicule de *Pleurodeles waltlii*. Comparaison avec d'autres types cellulaires. *J. Microsc.* **13**, 247-262.
- Pipan, N. and Psenicnik, M. (1975) - The development of microperoxisomes in the cells of the proximal tubules of the kidney and epithelium of the small intestine during the embryonic development and postnatal period. *Histochemistry* **44**, 13-21.
- Platt, D.S. and Thorp, J.M. (1966) - Changes in the weight and composition of the liver in the rat, dog and monkey treated with ethyl chlorophenoxyisobutyrate. *Biochem. Pharmacol.* **15**, 915-925.
- Reddy, J.K., Moody, D.E., Azarnoff, D.L. and Rao, M.S. (1976) - Di-(2-ethylhexyl)phthalate : an industrial plasticiser induces hypolipidaemia and enhances hepatic catalase and carnitine acetyltransferase activities in rats and mice. *Life Sci.* **18**, 941-946.
- Reddy, J.K. and Kumar, N.S. (1979) - The peroxisome proliferation associated polypeptide in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**, 824-829.
- Reddy, M.K., Hollenberg, P.F. and Reddy, J.K. (1980) - Partial purification and immunoreactivity of an 80,000 molecular weight polypeptide associated with peroxisome proliferation in rat liver. *Biochem. J.* **188**, 731-740.

- Reddy, J.K., Lalwani, N.D., Dabholkar, A.S., Reddy, M.K. and Qureshi, S.A. (1981) - Increased peroxisomal activity in the liver of vitamin E deficient rats. *Biochem. Int.* **3**, 41-49.
- Reddy, M.K., Qureshi, S.A., Hollenberg, P.F. and Reddy, J.K. (1981) - Immunochemical identity of peroxisomal enoyl-coA hydratase with the peroxisome-proliferation associated 80,000 molecular weight polypeptide in rat liver. *J. Cell. Biol.* **89**, 406-417.
- Reddy, J.K., Goel, S.K., Nemali, M.R., Larrino, J.J., Laffler, T.G., Reddy, M.K., Sperbeck, S.J., Osumi, T., Hashimoto, T., Lalwani, N.D. and Rao, M.S. (1986) - Transcriptional regulation of peroxisomal fatty acyl-coA oxidase and enoyl-coA hydratase/3-hydroxyacyl-coA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1747-1751.
- Rhodin, J. (1954) - Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Thèse de Doctorat, Institut Karolinska, Stockholm : Aktiebolaget Godvil.
- Reynolds, E.G. (1963) - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **17**, 208-213.
- Roels, F., Schiller, B. and Goldfisher, S. (1970) - Microbodies (peroxisomes) in the toad, *Bufo marinus*. A cytochemical study. *Z. Zellforsch. mikr. Anat.* **108**, 135-149.
- Rohr, H.P., Strebel, J. and Bianchi, L. (1970) - Ultrastrukturell-morphometrische Untersuchungen an der Rattenleberparenchymzelle in der Frühphase der Regeneration nach partieller Hepatektomie. *Beitr. Pathol.* **141**, 52-74.
- Rouiller, C. and Bernhard, W. (1956) - "Microbodies" and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 355-359.
- Ruegamer, W.R., Ryan, N.T., Richert, D.A. and Westerfeld, W.W. (1969) - The effects of p-chlorophenoxyisobutyrate on the turnover rate and distribution of thyroid hormone in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **18**, 613-624.

- Santos, M.J., Imanaka, T., Shio, H. and Lazarow, P.B. (1988) - Peroxisomal integral membrane proteins in control and Zellweger fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **263**, 10502-10509.
- Scott, P.J., Visentin, L.P., Allen, J.M. (1969) - The enzymatic characteristics of peroxisomes of amphibian and avian liver and kidney. *Ann. Acad. Sci. NY* **168**, 244-264.
- Sestoft, L. (1980) - Metabolic aspects of the calorogenic effect of thyroid hormone in mammals. *Clin. Endocrinol.* **13**, 489-506.
- Singal, P.W. and Sanders, E.J. (1974) - Cytomembranes in first cleavage *Xenopus* embryos. Interrelationship between golgi bodies, endoplasmic reticulum and lipid droplets. *Cell. Tissue Res.* **154**, 189-209.
- Singh, H., Derwas, N. and Poulos, A. (1987) - β -oxidation of very-long-chain fatty acids and their coenzyme A derivatives by human skin fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **354**, 526-533.
- Spornitz, U.M. (1975) - Studies on the liver of *Xenopus laevis*. I. The ultrastructure of the parenchymal cell. *Anat. Embryol.* **146**, 245-264.
- Stephens, R.J. and Bils, R.F. (1967) - Ultrastructural changes in the developing chick liver. *J. Ultrastruct. Res.* **18**, 456-474.
- Svoboda, D., Azarnoff, D. and Reddy, J.K. (1969) - Microbodies in experimentally altered cells. II. The relationship of microbody proliferation to endocrine glands. *J. Cell. Biol.* **40**, 734-746.
- Takada, Y. and Noguchi, T. (1983) - The degradation of urate in liver peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **258**, 4762-4764.
- Tata, J.R. (1967) - The formation, distribution and function of ribosomes and microsomal membranes during induced amphibian metamorphosis. *Biochem. J.* **105**, 783-801.
- Taylor, A.C. and Kollros, J.J. (1946) - Stages in normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat. Rec.* **24**, 7-23.

- Tolbert, N.E. and Essner, E. (1981) - Microbodies : peroxisomes and glyoxysomes. *J. Cell. Biol.* **91**, 271-283.
- Towbin, H., Staehelin, R. and Gordon, J. (1979) - Electrophoretic transfert of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Trandaburu, T. (1980) - Microperoxisomes and catalase peroxidatic activity in the pancreas of two amphibian species (*Salamandra salamandra* L and *Rana esculenta* L). *Acta Histochem.* **66**, 135-145.
- Tsukada, H., Mochizuki, Y. and Konishi, T. (1968) - Morphogenesis and development of microbodies of hepatocytes of rats during pre- and postnatal growth. *J. Cell. Biol.* **37**, 231-243.
- Usuda, N., Yokota, S., Hashimoto, T. and Nagata, T. (1986) - Immunocytochemical localisation of D-amino acid oxidase in the central clear matrix of rat kidney peroxisomes. *J. Histochem. Cytochem.* **34**, 1709-1718.
- Vamecq, J. and Draye, J.P. (1987) - Interaction between the ω and the β -oxidation of fatty acids. *J. Biochem. (Tokyo)*, **102**, 225-234, 1987.
- Vamecq, J. and Draye, J.P. (1989) - Pathophysiology of peroxisomal β -oxidation. *Essays in Biochemistry* **24**, 115-225.
- Van Hoof, F., Hue, L., Vamecq, J. and Sherratt, H.S.A. (1985) - Protection of rats by clofibrate against the hypoglycaemic and toxic effects of hypoglycin and pent-4-enoate. An ultrastructural and biochemical study. *Biochem. J.* **229**, 387-397.
- Visentin, L. and Allen, J. (1969) - Allantoïnase : association with amphibian hepatic peroxisomes. *Science* **163**, 1463-1464.
- Völkl, A. and Fahimi, H.D. (1985) - Isolation and characterization of peroxisomes from the liver of normal untreated rats. *Eur. J. Biochem.* **149**, 257-265.
- Walumsimbi-Kisiku, M. and Harrison, E.H. (1983) - Fluorometric assay for rat liver peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase activity. *J. Lipid. Res.* **24**, 1077-1084.

White, A., Handler, P. and Smith, E.L. (1973) - Principles of Biochemistry. Mc-Graw-Hill, New York.

Yaoita, Y. and Brown, D.D. (1990) - A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Genes and Development*, **4**, 1917-1924.

ANNEXE I

Developmental patterns of peroxisomal enzymes in Amphibian liver during spontaneous and triiodothyronine-induced metamorphosis.

Comp. Biochem. Physiol. **93**, 477-484, 1989

DEVELOPMENTAL PATTERNS OF PEROXISOMAL ENZYMES IN AMPHIBIAN LIVER DURING SPONTANEOUS AND TRIIODOTHYRONINE-INDUCED METAMORPHOSIS

E. CIOLEK,*† J. VAMECQ,‡ F. VAN HOOF,‡ M. DAUÇA,† and A. BAUTZ†

†Laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement, Faculté des Sciences, Université de Nancy I, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France; and ‡Laboratoire de Chimie Physiologique, ICP, Université de Louvain, 75, Avenue Hippocrate, BP 1200, Bruxelles, Belgique

(Received 5 October 1988)

Abstract—1. Liver catalase, D-amino acid oxidase, urate oxidase of *Alytes obstetricans* and *Xenopus laevis* (anuran amphibians) and fatty acyl-CoA oxidase of *Alytes* were present at all post-embryonic stages.

2. Catalase and D-amino acid oxidase activities increased during spontaneous metamorphosis of the two species.

3. During triiodothyronine-induced metamorphosis of *Alytes* larvae, catalase and D-amino acid oxidase activities increased after a latent period.

4. Our results suggest that expression of some hepatic peroxisomal enzymes is modulated by thyroid hormones.

INTRODUCTION

Peroxisomes have been described in a wide variety of animal tissues including the liver of amphibians (for review, see Böck *et al.*, 1980). These organelles are characterized biochemically by the presence of H_2O_2 -generating oxidases and an H_2O_2 -destroying catalase. The morphogenesis and enzyme equipment of hepatic peroxisomes have been studied during the development of avians (Stephens and Bills, 1967; Essner, 1970) and mammals (Tsukada *et al.*, 1968; Rohr *et al.*, 1971; Holmes, 1971; Stefanini, 1985). On the other hand, information concerning the developmental patterns of hepatic peroxisomal enzymes in amphibians is remarkably limited. We have reported that during spontaneous and thyroid hormone-induced metamorphosis of *Rana catesbeiana* tadpoles, the number, size and catalase activity of liver peroxisomes increase (Dauça *et al.*, 1982b, 1983). We have also emphasized that no change in catalase activity is detected in the liver during the entire development of *Xenopus laevis* which remains aquatic and ammonotelic after metamorphosis (Dauça *et al.*, 1983).

It is now clear that thyroid hormones (TH) have a significant impact in modulating amphibian liver organelles function and biogenesis. TH-induced changes in tadpole liver organelles described to date include an apparent proliferation of endoplasmic reticulum, a marked morphological alteration of both mitochondria and endoplasmic reticulum (Tata, 1967; Cohen, 1970; Atkinson, 1971), an increase in mitochondrial and microsomal protein mass (Brucker and Cohen, 1976), a differential alteration in membrane cytochrome composition of amphibian

liver mitochondria (Brucker and Cohen, 1976), an increased content of carbamyl phosphate synthetase I in the mitochondrial matrix volume (Cohen, 1970), an enhancement in the rate of incorporation of isotopically labeled precursors into mitochondrial DNA (Campbell *et al.*, 1969; Atkinson, 1971; Atkinson *et al.*, 1972), phospholipids and protein (Tata, 1967). However, the effect of TH on oxidases of amphibian liver peroxisomes has not as yet been investigated. Therefore, the aim of the present study has been to investigate the changes occurring in the activities of peroxisomal enzymes during amphibian spontaneous and triiodothyronine (T_3)-induced metamorphosis in order to define the effect of T_3 , a more potent hormone than thyroxine (Kistler *et al.*, 1977) on the enzyme profiles of peroxisomes.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were carried out on two anuran amphibian species: *Xenopus laevis* and *Alytes obstetricans*.

Xenopus adults were purchased from SEREA-CNRS (Argenton l'Eglise, France). Embryos were obtained by injecting adult pairs of *Xenopus laevis* with chorionic gonadotrophin (I.S.H. Labs, Paris, France) as described by Singal and Sanders (1974). Tadpoles were fed with boiled spinach and staged according to the standard criteria of Nieuwkoop and Faber (1956).

Alytes obstetricans larvae were collected from ponds of the Montpellier area (South of France). They were fed *ad libitum* with boiled salad. Their developmental stages were determined according to Taylor and Kollros (1946). In order to prevent the release of endogenous thyroid hormones, premetamorphic larvae were maintained at 15°C in tap water containing 0.58 mM propylthiouracyl (Sigma, Saint-Louis, USA). The solution was changed every week. This treatment arrested development at the premetamorphic stage but did not inhibit growth, so that at the time of use which was always at least one month in propylthiouracyl,

*Author to whom correspondence should be addressed.

the resulting thyrostatic tadpoles were considerably larger than normal animals at the same developmental stage (Hughes and Astwood, 1944).

Spontaneous and triiodothyronine-induced metamorphosis

For *Xenopus* as well as *Alytes* tadpoles, onset of spontaneous metamorphosis was obtained by transferring larvae in tap water at $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. In induced metamorphosis, thyrostatic tadpoles of *Alytes obstetricans* were selected at stages X–XII and immersed in a propylthiouracil solution enriched with 5 nM of 3,3',5' triiodo-L-thyronine (T_3 ; Sigma Chemical Co, Saint-Louis, USA) at room temperature. The solution was changed daily during the 17 days of hormonal treatment. Controls were kept into propylthiouracil solution.

Tissue preparation

Liver was removed and prepared as described in Dauça *et al.* (1982b, 1983). It was then blotted dry and weighed. Hepatic tissues were homogenized in 11.5 vol of ice-cold bidistilled water with a glass-Teflon homogenizer, at 4°C . After homogenization, aliquots were taken for protein assays according to Lowry *et al.* (1951). Triton X-100 was added to the homogenates to a final concentration of 1% as previously reported (Calvert and Menard, 1978; Dauça *et al.* 1982a,b, 1983) in order to release the enzymes.

Biochemical methods

The catalase (EC.1.11.1.6) activity was measured according to the method of Baudhuin *et al.* (1964). Briefly, this enzyme was assayed spectrophotometrically at 20°C by following the consumption of H_2O_2 at 400 nm. The preparations were incubated at 0°C for 0, 3 and 6 min in a total volume of 1060 μl containing: imidazole-HCl buffer, pH 7 (21.2 mM), bovine serum albumin 1% and hydrogen peroxide (263 mM). The reaction was stopped by the addition of 600 μl of a 0.125% (w/v) saturated solution of titanil sulphate (Touzart et Matignon, Paris, France) in 2N H_2SO_4 , and the remaining hydrogen peroxide was determined by the extinction at 400 nm of the yellow peroxytitanium sulphate. The initial hydrogen peroxide concentration was measured similarly on an unincubated mixture of the same composition. One unit of activity was defined as the amount of enzyme causing the destruction of 90% of the substrate in 1 min in a volume of 50 ml under the assay conditions. Catalase activity was expressed as "Baudhuin Units" per min and per g tissue (total activity) or per mg protein (specific activity).

D-amino acid oxidase (EC.1.4.3.3), urate oxidase (EC.1.7.3.3) and fatty acyl-CoA oxidase (FAO) activities were assayed by measurement with specific substrates of the

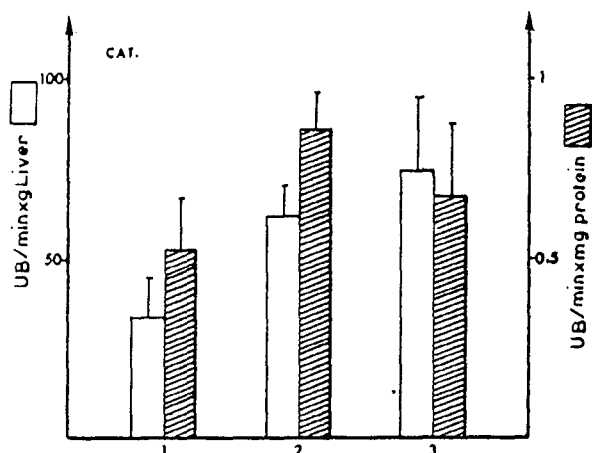


Fig. 1. Catalase activity in liver of *A. obstetricans* during spontaneous metamorphosis. 1, premetamorphosis; 2, prometamorphosis; 3, post-climax.

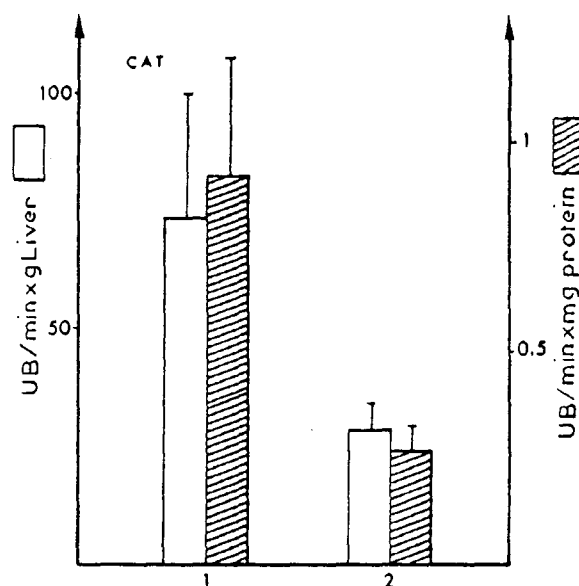


Fig. 2. Catalase activity in liver of *X. laevis* during spontaneous metamorphosis. 1, premetamorphosis; 2, adult.

dependent H_2O_2 production by the method of Allain *et al.* (1974). The reaction mixture contained, in a total volume of 1 ml, the following constituents: 50 mM potassium phosphate (pH 8), 0.082 mM 4-aminoantipyrine (Prolabo, Paris, France), 1.06 mM phenol (Merck, Darmstadt, RFA) 0.01 mM FAD for D-amino acid oxidase and FAO, or 0.01 mM FMN for urate oxidase (FAD and FMN were purchased from Boehringer, Mannheim, RFA), 0.8 IU of horse radish peroxidase (Sigma chemical Co, Saint-Louis, USA) and the homogenate at a final dilution of 1/500. The reaction was carried out at 20°C by adding the appropriate substrate: 50 mM D-proline for D-amino acid oxidase, 0.1 mM uric acid for urate oxidase and 0.5 mM lauroyl CoA for FAO. Substrates were purchased from Sigma Co. The formation of H_2O_2 was measured by following the increase in absorbance at 500 nm. A molar extinction coefficient of $48 \times 10^3 \text{ mol/ml/cm}$ was used. Oxidase activities were expressed as milliunits, i.e., nmol per min and per g tissue (total activity) or mg protein (specific activity).

RESULTS

Spontaneous metamorphosis

Three stages were selected during the spontaneous post-embryonic development of *Alytes obstetricans*: premetamorphosis (stages X–XII), late prometamorphosis-onset of climax (stages XVIII–XX) and post-climax (stage XXV). In *Xenopus laevis*, prometamorphic tadpoles (stage 55) and young adults (2 years old) were used.

Developmental patterns of catalase activity

The developmental patterns of catalase activity in liver of *Alytes obstetricans* and *Xenopus laevis* are illustrated in Figs 1 and 2.

In *Alytes* tadpoles, total catalase activity increased in liver throughout metamorphosis (Fig. 1). In prometamorphic tadpoles, the total activity of liver catalase was at most 1.8 times that found in premetamorphic larvae. An increase of the same amplitude was noted in the specific activity of catalase from pre- to prometamorphosis. Thereafter, the specific activity slightly decreased up to post-climax while the total activity continued to increase. This discrepancy

Table 1. Liver protein content during spontaneous and T₃-induced metamorphosis

Stage of development or treatment	<i>Alytes obstetricans</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Spontaneous metamorphosis		
Tadpole (stages X–XII)	69 ± 8*	n.d.†
Tadpole (stages XVIII–XX)	74 ± 8	92 ± 8.7
Juvenile	125 ± 9.6	n.d.
Adult	n.d.	122 ± 32
T ₃ -induced metamorphosis (Days of treatment)		
Control	91 ± 12.6	
4 days	143 ± 22.3	
6 days	92 ± 22	
8 days	142 ± 18	
10 days	168 ± 16.2	
12 days	183 ± 23.7	
14 days	170 ± 15.5	
17 days	145 ± 21.5	

*Mean ± SEM of protein content expressed as mg protein/g liver.
†n.d.: not determined.

may be explained by the increase in liver protein content that occurred during spontaneous metamorphosis (Table 1) and that has been already reported by Atkinson (1971).

On the other hand, total and specific catalase activities in liver of prometamorphic *Xenopus* tadpoles was 2.6 and 3.4 fold higher than that determined in adults (Fig. 2).

Developmental patterns of oxidases

The total and specific activities of D-proline oxidase in liver of *Alytes obstetricans* tadpoles increased about 3.8 and 2 fold respectively during spontaneous metamorphosis (Fig. 3). In *Xenopus* adults, the total and specific activities of hepatic D-proline oxidase are 15.8 and 19.3 times higher than that detected in prometamorphic larvae (Fig. 4).

In metamorphosing *Alytes* tadpoles, significant variations were not detected in the total and specific activities of hepatic urate oxidase (Fig. 5). On the other hand, the total and specific activities of urate oxidase in liver of prometamorphic *Xenopus* tadpoles were respectively 2.3 and 1.8 times higher than that determined in adults (Fig. 6).

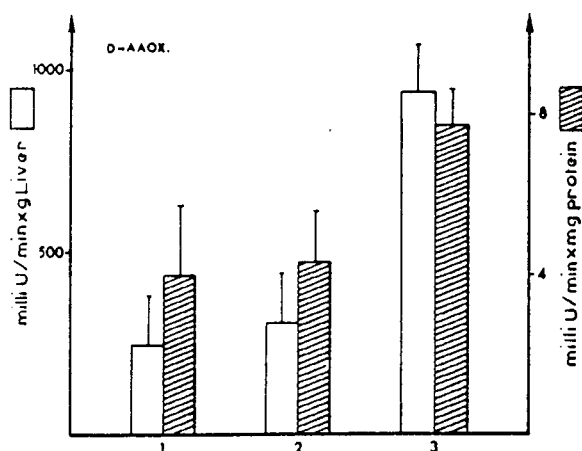


Fig. 3. D-amino acid oxidase activity in liver of *A. obstetricans* during spontaneous metamorphosis. 1, pre-metamorphosis; 2, prometamorphosis; 3, post-climax.

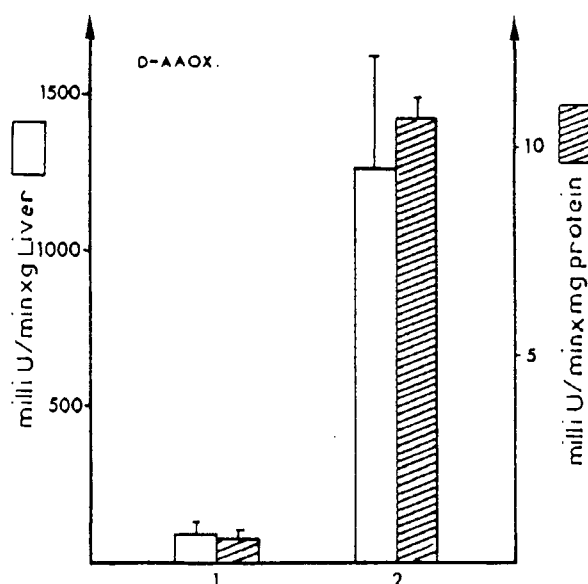


Fig. 4. D-amino acid oxidase activity in liver of *X. laevis* during spontaneous metamorphosis. 1, prometamorphosis; 2, adult.

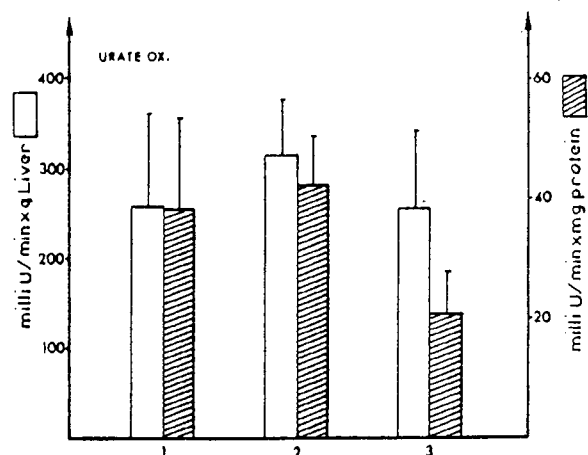


Fig. 5. Urate oxidase activity in liver of *A. obstetricans* during spontaneous metamorphosis. 1, pre-metamorphosis; 2, prometamorphosis; 3, post-climax.

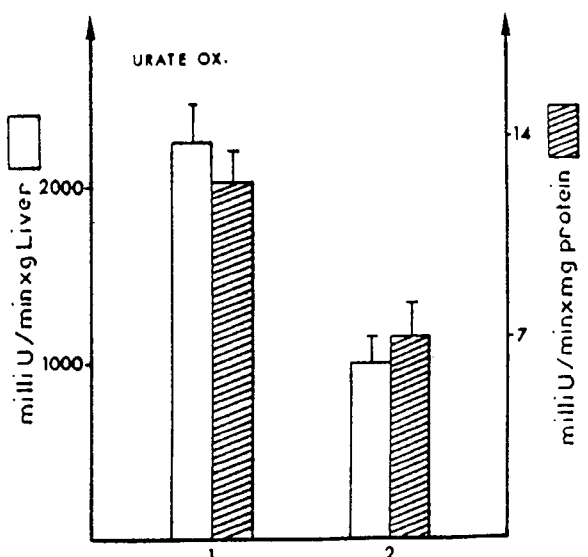


Fig. 6. Urate oxidase activity in liver of *X. laevis* during spontaneous metamorphosis. 1, prometamorphosis; 2, adult.

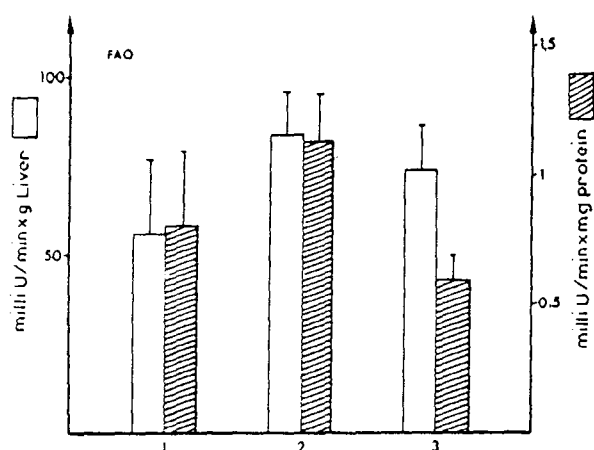


Fig. 7. Fatty acyl-CoA oxidase activity in liver of *A. obstetricans* during spontaneous metamorphosis. 1, pre-metamorphosis; 2, prometamorphosis; 3, post-climax.

The developmental pattern of lauroyl-CoA oxidase in liver of *Alytes obstetricans* is shown in Fig. 7. Significant changes were not observed in total and specific activities of lauroyl-CoA oxidase during spontaneous metamorphosis. It is noteworthy that under our assay conditions and with the sensitivity of the method used, we failed to detect any FAO activity in liver of prometamorphic as well as adult *Xenopus laevis*.

T₃-induced metamorphosis

Triiodothyronine-induced metamorphosis was performed only on thyrostatic tadpoles of *Alytes obstetricans* since enough tissue can be obtained from a single animal at any hormonal treatment stage. After 14 days of immersion in T_3 , treated tadpoles began to leave the hormonal solution, although T_3 treatment was continued up to 17 days. As already emphasized, during the normal development of *Alytes obstetricans* tadpoles, a significant increase was noted in the liver protein content during T_3 -induced metamorphosis (Table 1).

Effect of T_3 on catalase activity

It was found that during an initial 4 day period, the total and specific activities of liver catalase decrease markedly when compared with controls (Fig. 8). A two-fold increase in total and specific activities of catalase was noted between 4 and 6 days of T_3 -treatment. Thereafter, the hepatic catalase activity remained at the high level up to day 17 of hormonal treatment (Fig. 8).

Effect of T_3 on oxidase activities

After 4 days of T_3 treatment, a 3 to 4 fold decrease was found in the total and specific activities of hepatic D-proline oxidase. Subsequent to this 4 day initial period, treatment with triiodothyronine resulted in a significant increase in the enzyme activity which reached high values by day 10, then remained rather constant up to day 17 (Fig. 9).

High individual variations were observed in the total and specific activities of urate oxidase during T_3 -treatment. Nevertheless as illustrated in Fig. 10, the total and specific activities of liver urate oxidase in 4 day T_3 -treated tadpoles were higher than that noted in controls. Thereafter the enzyme activities tended progressively to decrease (Fig. 10).

As shown in Fig. 11, no significant changes were noted in the total and specific activities of liver lauroyl-CoA oxidase throughout T_3 -induced metamorphosis except a decrease during the 4 day initial period. The activity of this β -oxidation enzyme exhibited in liver of TH-treated tadpoles values in the same range than that determined during spontaneous metamorphosis (Fig. 7).

DISCUSSION

Our results confirm and extend those documenting the presence of peroxisomal enzyme activities in the liver of amphibian species. Biochemical assays as well as electron microscopic cytochemical techniques have demonstrated the presence of catalase in the adult

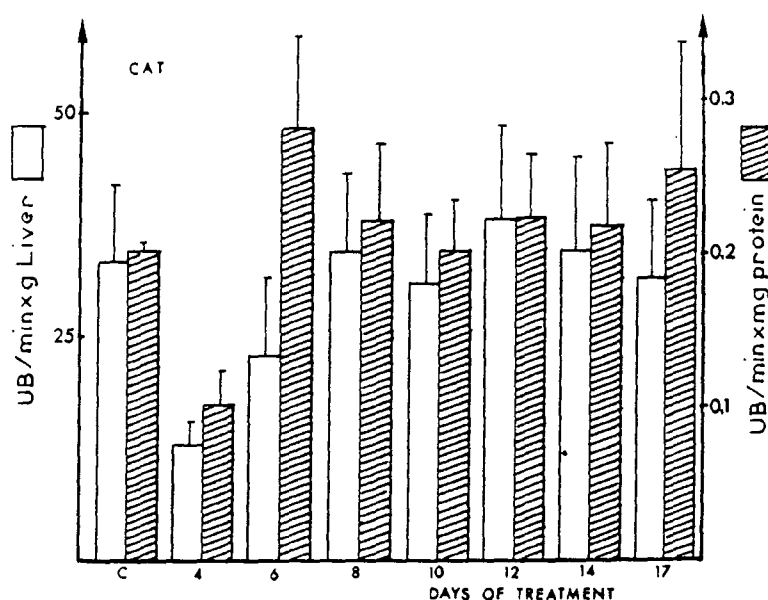


Fig. 8. Catalase activity in liver of *A. obstetricans* during T_3 -induced metamorphosis. C: control.

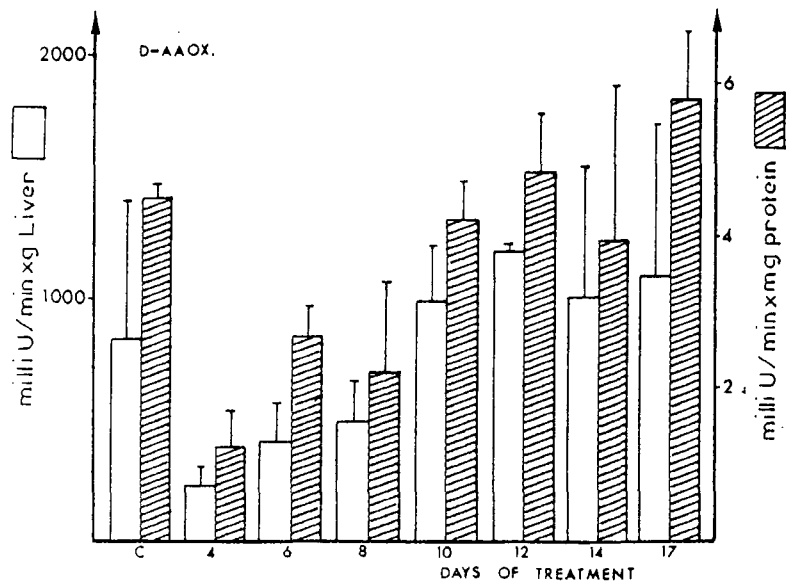


Fig. 9. D-amino acid oxidase activity in liver of *A. obstetricans* during T_3 -induced metamorphosis. C: control.

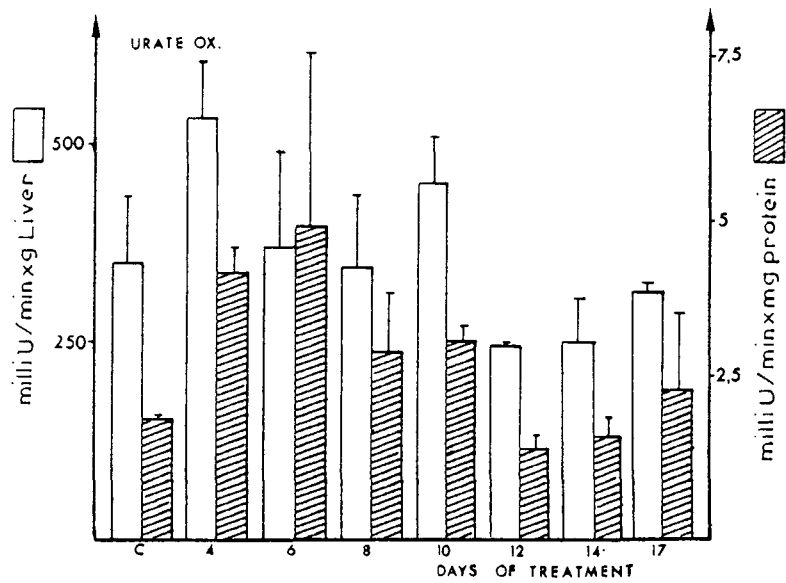


Fig. 10. Urate oxidase activity in liver of *A. obstetricans* during T_3 -induced metamorphosis. C: control.

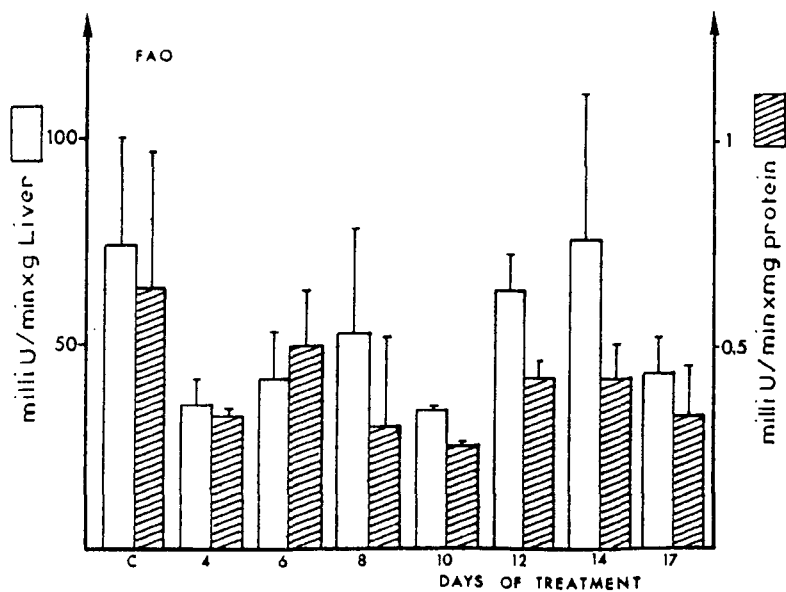


Fig. 11. Fatty acyl-CoA oxidase activity in liver of *A. obstetricans* during T_3 -induced metamorphosis. C: control.

liver of Gymnophiona: *Ichthyophis glutinosus* (Gorgas and Storch, 1984) and Anura: *Rana pipiens* (Visentin and Allen, 1969; Scott *et al.*, 1969), *Rana catesbeiana* (Dauça *et al.*, 1982b; Fujiwara *et al.*, 1987), *Rana ridibunda perezii* (Barja de Quiroga *et al.*, 1985), *Xenopus laevis* (Dauça *et al.*, 1982b), *Bombina orientalis* (Hayashi *et al.*, 1984), *Bufo marinus* (Roels *et al.*, 1970; Jones *et al.*, 1981) and *Discoglossus pictus* (Barja de Quiroga *et al.*, 1985). Our present investigation shows that catalase is also present in liver homogenates of *Alytes obstetricans*. The presence of this enzyme has also been reported in the kidney (Scott *et al.*, 1969; Roels *et al.*, 1970; Dauça *et al.*, 1982b), thyroid (Picheral, 1972), pancreas (Picheral, 1972; Trandaburu, 1980; Dauça *et al.*, 1982b), urinary bladder (Goodman *et al.*, 1980; Jones *et al.*, 1981, 1982), intestine (Dauça *et al.*, 1982a), heart and brain (Barja de Quiroga *et al.*, 1985), interrenal cells (Berchtold, 1975) and fat body adipocytes (Davis *et al.*, 1986) of adult amphibians. In addition to catalase activity, the activities of several oxidases involved in the production of hydrogen peroxide have been detected in hepatic tissue of adult amphibians. The liver homogenates of adult *Alytes obstetricans* and *Xenopus laevis* contain D-amino acid oxidase and urate oxidase. This observation is in good agreement with previous reports indicating that purified peroxisomes from adult amphibian liver are characterized by their content of α -hydroxy-acid oxidase, D-amino acid oxidase (Scott *et al.*, 1969), urate oxidase (Scott *et al.*, 1969; Visentin and Allen, 1969; Fujiwara *et al.*, 1987), allantoinase and allantoicase (Visentin *et al.*, 1969; Takada and Noguchi, 1983; Noguchi *et al.*, 1986), FAO (Hayashi *et al.*, 1984). Of particular interest is FAO. The activity of this enzyme was detected spectrophotometrically in liver of *Alytes obstetricans* at all developmental stages studied while under our standard conditions we failed to detect any FAO activity in prometamorphic and adult *Xenopus laevis*. Further investigations with more sensitive techniques using for example fluorescence, are needed before to assume that the peroxisomal β -oxidation system does not exist in all anuran species.

We have reported herein the developmental patterns of hepatic peroxisomal enzymes during spontaneous metamorphosis of *Alytes obstetricans* tadpoles. The present investigation shows that the total and specific catalase activities increase during the post-embryonic development of *Alytes* tadpoles. Similar results have been reported from our laboratory during metamorphosis of *Rana catesbeiana* tadpoles. In this latter species the increase in hepatic catalase activity coincides with a rise in the number of hepatocyte peroxisomes (Dauça *et al.*, 1982b). It is interesting to point out that the increase in liver catalase activity during the larval and juvenile development of *Alytes obstetricans* is paralleled by increases in oxidase activities. The total and specific activities of liver D-amino acid oxidase increase steadily throughout the entire development of *Alytes obstetricans*. The urate oxidase and FAO activities showed slight increases mostly during the larval period. These results suggest that as the post-embryonic development proceeds the peroxisomal oxidases are more and more involved in the hepatocyte metabolic pathways. The function of D-amino acid oxidase remains somewhat

puzzling as D-amino acids do not originate physiologically in the animals cells. However, they have been found in blood conceivably from the intestinal flora (Hoepfich, 1965). Urate oxidase is a participant in the sequence of enzymes responsible for the degradation of purines which catalyzes the oxidation of uric acid to allantoin. It is to be recalled that the degradation of purines to urate is common to all animal species while the degradation of urate is much less complete in higher animals (White *et al.*, 1973). The presence of allantoinase and allantoicase located in the same protein molecule in amphibian liver peroxisomes has been reported by Takada and Noguchi (1983). The enzyme allantoinase hydrolyzes allantoin to allantoic acid which in amphibians is ultimately cleaved to glyoxylic acid and urea by the allantoinase/allantoicase complex (Noguchi *et al.*, 1986). The third peroxisomal enzyme studied, i.e. FAO is an enzyme involved in the β -oxidation system which degrades medium- and long-chain acyl-CoA. It is very likely that the changes in peroxisomal oxidase activities contribute to a large extent to the biochemical modifications observed in hepatocytes during spontaneous metamorphosis of *Alytes obstetricans*. A strikingly different developmental pattern of catalase and urate oxidase activities is observed during the development of *Xenopus laevis* as those enzymes showed higher activities in liver of premetamorphic tadpoles than in adults. On the other hand, the transition from larval to adult life is marked by a drastic increase in the total and specific activities of D-amino acid oxidase in the liver of *Xenopus laevis*. The very different developmental patterns of peroxisomal enzymes observed during the post-embryonic development of *Alytes obstetricans* and *Xenopus laevis* are possibly related to differences in the physiology of these two species. In *Alytes obstetricans*, the aquatic ammonotelic larvae become terrestrial ureotelic adults. *Xenopus laevis* remains aquatic and ammonotelic throughout life. In light of these observations, it should be of particular interest to determine whether peroxisomes play a role in this adaptation to a terrestrial habitat.

The present study also provides some insight about the effects of triiodothyronine on amphibian liver peroxisomes. It was observed that during an initial 2 to 4 day period, the total and specific activities of catalase, D-amino acid oxidase and urate oxidase of liver *Alytes obstetricans* exhibited marked decreases when compared to that of thyrostatic tadpoles. Such a decrease in the specific activity of catalase has not been observed by Dauça *et al.* (1983) during thyroxine (T_4)-induced metamorphosis of *Rana catesbeiana* tadpoles. The discrepancy may be due to: (1) the difference in species; (2) the absence of pretreatment of tadpoles with propylthiouracil in the preliminary report; (3) the use of T_4 instead of T_3 . However, subsequent to that initial period, T_3 -treatment resulted in increases in total and specific activities of catalase, D-amino acid oxidase and urate oxidase in liver of *Alytes obstetricans* tadpoles. In contradistinction to the effect of triiodothyronine on these peroxisomal enzymes, there was no significant effect on the activity of the FAO enzyme. We have already emphasized that during T_4 -induced metamorphosis of *Rana catesbeiana* tadpoles, a slight

increase was observed in hepatic catalase activity by day 3, followed by a prominent rise by day 9. The changes in catalase activity were concomitant with an increase in the abundance of liver peroxisomes (Dauça *et al.* 1983). Recent evidence has indicated that prolonged administrations of triiodothyronine (Fringes and Reith, 1980) or thyroxine (Just *et al.*, 1982, 1983) cause a remarkable increase in the number of rat hepatocyte peroxisomes. Treatment of rats for ten days with thyroxine raises hepatic catalase activity by 68% (Just *et al.*, 1982). It was also observed by these authors that a new peroxisomal population was formed under the influence of thyroid hormones, exhibiting a characteristic change in their size, their mean equilibrium density in sucrose gradients and their enzyme pattern. Results obtained during spontaneous metamorphosis, i.e. when the plasmatic level of endogenous TH increases at climax, and during T₃-treatment of *Alytes obstetricans* tadpoles are in good agreement with those reported in mammals. Comparison of data from spontaneous and T₃-induced metamorphosis leads to the conclusion that TH do influence the liver peroxisome enzyme activities.

It is now well established that TH have a significant impact, at least in certain tissues of higher eukaryotes, on mitochondrial function and biogenesis. The TH status influences the cellular level (Tata, 1967; Reith *et al.*, 1973; Beckingham-Smith and Tata, 1976), turnover rate (Katyare *et al.*, 1970; Gross, 1971), the ultrastructure (Roodyn *et al.*, 1965; Kadenbach, 1966; Bennett *et al.*, 1970; Cohen, 1970; Atkinson, 1971; Cohen *et al.*, 1978), endogenous enzyme specific activities (Lee *et al.*, 1959; Tata *et al.*, 1963; Lee and Lardy, 1965; Kadenbach, 1966; Sellinger *et al.*, 1966; Tarentino *et al.*, 1966; Tata, 1967; Cohen, 1970; Katyare *et al.*, 1970; Okamoto, 1971; Brucker and Cohen, 1976; Cohen *et al.*, 1978), and membrane cytochrome composition (Tata *et al.*, 1963; Roodyn *et al.*, 1965; Kadenbach, 1966) of mitochondria. We may conclude from our results that peroxisomes are also, either directly or indirectly, target organelles of TH. They probably act co-operatively with mitochondria during spontaneous and TH-induced metamorphosis.

Acknowledgements—The authors thank Ms Suzanne Colin, Mr Jean Marie Keller and Ms Annie Stoekel for their skilful assistance. This study was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (CRE-N°857.005), the Centre National de la Recherche scientifique (CRL.N°40.00.58) and the Fondation pour la Recherche Médicale (Comité Lorraine). Joseph Vamecq is Chargé de Recherches of the Belgian Fonds National of Scientific Research.

REFERENCES

- Allain C. C., Poon L. S., Chan C. S. G., Richmond W. and Fu P. C. (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **20**, 470–475.
- Atkinson B. G. (1971) Patterns of macromolecular biosynthesis during amphibian metamorphosis. In *Relationships of Endocrines to Growth and Development* (Edited by Breitenbach R. P. and Kenney A. D.), pp. 48–82. University of Missouri Press, Columbia.
- Atkinson B. G., Atkinson K. H., Just J. J. and Frieden E.

- (1972) DNA synthesis in *Rana catesbeiana* tadpole liver during spontaneous and triiodothyronine-induced metamorphosis. *Devl. Biol.* **29**, 162–175.
- Barja de Quiroga G., Gil P. and Alonso-Bedate M. (1985) Catalase enzymatic activity and electrophoretic patterns in adult Amphibians. A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol.* **80B**, 853–858.
- Baudhuin P., Beaufay H., Rahman-Li Y., Sellinger O. Z., Wattiaux R., Jacques P. and de Duve C. (1964) Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase, and catalase in rat liver tissue. *Biochem. J.* **92**, 179–184.
- Beckingham-Smith K. and Tata J. R. (1976) In *The Developmental Biology of Plants and Animals* (Edited by Graham C. F. and Wareing P. F.), pp. 232–247. Saunders, Philadelphia.
- Bennett T. P., Glenn J. S. and Sheldon H. (1970) Changes in the fine structure of tadpole liver during thyroxine-induced metamorphosis. *Devl. Biol.* **22**, 232–248.
- Berchtold J. P. (1975) Observations on peroxisomes in interrenal (adrenocortical) cells of *Triturus cristatus* and *Salamandra salamandra* (Urodele Amphibians). *Cell. Tiss. Res.* **162**, 349–356.
- Böck P., Kramar R. and Paveika M. (1980) Peroxisomes and related particles in animal tissues. In *Cell Biology Monographs*, Vol. 7. Springer, Wien, New York.
- Brucker R. F. and Cohen P. P. (1976) Alterations in enzyme and cytochrome profiles of *Rana catesbeiana* liver organelles during thyroxine-induced metamorphosis. Changes in membrane-localized phosphohydrolases, oxidoreductases and cytochrome levels in response to *in vivo* thyroxine administration. *J. biol. Chem.* **251**, 6161–6169.
- Calvert R. and Ménard D. (1978) Cytochemical and biochemical studies on the differentiation of microperoxisomes in the small intestine of the fetal mouse. *Devl. Biol.* **65**, 342–352.
- Campbell A. M., Corrance M. H., Davidson J. N. and Keir H. M. (1969) The metabolism of DNA in the liver during precocious induction of metamorphosis in *Rana catesbeiana*. *Proc. R. Soc. Edinb.* Vol. LXX, Part IV, 295–310.
- Cohen P. P. (1970) Biochemical differentiation during amphibian metamorphosis. *Science* **168**, 533–543.
- Cohen P. P., Brucker R. F. and Morris S. M. (1978) Cellular and molecular aspects of thyroid hormone action during amphibian metamorphosis. In *Hormonal Proteins and Peptides* (Edited by Li C. H.), Vol. 6, pp. 273–381. Academic Press, New York.
- Dauça M., Calvert R., Ménard D., Hugon J. S. and Hourdry J. (1982a) Development of peroxisomes in Amphibians. I. Cytochemical and biochemical studies on the small intestine. *J. exp. Zool.* **220**, 235–241.
- Dauça M., Calvert R., Ménard D., Hugon J. S. and Hourdry J. (1982b) Development of peroxisomes in Amphibians. II. Cytochemical and biochemical studies on the liver, kidney and pancreas. *J. exp. Zool.* **223**, 57–65.
- Dauça M., Calvert R., Ménard D., Hugon J. S. and Hourdry J. (1983) Development of peroxisomes in Amphibians. III. Study on liver, kidney and intestine during thyroxine-induced metamorphosis. *J. exp. Zool.* **227**, 413–422.
- Davis W. L., Jones R. G. and Goodman D. B. P. (1986) Cytochemical localization of malate synthase in amphibian fat body adipocytes: possible glyoxylate cycle in a vertebrate. *J. Histochem. Cytochem.* **34**, 689–692.
- Essner E. (1970) Observations on hepatic and renal peroxisomes (microbodies) in the developing chick. *J. Histochem. Cytochem.* **18**, 80–92.
- Fringes B. and Reith A. (1980) The formation of microbodies under triiodothyronine influence in rat liver. *Europ. J. Cell. Biol.* **22**, 166.
- Fujiwara S., Ohashi H. and Noguchi T. (1987) Comparison of intraperoxisomal localization form and properties of

- amphibian (*Rana catesbeiana*) uricase with those of other animal uricases. *Comp. Biochem. Physiol.* **86B**, 23–26.
- Goodman D. B. P., Davis W. L. and Jones R. G. (1980) Glyoxylate cycle in toad urinary bladder: possible stimulation by aldosterone. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* **77**, 1521–1525.
- Gorgas K. and Storch V. (1984) Marginal plates in hepatic peroxisomes of *Ichthyophis glutinosus* (Amphibia: Gymnophiona). A cytochemical study. *Cell. Tiss. Res.* **238**, 413–416.
- Gross N. J. (1971) Control of mitochondrial turnover under the influence of thyroid hormone. *J. Cell. Biol.* **48**, 29–40.
- Hayashi H., Fukui K., Yamasaki F. and Suga T. (1984) Peroxisomes in the liver of frog, *Bombina orientalis*. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 2346–2352.
- Hoepflich P. D. (1965) Alanine: cycloserine antagonism. VI. Demonstration of D-alanine in the serum of guinea pigs and mice. *J. biol. Chem.* **240**, 1654–1660.
- Holmes R. S. (1971) Ontogeny of mouse liver peroxisomes and catalase isoenzymes. *Nature* **232**, 218–220.
- Hughes A. M. and Astwood E. B. (1944) Inhibition of metamorphosis in tadpoles by thiouracil. *Endocrinology* **34**, 138–139.
- Jones R. G., Davis W. L. and Goodman D. B. P. (1981) Microperoxisomes in the epithelial cells of the amphibian urinary bladder: an electron microscopic demonstration of catalase and malate synthase. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 1150–1156.
- Jones R. G., Davis W. L. and Goodman D. B. P. (1982) The role of peroxisomes in the response of the toad bladder to aldosterone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **386**, 165–168.
- Just W. W., Hartl F. U. and Schimassek H. (1982) Rat liver peroxisomes. I. New peroxisome population induced by thyroid hormones in the liver of male rats. *Europ. J. Cell. Biol.* **26**, 249–254.
- Just W. W. and Hartl F. U. (1983) Rat liver peroxisomes. II. Stimulation of peroxisomal fatty acid β -oxidation by thyroid hormones. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**, 1541–1547.
- Kadenbach B. (1966) Effect of thyroid hormones on mitochondrial enzymes. In *Symposium on the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria* (Edited by Tager J. M., Papa S., Quagliariello E. and Slater E. C.), Vol. 7, pp. 508–517. American Elsevier Publishing Company, New York.
- Katyare S. S., Fatterpaker P. and Sreenivasan A. (1970) Heterogeneity of rat liver mitochondrial fractions and the effect of triiodothyronine on their protein turnover. *Biochem. J.* **118**, 111–121.
- Kistler A., Yoshizato K. and Frieden E. (1977) Preferential binding of tri-substituted thyronine analogs by bullfrog tadpole fin cytosol. *Endocrinology* **100**, 134–137.
- Lee Y. P. and Lardy H. A. (1965) Influence of thyroid hormones on L- α -glycerophosphate dehydrogenases and other dehydrogenases in various organs of the rat. *J. biol. Chem.* **240**, 1427–1436.
- Lee Y. P., Takemori A. E. and Lardy H. A. (1959) Enhanced oxidation of α -glycerophosphate by mitochondria of thyroid fed rats. *J. biol. Chem.* **234**, 3051–3054.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Nieuwkoop P. D. and Faber J. (1956) Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Noguchi T., Fujiwara S. and Hayashi S. (1986) Evolution of allantoinase and allantoicase involved in urate degradation in liver peroxisomes. A rapid purification of amphibian allantoinase and allantoicase complex, its subunit locations of the two enzymes and its comparison with fish allantoinase and allantoicase. *J. biol. Chem.* **261**, 4221–4223.
- Okamoto H. (1971) Influence of L-thyroxine on kynurenine 3-hydroxylase monoamine oxidase and rotenone-insensitive NADH-cytochrome C reductase in mitochondrial outer membrane. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **43**, 827–833.
- Picheral B. (1972) Les tissus élaborateurs d'hormones stéroïdes chez les Urodèles. V. Mise en évidence et localisation cytochimique d'une activité de type peroxydasique endogène dans la cellule du tissu glandulaire du testicule de *Pleurodeles waltlii*. Comparaison avec d'autres types cellulaires. *J. Microsc.* **13**, 247–262.
- Reith A., Brdiczke D., Nolte J. and Staudtke H. W. (1973) The inner membrane of mitochondria under influence of triiodothyronine and riboflavin deficiency in rat heart muscle and liver. *Exp. Cell. Res.* **77**, 1–14.
- Roels F., Schiller B. and Goldfisher S. (1970) Microbodies (peroxisomes) in the toad, *Bufo marinus*. A cytochemical study. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.* **108**, 135–149.
- Roodyn D. B., Freeman K. B. and Tata J. R. (1965) The stimulation by treatment *in vivo* with triiodothyronine of amino acid incorporation into protein by isolated rat liver. *Biochem. J.* **94**, 628–641.
- Rohr H. P., Wirz A., Henning L. C., Riede U. N. and Bianchi L. (1971) Morphometric analysis of the rat liver cell in the perinatal period. *Labor. Invest.* **24**, 128–139.
- Scott P. J., Visentin L. P. and Allen J. M. (1969) The enzymatic characteristic of peroxisomes of amphibian and avian liver and kidney. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **168**, 244–264.
- Sellinger O. Z., Lee L. L. and Felser K. W. (1966) The induction of mitochondrial α -glycerophosphate dehydrogenase by thyroid hormone: effects of adrenalectomy, thyroidectomy and cortisone administration. *Biochim. biophys. Acta* **124**, 289–294.
- Singal P. W. and Sanders E. J. (1974) Cytochromes in first cleavage *Xenopus* embryos. Interrelationship between Golgi bodies, endoplasmic reticulum and lipid droplets. *Cell. Tiss. Res.* **154**, 189–209.
- Stefanini S. (1985) Differentiation of liver peroxisomes in the foetal and newborn rat. Cytochemistry of catalase and D-amino acid oxidase. *J. Embryol. exp. Morph.* **88**, 151–163.
- Stephens R. J. and Bils R. F. (1967) Ultrastructural changes in the developing chick liver. I. General cytology. *J. ultrastruct. Res.* **18**, 456–474.
- Takada Y. and Noguchi T. (1983) The degradation of urate in liver peroxisomes. Association of allantoinase with allantoicase in amphibian liver but not in fish and invertebrate liver. *J. biol. Chem.* **258**, 4762–4764.
- Tata J. R. (1967) The formation, distribution and function of ribosomes and microsomal membranes during induced amphibian metamorphosis. *Biochem. J.* **105**, 783–801.
- Tata J. R., Ernster L., Lindberg O., Arrhenius E., Pedersen S. and Hedman R. (1963) The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem. J.* **86**, 408–428.
- Tarentino A. L., Richert D. A. and Westerfield W. B. (1966) The concurrent induction of hepatic α -glycerophosphate dehydrogenase and malate dehydrogenase by thyroid hormone. *Biochim. biophys. Acta* **124**, 295–309.
- Taylor A. C. and Kollros J. J. (1946) Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat. Rec.* **94**, 7–23.
- Trandaburu T. (1980) Microperoxisomes and catalase peroxidatic activity in the pancreas of two amphibian species (*Salamandra salamandra* L. and *Rana esculenta* L.). *Acta histochem.* **66**, 135–145.
- Tsukada H., Mochizuki Y. and Konishi T. (1968) Morphogenesis and development of microbodies of hepatocytes of rats during pre- and postnatal growth. *J. Cell. Biol.* **37**, 231–243.
- Visentin L. P. and Allen J. M. (1969) Allantoinase: association with amphibian hepatic peroxisomes. *Science* **163**, 1463–1464.
- White A., Handler P. and Smith E. L. (1973) *Principles of Biochemistry*. McGraw-Hill, New York.

ANNEXE II

The effect of clofibrate on Amphibian hepatic peroxisomes.

Biology of the cell (Sous presse)

THE EFFECT OF CLOFIBRATE ON AMPHIBIAN HEPATIC PEROXISOMES

Eric CIOLEK, Michel DAUÇA

Laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement
Université de Nancy I - Faculté des Sciences - BP 239
54506 - Vandœuvre-lès-Nancy Cedex - France

Correspondence should be sent to :

E. CIOLEK,
Laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement
Université de Nancy I - Faculté des Sciences- BP 239
54506 - Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex - France.

ABBREVIATIONS

CoA, coenzyme A ; DAAOxase, D-amino acid oxidase ; DAB, 3-3' diaminobenzidine tetrahydrochloride ; EDTA, ethylenediaminetetracetic acid ; FAD, flavin adenine dinucleotide ; FAOxase, fatty acyl coA oxidase ; H₂O₂, hydrogen peroxide ; KCN, potassium cyanide ; MOPS, (3-[N-morpholino]propanesulfonic acid) ; NAD⁺, NADH, (reduced) nicotinamide adenine dinucleotide ; PBE, enoyl-CoA hydratase/3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase

SUMMARY

Liver peroxisomes of two anuran amphibian species, *Rana esculenta* and *Xenopus laevis*, were studied in untreated and in clofibrate-treated adults by means of complementary technical approaches, i.e., ultrastructural cytochemistry, cell fractionation and marker enzyme activity assays. In untreated adults, hepatic peroxisomes were found to be very scarce in *Xenopus* when compared to *Rana*. Activities of catalase, D-amino acid oxidase and of the three first enzymes of the peroxisomal β -oxidation system were detected in the light mitochondrial fractions enriched in peroxisomes and prepared from livers of both species. Administration of clofibrate at a daily dose level of 60 mg (*Rana*) and 90 mg (*Xenopus*) during ten days induced a drastic peroxisome proliferation in *Rana* hepatocytes but had no visible effect on the hepatic peroxisomal population of *Xenopus*. The catalase activity and the peroxisomal β -oxidation system of liver cells were enhanced in *Rana* as well as in *Xenopus*. The hepatic D-amino acid oxidase specific activity was increased in *Rana* whereas it remained rather constant in *Xenopus*. Taking advantage of the behavior of *Rana* and *Xenopus* hepatic peroxisomes, the molecular mechanisms of clofibrate induction is now investigated in the target liver cells of the two amphibian species.

KEY WORDS

Liver peroxisomes - Clofibrate - Amphibians

RUNNING TITLE

Clofibrate and amphibian liver peroxisomes

INTRODUCTION

Since the earliest ultrastructural observations of livers of rats fed clofibrate by Paget [25], it has been well documented that this hypolipidemic agent and other compounds related or unrelated to clofibrate induce hepatic peroxisome proliferation in rodents and some non-rodents [10, 14, 16, 22, 23, 26, 27, 29, 32, 34]. In addition, conspicuous increases of fatty-acid β -oxidation activity and modifications of other peroxisomal enzymatic activities were also noted in the livers of those peroxisome proliferator-treated animals (for reviews see Reddy et al [28] and Hawkins et al [12]).

Despite the important number of studies showing how the magnitude of these effects changes in relation to the different species, these investigations were only restricted to higher vertebrates (avians and mammals including primates). So that very little is known about the effects of these drugs on liver peroxisomes of lower vertebrates. It has only been reported [13] that administration of clofibrate to frog *Bombina orientalis* enhanced some enzyme activities of hepatic peroxisomes but changes in the number, size and shape of the peroxisomal population were not analyzed.

Therefore, the aim of the present study has been to define more precisely the effects of clofibrate on the morphological and biochemical features of amphibian liver peroxisomes.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Clofibrate (ethyl 2-(4-chlorophenoxy)-2-methyl propionate), horse radish peroxidase, D-proline, lauroyl-coenzyme A and coenzyme A were from Sigma Chemical Co (Saint-Louis, MD, USA). Titanyl sulphate and 4-aminoantipyrine were from Touzart et Matignon and Prolabo (Paris, France) respectively. Phenol was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Flavin and nicotinamide adenine dinucleotide were from Boehringer (Mannheim, Germany).

Animals and treatment

Experiments were carried out on male adults of two anuran amphibian species : *Rana esculenta* and *Xenopus laevis*. Adults were commercially obtained and kept at 20°C with a lighting rythm of 12/12. *Rana* and *Xenopus* were fed *ad libitum* on insects and fresh meat, respectively. Clofibrate was given orally via a microsyringue at a daily dose of about 60 mg (*R. esculenta*) and 90 mg (*X. laevis*) for ten days. Then, the animals were anesthetized by cooling in ice-cold water and decerebrated. The livers were isolated and immediately fixed for ultrastructural cytochemistry or used for liver subcellular fractionation.

Electron microscopy

Liver samples were fixed in 2.8 % glutaraldehyde buffered either with M/15 sodium phosphate or with 0.1 M sodium cacodylate, pH 7.4, for 1 h at 4°C and washed in the same buffer for at least 1h. Peroxisomes were identified by demonstrating the peroxidatic activity of catalase. Tissue slices were incubated for 2 h at 25°C in the alkaline 3-3'-diaminobenzidine (DAB)-medium defined by Novikoff et al [24]. Control samples were incubated with 0.2 M 3-amino-1,2,4-triazole that blocks the enzyme activity. Both samples were then washed in cold 0.1 M sodium cacodylate, post-fixed for 30 min in 1% osmium tetroxide prepared in the same buffer, dehydrated in ethanol and embedded in Araldite/epon mixture (v/v).

Thin sections (50-100 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate [31] and examined in a Zeiss EM9S2 electron microscope.

Liver subcellular fractionation

Whole liver homogenates (10 % w/v) were handily prepared in ice-cold buffer consisting of 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 5 mM MOPS and 0.1 % ethanol (pH 7.4) with the aid of a glass-teflon Potter homogenizer. Fractionation was performed according to the method of De Duve et al [9]. Nuclear (N), heavy mitochondrial (M), light mitochondrial (L), microsomal (P) and supernatant (S) fractions were obtained by centrifugation at 700 x g for 10 min, 3000 x g for 10 min, 15000 x g for 20 min and 100.000 x g for 40 min, respectively. Centrifugations were carried out in a Kontron ultracentrifuge (model T 2055) with a TFT 50.13 rotor. All pellets were resuspended in 0.25 M sucrose. Aliquots were taken for protein assays [21]. Triton X-100 was added to the homogenates to a final concentration of 1 % in order to release the peroxisomal enzymes as previously reported [6-8].

Enzyme assays

The catalase activity was measured according to the method of Baudhuin et al [2]. Briefly, the preparations were incubated at 0°C for 0, 3 and 6 min in a total volume of 1060 µl containing 18.9 mM imidazole-HCl buffer (pH 7), 0.1 % bovine serum albumin, 1.85 µM hydrogen peroxide and the homogenate at a final dilution of 1/2000. The reaction was stopped by the addition of 600 µl of a 0.125 % (w/v) saturated solution of titanil sulphate in 2N H₂SO₄, and the remaining hydrogen peroxide was determined spectrophotometrically at 20°C by the extinction of the yellow peroxytitanium sulphate at 400 nm. The initial hydrogen peroxide concentration was measured similarly on an unincubated mixture of the same composition. The breakdown of hydrogen peroxide followed first-order kinetics. Catalase activity was expressed as nmol substrate convertes per min and per g tissue or per mg protein.

D-amino acid oxidase (DAAOxase) and fatty acyl-CoA oxidase (FAOxase) were assayed by measurement with specific substrates of the dependent H₂O₂ production by the method of Allain et al [1] with some modifications concerning the substrate concentrations. The reaction mixture contained in a total volume of 1 ml, the following constituents : 50 mM potassium phosphate (pH 8), 0.082 mM 4-aminoantipyrine, 1.06 mM phenol, 0.01 mM FAD, 4 IU of horse radish peroxidase and the preparation at a final dilution of 1/500. The pH of the solution was adjusted to pH 8 as preliminary assays have revealed that it was the pH optimum for DAAOxase and FAOxase. The reaction was carried out at 20°C by adding the appropriate substrate : 50 mM D-proline

for DAAOase and 500 μM lauroyl-CoA for FAOxase. The formation of H_2O_2 was measured by following the increase in absorbance at 500 nm. A molar extinction coefficient of $48.10^5 \text{ mol/ml/cm}$ was used.

The enoyl-Co hydratase/3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase simply referred to as peroxisomal bifunctional enzyme or PBE in this paper was estimated as described by Lazarow and De Duve [18]. The method was based on the increase in absorbance at 340 nm due to reduction of NAD^+ , in the presence of KCN to prevent reoxidation of the NADH formed. The assay was performed at 20°C in 30 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, containing 200 μM NAD^+ , 50 μM CoA, 1 mM KCN, 12 mM dithiothreitol, 0.15 mg/ml bovine serum albumin, 0.04 % (v/v) Triton X-100 and the preparation at a final dilution of 1/400. The reaction was started by adding lauroyl-CoA to a final concentration of 50 μM . A molar extinction coefficient of $6.3.10^3 \text{ mol/ml/cm}$ was used.

The oxidase activities were expressed as units or milliunits, i.e, mmol or nmol respectively per min and per g tissue or per mg protein.

Statistical analyses

All results were calculated as the mean $\pm$ standard deviation. Comparison between the treated animals over the controls were computed by the Student's *t* test.

RESULTS

Morphological changes in liver

In normal *Rana* liver cells incubated in the complete-DAB medium, all peroxisomes showed an uniform intense reaction of their matrix (Fig. 1A). The catalase-positive structures were few, usually spherical and their mean diameter measured either $0.55 \pm 0.08 \mu\text{m}$ (60 %) or $0.32 \pm 0.06 \mu\text{m}$ (40 %). Ten days of treatment with clofibrate at a 60 mg daily dose level resulted in a substantial increase in the number of peroxisomes in all hepatocytes (Fig. 1B). As a consequence of the drug treatment, some peroxisomes (15 %) were elongated and had a $0.57 \pm 0.08 \mu\text{m}$ diameter, others (85 %) were round shaped and smaller ($0.34 \pm 0.08 \mu\text{m}$ in diameter). In addition there was conspicuous proliferation of smooth endoplasmic reticulum. A close spatial relationship between endoplasmic reticulum and peroxisomes was common (Fig. 1B). Occasionally a strand of rough endoplasmic reticulum lying within a mitochondrion was seen to encircle part of a peroxisome (Fig. 1C). Partition or fusion of some peroxisomes was clearly seen (Fig. 1D). It is noteworthy that reduced dose levels of clofibrate failed to induce any morphological changes in *Rana* liver.

In livers of normal *Xenopus* adults, the DAB-reacted peroxisomes were scarce whatever the hepatocyte observed at the electron microscopic level (Fig. 2A). They had a round to ovoid shape, and a diameter ranging from $0.41 \mu\text{m}$ to $0.52 \mu\text{m}$. The matrix appeared finely granular or flocculent and the intensity of the catalase reaction was always lower than that observed in peroxisomes of *Rana* hepatocytes. The treatment with clofibrate had no effect on the number, size and shape of peroxisomes even at the high daily dose level used of 90 mg (Fig. 2 B, C).

Subcellular fractionation

The distribution and the enrichment of peroxisomes after fractionation of the homogenates prepared from livers of normal and clofibrate-treated *Rana* and *Xenopus* adults are shown in figures 3 and 4. The distribution profile of different peroxisomal marker enzymes, i.e catalase, FAOxase, PBE and DAAOxase, indicates that peroxisomes are recovered in the heavy and light mitochondrial fractions. In all animals, a substantial activity of catalase was also recovered in soluble fraction.

Hepatic index and protein content

The hepatic index is expressed as the liver/body weight ratio. Table I shows that clofibrate treatment induced a significant decrease ($p < 0.01$) in *Rana* hepatic index whereas it had no effect in that of *Xenopus*.

Total cellular proteins expressed in mg per g fresh liver weight showed no significant changes in *Rana* but exhibited a 25 % decrease in *Xenopus*. In addition a 1.6- and 1.4- fold increase was observed in the protein content of the peroxisome-enriched fraction prepared from *Rana* and *Xenopus* livers, respectively (Table I).

Peroxisomal enzyme activities

The changes in peroxisomal enzyme activities as measured in the liver homogenates and in the light mitochondrial fractions are summarized in Tables II and III.

Ten days of clofibrate treatment induced a 1.4-2.1-fold increase of catalase activity (U/mg of protein) measured in the liver homogenate of *Rana* and *Xenopus* adults, respectively. After measurement in the peroxisome-enriched fraction, there was a 1.6-1.8-fold increase for *Rana* and *Xenopus* respectively.

The peroxisomal β -oxidation system was also found to be enhanced by administration of the drug. In treated *Rana* adults the capacity of the test liver homogenates to oxidize lauroyl-coA was 1.4- (for FAOxase) and 2.0-fold (for PBE) greater than the controls when activities were expressed as mU/mg of total liver protein (Table II). On the other hand, under same assay conditions, we were unable to detect any enzyme activity of the peroxisomal β -oxidation system in the liver homogenates of clofibrate treated and untreated *Xenopus* adults. In addition, a 1.4-2.3-fold increase was noted for FAOxase and PBE specific activities measured in the light mitochondrial fractions of treated *Rana* adults as compared to the controls (Table III). We point out that in treated and untreated *Xenopus*, the activities of the peroxisomal β -oxidation enzymes were detectable in the light mitochondrial fractions whereas they were not in the liver homogenates. In this amphibian species, assays of FAOxase and PBE activities in the peroxisome-enriched fractions revealed that the specific activities (mU/mg of protein) of these enzymes were enhanced 1.6- and 1.1-fold, respectively, by clofibrate treatment. A 1.2- and 3.8-fold increase was noted when FAOxase and PBE activities in the peroxysome-enriched fractions were expressed as mU/g of liver.

There was a 1.5- and 1.6-fold increase of total DAAOxase activity (mU/g of liver) in liver homogenates after clofibrate treatment of *Rana* and *Xenopus* adults, respectively. When DAAOxase activity in liver homogenates was expressed as mU/mg of total liver protein, a 1.5-fold increase over the controls was noted for *Rana* whereas the enzyme

activity remained rather constant for *Xenopus*. Activities of DAAOxase determined in the light mitochondrial fractions and expressed as mU/mg of protein or mU/g of liver, elevated 2- and 3.3-fold respectively, after clofibrate treatment of *Rana esculenta*. They were raised only 1.1- and 1.4-fold, respectively, in the liver light mitochondrial fractions of treated *Xenopus*.

DISCUSSION

Liver cells of normal *Rana esculenta* and *Xenopus laevis* show some differences in the morphological and biochemical features of their peroxisomes. Under same cytochemical conditions, hepatic DAB-positive structures were found to be scarce in *Xenopus* whereas their presence was easily demonstrated in *Rana*. Comparison of the peroxisomal enzyme activities reveals that they were always higher in liver homogenates of *Rana* than in *Xenopus*. It is noteworthy that under our assay conditions and with the sensitivity of the method applied, we failed to detect any activity of FAOxase and PBE in liver homogenates of *Xenopus*. FAOxase is the first enzyme of the peroxisomal β -oxidation system. It catalyzes dehydrogenation of fatty acyl-CoA leading to the production of H_2O_2 [11]. PBE catalyzes the second and third reactions of the β -oxidation cycle yielding 3-ketoacyl-CoA from enoyl-CoA [17]. Casteels et al [4] have also encountered similar difficulties with the determination of FAOxase activity in the liver homogenate of *Bombina orientalis*. According to these authors some components in the *Bombina* liver homogenate could interfere with the detection of H_2O_2 , on which the acyl-coA oxidase assay is based on. If this interference has prevented us to measure the low level of H_2O_2 produced in *Xenopus* hepatocytes, however we may assume that the peroxisomal β -oxidation system does exist in the liver of this amphibian species as FAOxase and PBE activities were detected in the peroxisome-enriched fractions. It may be added that the latter exhibited higher DAOxase activities in *Xenopus* than in *Rana*. The function of DAOxase remains somewhat puzzling as D-amino acids do not originate physiologically in the animal cells. However, they have been found in blood conceivably from the intestinal flora [15]. The differences observed between *Rana* and *Xenopus* liver peroxisomes are the consequence of their respective ontogenic patterns. In anurans whose spontaneous metamorphosis is characterized by the transformation of aquatic ammonotelic larvae into terrestrial ureotelic adults, the number, size, catalase and DAOxase activities of hepatic peroxisomes have been reported to increase during post-embryonic development [5, 7]. On the other hand during metamorphosis of *Xenopus laevis*, a species which remains aquatic and ammonotelic throughout life, no change is observed in the number of liver peroxisomes whereas a significant decrease in catalase activity and a drastic elevation of DAOxase activity are noted [5, 7].

Our results confirm and extend those of Hayashi et al [13] documenting the effects of clofibrate on liver peroxisomes of terrestrial *Bombina orientalis* adults. The present study shows that administration of clofibrate to *Rana esculenta* and *Xenopus laevis* adults results in significant changes of most peroxisomal enzyme activities. Under clofibrate treatment of anuran species, differences were observed in the hepatic

DAAOxase specific activity as the latter was found to be enhanced in *Rana esculenta*, to remain rather constant in *Xenopus laevis* and to be diminished in *Bombina orientalis*. This study also demonstrates clearly that clofibrate induces in *Rana* liver cells a slight increase in the amount of smooth endoplasmic reticulum and causes a notable proliferation of the peroxisomal population. A similar situation was noted in higher vertebrates with the administration of chemicals possessing hypotriglyceridemic properties [12]. Nevertheless if these agents induce hepatic peroxisome proliferation in some amphibian, avian and mammalian species it should be emphasized that their effects in the peroxisomal enzyme activities are more important in higher (particularly in rodents) than in lower vertebrates. In addition a variability in peroxisomal size was observed in *Rana* under the drug treatment. Presumably, the increased number of peroxisomes that are smaller than normal represents a true proliferation because the increase was present in all zones of the hepatic lobule and was accompanied by a simultaneous increase in peroxisomal catalase and oxidase activities. Recent studies revealed that peroxisomes do not originate from other organelles such as endoplasmic reticulum but arise from preexisting peroxisomes [3, 19]. In the present study, it is very likely that fission of peroxisomes does exist in *Rana* hepatocyte after clofibrate treatment. On the other hand no hepatic peroxisome proliferation was observed in treated *Xenopus* despite the high dose level used. For this amphibian species the results presented herein demonstrate that clofibrate is capable of elevating the activities of the main peroxisomal enzymes without causing an evident proliferation of the organelle. A similar result has been obtained when female rodents were treated by clofibrate [20]. Thus in *Xenopus* liver cells, the dose response for peroxisomal enzymes apparently differs from the dose response for proliferation.

These results together with those of other workers [14, 18, 20, 23, 30, 33] further substantiate the conclusion that clofibrate exerts a specific and delicate regulation of the peroxisomal abundance and enzymatic composition. On the basis of the very similar effects of clofibrate and thyroid hormones [5, 8] on the behavior of *Rana* and *Xenopus* hepatic peroxisomes, those two anuran amphibian species could represent good biological models to explore and compare the molecular mechanism of induction of these peroxisome proliferators in the target liver cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Professor F. Van Hoof (I.C.P., Bruxelles) for critically reading the manuscript. We would like to thank Suzanne Colin and Annie Stoëkel for their skilful assistance.

This study was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (CRE.N° 887.007), the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC N°6255), the Fondation pour la Recherche Médicale (Comité Lorraine), the Ligue Nationale contre le Cancer and the Centre National de la Recherche Scientifique (SDI.61 47).

REFERENCES

1. Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin. Chem 20, 470-475.
2. Baudhuin P, Beaufay H, Rahman-Li Y, Sellinger OZ, Wattiaux R, Jacques P, De Duve C (1964) Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue. Biochem. J 92, 179-184.
3. Borst P. (1989) Peroxisomes biogenesis revisited. Biochim. Biophys. Acta 1008, 1-14.
4. Casteels M, Schepers L, Parmentier G, Eyssen HJ, Mannaerts GP (1989) Activation and peroxisomal β -oxidation of fatty acids and bile acid intermediates in liver from *Bombina orientalis* and from the Rat. Comp. Biochem. Physiol. 92B, 129-132.
5. Ciolek E, Vamecq J, Van Hoof F, Dauça M, Bautz A (1989) Developmental patterns of peroxisomal enzymes in amphibian liver during spontaneous and triiodothyronine-induced metamorphosis. Comp. Biochem. Physiol 93B, 477-484.
6. Dauça M, Calvert R, Ménard D, Hugon JS, Hourdry J (1982a) Development of peroxisomes in Amphibians. I. Cytochemical and biochemical studies on the small intestine. J. Exp. Zool 220, 235-241.
7. Dauça M, Calvert R, Ménard D, Hugon JS, Hourdry J (1982b) Development of peroxisomes in Amphibians. II. Cytochemical and biochemical studies on the liver, kidney and pancreas. J. Exp. Zool 223, 57-65.
8. Dauça M, Calvert R, Ménard D, Hugon JS, Hourdry J (1983) Development of peroxisomes in Amphibians. III. Study on liver, kidney and intestine during thyroxine-induced metamorphosis. J. Exp. Zool 227, 413-422.
9. De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelman F (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. Biochem J 60, 604-617.

10. Dwivedi RS, Alvares K, Nemali MR, Subbarao V, Reddy MK, Usman MI, Rademaker AW, Reddy JK, Rao MS (1989) Comparison of the peroxisome proliferator-induced pleiotropic response in the liver of nine strains of mice. *Toxicol. Pathol* 17, 16-26.
11. Hashimoto T (1982) Individual peroxisomal β -oxidation enzymes. *Ann. NY Acad Sci* 386, 5-12.
12. Hawkins JM, Jones WE, Bonner FW, Gibson GG (1987) The effect of peroxisome proliferators on microsomal, peroxisomal and mitochondrial enzyme activities in the liver and kidney. *Drug. Met. Review* 18, 441-515.
13. Hayashi H, Fukui K, Yamasaki F, Suga T (1984) Peroxisomes in the liver of frog, *Bombina orientalis*. *Chem. Pharm. Bull* 32, 2346-2352.
14. Hess R, Stäubli W, Riess W (1965) Nature of the hepatomegalic effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature* 208, 856-858.
15. Hoepfich PD (1965) Alanine : cycloserine antagonism. VI. Demonstration of D-alanine in the serum of guinea pigs and mice. *J. Biol. Chem* 240, 1654-1660.
16. Lalwani ND, Fahl WE, Reddy JK (1983) Detection of a naphenopin-binding protein in rat liver cytosol associated with the induction of peroxisome proliferation by hypolipidemic compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 116, 388-393.
17. Lazarow PB (1981) Assay of peroxisomal β -oxidation of fatty acids. *Methods Enzymol* 72, 315-319.
18. Lazarow PB, De Duve C (1976) A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes ; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad Sci.* 73, 2043-2046.
19. Lazarow PB, Fujiki Y (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell. Biol* 1, 489-530.

20. Lazarow PB, Shio H., Leroy-Houyet MA (1982) Specificity in the action of hypolipidemic drugs : increase of peroxisomal β -oxidation largely dissociated from hepatomegaly and peroxisome proliferation in the rat. *J. Lip. Res* 23, 317-326.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193, 265-275.
22. Malki MC, Bardot O, Lhuguenot JC, Latruffe N (1990) Expression of liver peroxisomal proteins as compared to other organelle marker enzymes in rats treated with hypolipidemic agents. *Biol. Cell* 69, 83-92.
23. Moody DE, Reddy JK (1978) The hepatic effects of hypolipidemic drugs (clofibrate, nafenopin, tibric acid and WY-14, 643) on hepatic peroxisome and peroxisome associated enzymes. *Am. J. Pathol* 90, 435-446.
24. Novikoff AB, Novikoff PM, Quintana DC (1972) Studies on microperoxisomes. II. A cytochemical method for light and electronic microscope. *J. Histochem. Cytochem* 20, 1006-1023.
25. Paget G (1963) Experimental studies of the toxicity of Atromid with particular reference to fine structural changes in the livers of rodents. *J. Atherosclerosis Res* 3, 729-736.
26. Reddy JK, Krishnakantha TP (1975) Hepatic peroxisome proliferation : induction by two novel compounds structurally unrelated to clofibrate. *Science* 190, 787-789.
27. Reddy JK, Lalwani ND (1983) Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators : evaluation of the risk of hypolipidemic drug and industrial plasticizers to humans. *CRC Crit. Rev. Toxicol* 12, 1-53.
28. Reddy MK, Lalwani ND, Qureshi SA, Reddy JK (1982) Induction of hamster hepatic peroxisomal β -oxidation and peroxisome proliferation-associated 80,000 - molecular-weight polypeptide by hypolipidemic drugs. *Hum. Toxicol* 1, 135-147.
29. Reddy JK, Lalwani ND, Qureshi SA, Reddy MK, Moehle CM (1984) Induction of hepatic peroxisome proliferation in non-rodent species including primates. *Am. J. Pathol* 114, 171-183.

- 30.Reddy JK, Moody DE, Azarnoff DL, Rao MS (1977) Hepatic catalase is not essential for the hypolipidemic action of peroxisome proliferators. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 154, 483-487.
- 31.Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol* 17, 208-213.
- 32.Svoboda DJ, Azarnoff DL (1966) Response of hepatic microbodies to a hypolipidemic agent, ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate (CPIB). *J. Cell Biol* 30, 442-450.
- 33.Svoboda DJ, Grady H, Azarnoff D (1967) Microbodies in experimentally altered cells. *J. Cell. Biol* 35, 127-151.
- 34.Svoboda DJ, Azarnoff D, Reddy JK (1969) Microbodies in experimentally altered cells. II. The relationship of microbody proliferation to endocrine glands. *J. cell. Biol* 40, 734-746.

Fig. 1 : Electron micrographs of liver cells from control (A) and clofibrate-treated *Rana esculenta* (B, C and D).

A : A few large DAB-positive structures are clearly seen x 8000. **B :** Note the presence of numerous small peroxisomes. Some exhibit elongated profiles. x 10500. **C :** Close spatial relationship between a mitochondrion, tubule of smooth endoplasmic reticulum and a peroxisome. x 19000. **D :** Formation of new peroxisomes by partition. x 34600.

M : mitochondrion, N : nucleus, P : peroxisome, ER : endoplasmic reticulum.

bar = 0,5 μ m

Fig. 2 : Electron micrographs of liver cells from control (A) and clofibrate-treated *Xenopus laevis* (B, C).

A : Catalase-positive structures are very scarce in hepatocytes. Some of them are seen adjacent to mitochondriae. x 6000. **B :** The clofibrate treatment had no apparent effect on the number of peroxisomes. x 7500. **C :** A clofibrate-treated hepatocyte containing several peroxisomes adjacent to lipid droplets. x 16000. G : glycogen ; LD : lipid droplet; M : mitochondrion ; N : nuclear ; P : peroxisome.

bar = 1 μ m

Fig.3 : Subcellular distribution of hepatic peroxisomal enzyme activities in normal (stripped areas) and clofibrate-treated (white areas) *Rana* adults. Homogenates were fractionated as described in *Materials and Methods*. The ordinates represent specific activities. The abscissas indicate relative cumulative proteins content ; N, M, L, P and S represent nuclear, heavy mitochondrial, light mitochondrial, microsomal and supernatant fractions, respectively. **A :** catalase ; **B :** Lauroyl-CoA oxidase ; **C :** Peroxisomal bifunctional enzyme ; **D :** D-amino acid oxidase.

Fig. 4 : Subcellular distribution of hepatic peroxisomal enzyme activities in normal (stripped areas) and clofibrate-treated (white areas) *Xenopus* adults. For explanations see legend of Figure 3.

Table I : Effect of clofibrate on hepatic index and on protein content of liver and of peroxisome-enriched fraction from *Rana esculenta* and *Xenopus laevis* adults.

The peroxisome-enriched fraction corresponds to the light mitochondrial fraction. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Number in square brackets corresponds to the number of individual experiments. Number in parentheses corresponds to the increase factor as compared to the control at $+P < 0.05$ and $*P < 0.01$.

Species	Treatment	Hepatic index Liver/body weight ratio (w/w)	Liver protein content (mg/g of liver)	Protein content of peroxisome- enriched fraction (mg/g of liver)
<i>Rana esculenta</i>	Controls [15]	3.9 ± 1	118.14 ± 35.21	7.21 ± 2.83
	Treated animals [5]	2.3 ± 0.5 (0.58)*	111.63 ± 32.53 (0.94)	11.52 ± 0.75 (1.59)+
<i>Xenopus laevis</i>	Controls [5]	3.6 ± 0.5	134.38 ± 24.02	4.02 ± 2.27
	Treated animals [7]	3.7 ± 0.8 (1.02)	101.41 ± 18.16 (0.75)	5.85 ± 1.28 (1.45)

Table II : Effect of clofibrate on total peroxisomal enzyme activities measured in liver homogenates of *Rana esculenta* and *Xenopus laevis*

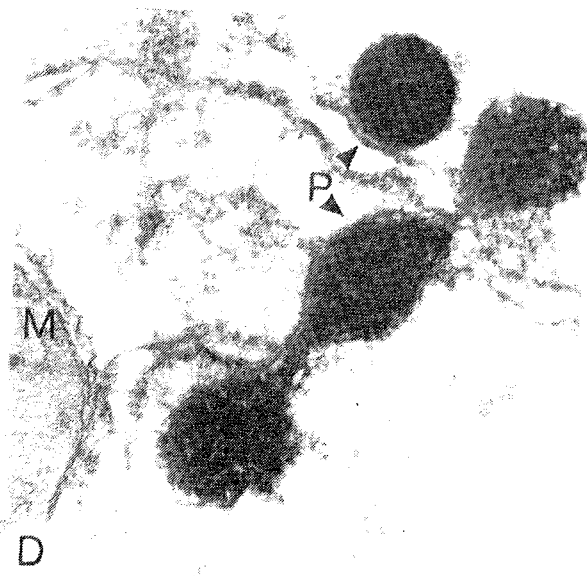
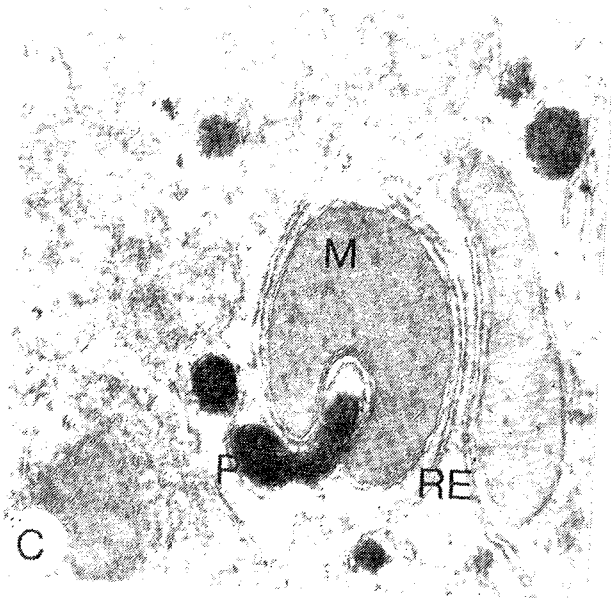
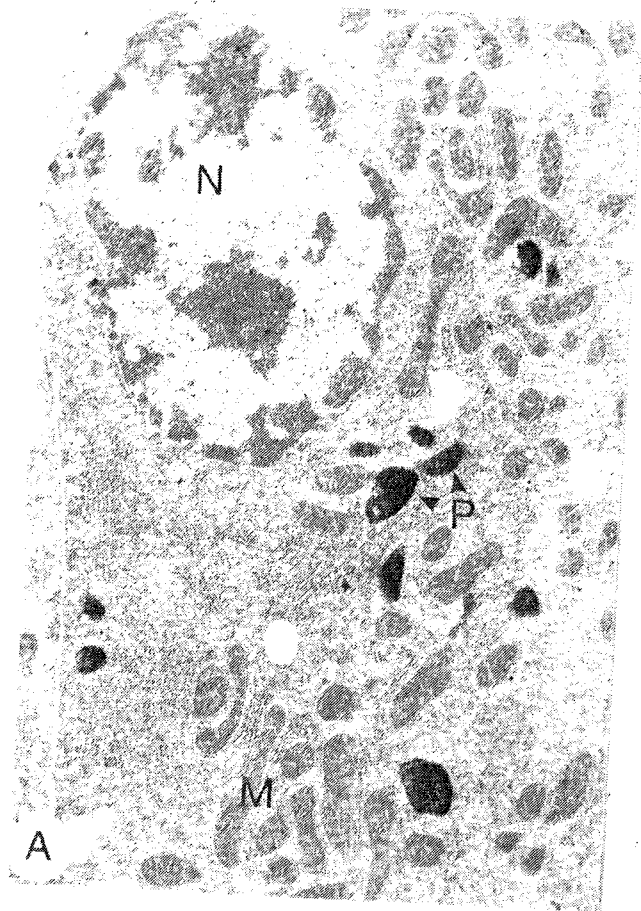
Species	Liver homogenates	Catalase		Lauroyl-coA oxidase		Peroxisomal bifunctional enzyme		D-amino acid oxidase	
		U/g liver	U/mg prot	mU/g liver	mU/mg prot	mU/g liver	mU/mg prot	mU/g liver	mU/mg prot
<i>Rana esculenta</i>	H _C	135 ± 21	1.39 ± 0.63	111 ± 10	0.96 ± 0.08	46 ± 10	0.49 ± 0.27	958 ± 279	7.56 ± 1.09
	H _T	269 ± 51	1.92 ± 0.33	115 ± 26	1.34 ± 0.35	87 ± 12	1 ± 0.02	1449 ± 28	11.7 ± 4
	H _T /H _C	1.99*	1.38	1.03	1.39 ⁺	1.89 ⁺	2.04 ⁺	1.51*	1.54
<i>Xenopus laevis</i>	H _C	51 ± 8	0.48 ± 0.08	ND	ND	ND	ND	398 ± 10	6.9 ± 2.8
	H _T	97 ± 9.4	1.01 ± 0.28	ND	ND	ND	ND	630 ± 149	6.7 ± 2.8
	H _T /H _C	1.90*	2.10 ⁺	-	-	-	-	1.58*	0.97

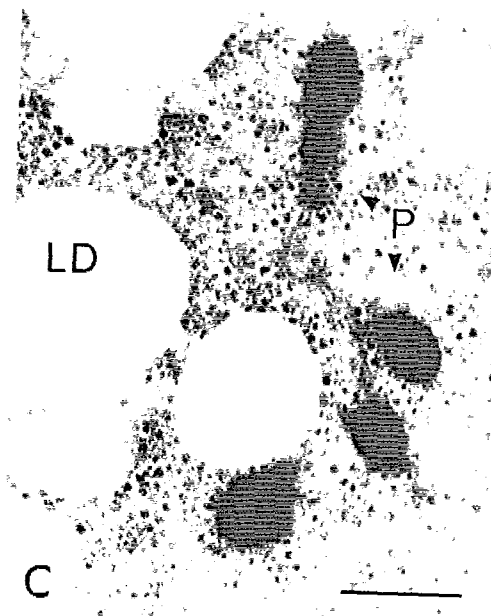
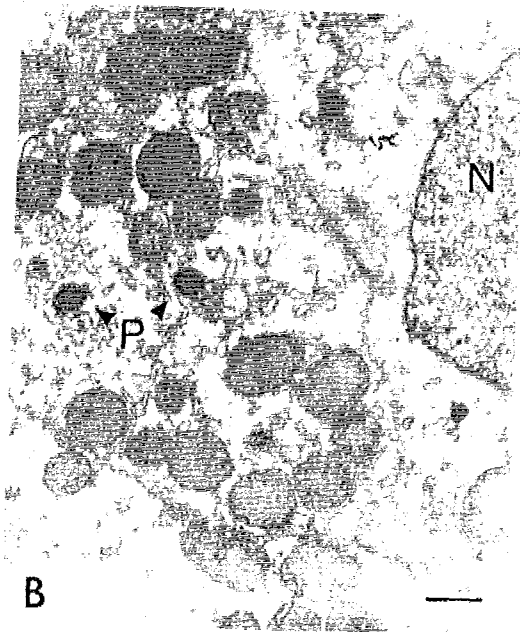
Results are expressed as mean ± standard deviation. The statistical significance of the fold increase of enzyme activities from treated animals as compared to controls (H_T/H_C) are given at ⁺P < 0.05 and *P < 0.01 (Student's *t* test). H_C : Liver homogenates of controls ; H_T : Liver homogenates of clofibrate-treated animals ; ND : not detectable.

Table III : Alterations in the hepatic peroxisomal enzyme activities of the light mitochondrial fractions from *Rana* and *Xenopus* treated with clofibrate

Species	Light mitochondrial fraction	Catalase		Lauroyl-coA oxidase		Peroxisomal bifunctional enzyme		D-amino acid oxidase	
		U/g liver	U/mg protein	mU/g liver	mU/mg protein	mU/g liver	mU/mg protein	mU/g liver	mU/mg protein
<i>Rana esculenta</i>	L _C	8.38 ± 2.12	1.59 ± 0.2	20.94 ± 3	2.49 ± 0.29	32 ± 4	3.3 ± 0.7	88 ± 17	17 ± 4.6
	L _T	28 ± 1	2.56 ± 0.2	39.52 ± 2.50	3.4 ± 0.2	61 ± 2	7.5 ± 0.2	289 ± 39	35 ± 9
	L _T /L _C	3.34*	1.61 ⁺	1.98 ⁺	1.36 ⁺	1.9*	2.27*	3.28*	2.05*
<i>Xenopus laevis</i>	L _C	2.35 ± 1.2	0.60 ± 0.1	8.33 ± 3	1.23 ± 0.19	12.01 ± 1	1.4 ± 0.15	182 ± 29	43.5 ± 5.7
	L _T	6 ± 0.58	1.09 ± 0.29	10.21 ± 2.91	2.03 ± 0.37	46 ± 2	1.6 ± 0.5	254 ± 60	48 ± 1
	L _T /L _C	2.55*	1.81 ⁺	1.22	1.65 ⁺	3.83*	1.14*	1.39	1.10

Results are expressed as mean ± standard deviation. The statistical significance of the fold increase of enzyme activities from treated animals as compared to controls (L_T/L_C) are given at ⁺P < 0.05 and *P < 0.01 (Student's *t* test). L_C : light mitochondrial fraction of controls ; L_T : light mitochondrial fraction of clofibrate-treated animals.





Specific activities

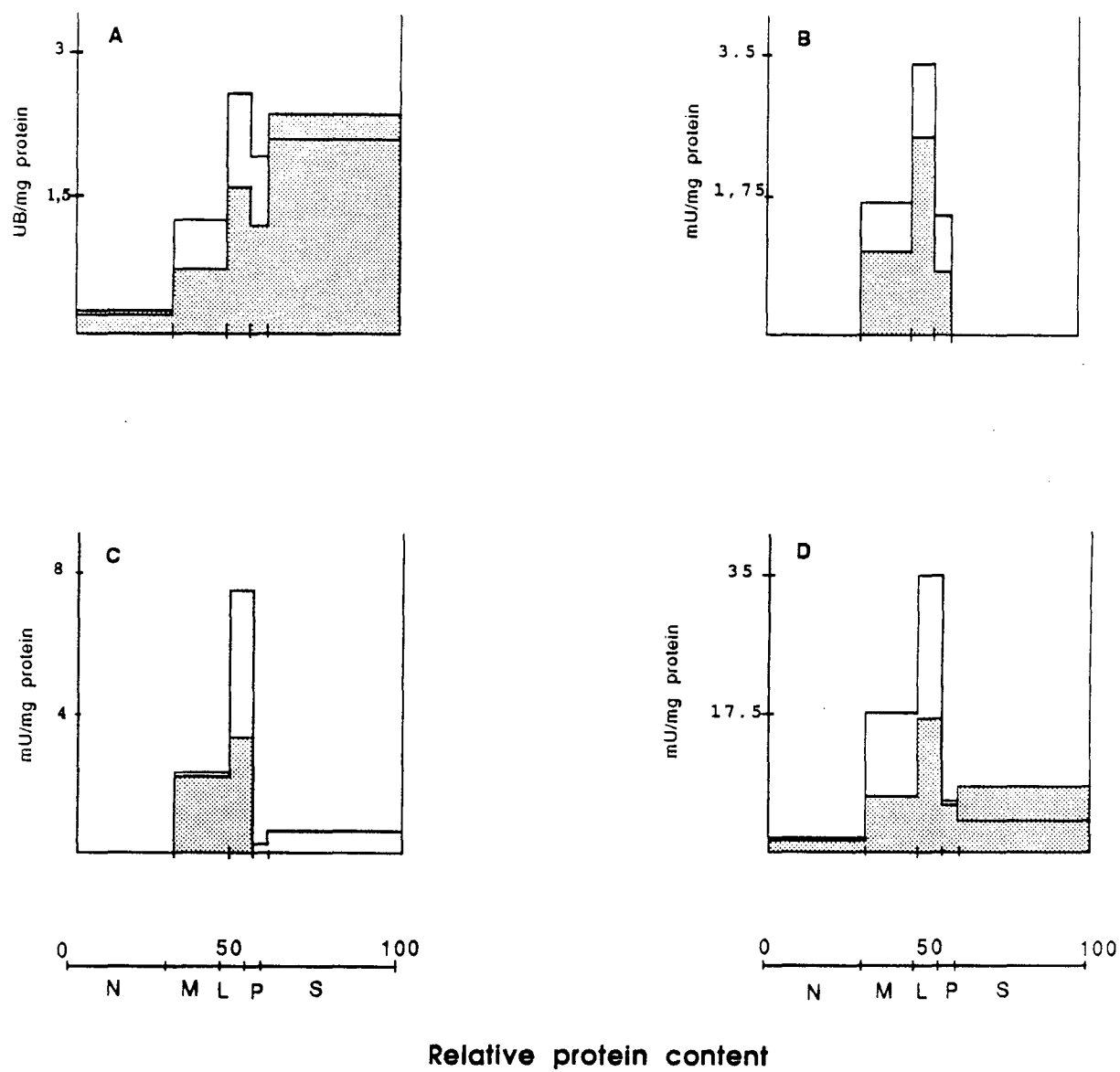


Figure 3

Specific activities

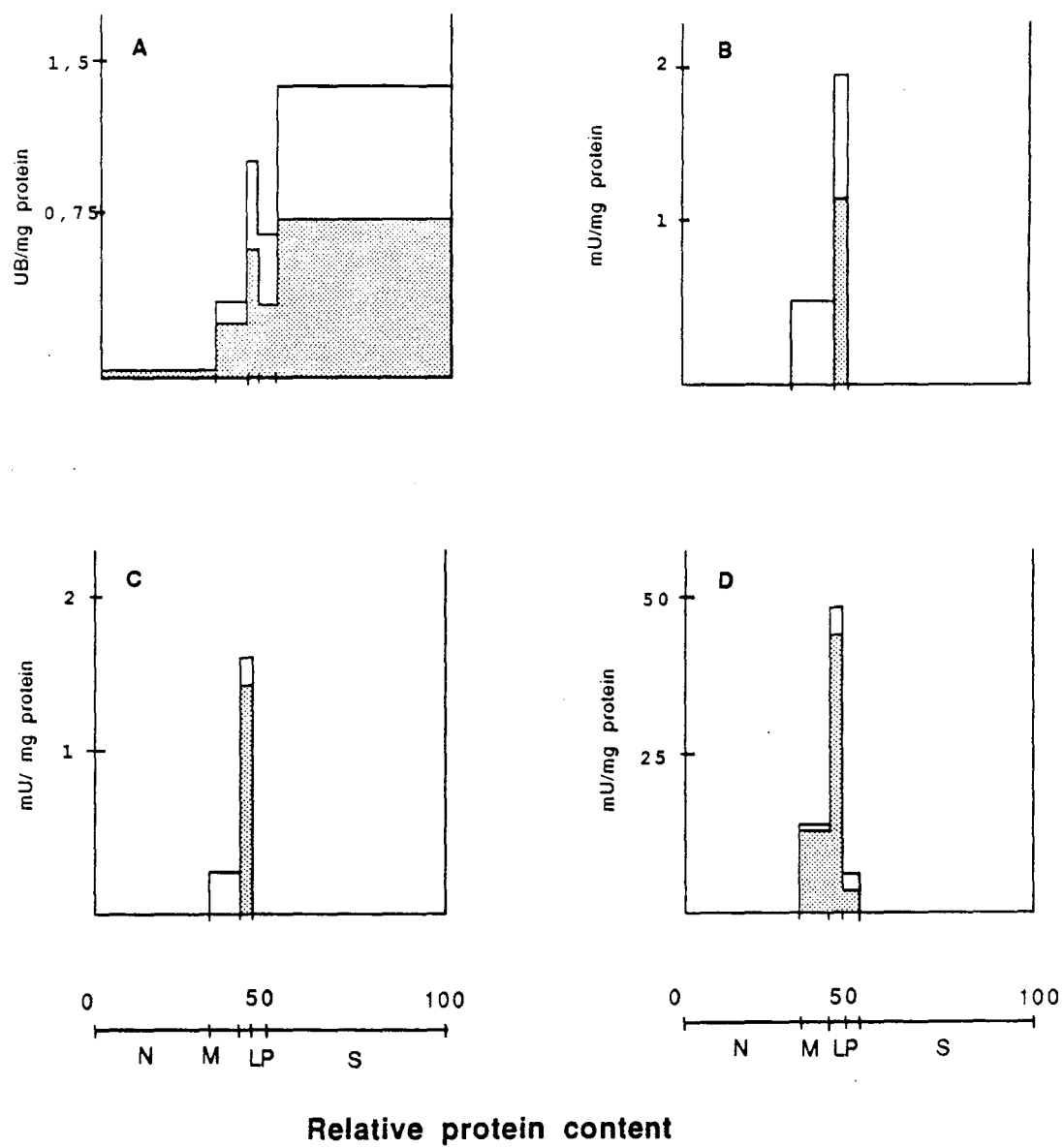


Figure 4

UNIVERSITE DE NANCY I

NOM DE L'ETUDIANT : MONSIEUR CIOLEK ERIC

NATURE DE LA THESE : DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I
EN BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

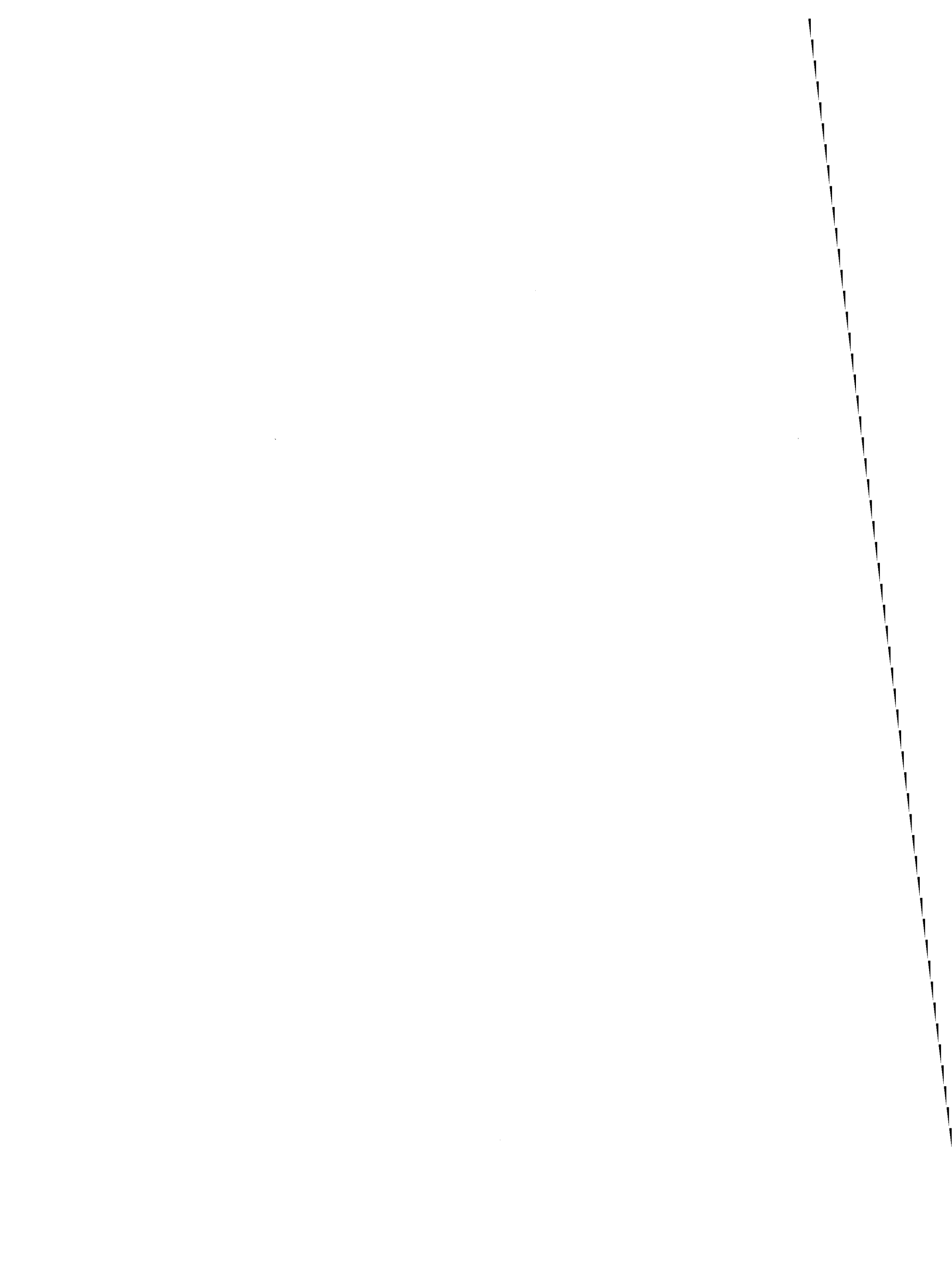
NANCY, le 10 JUL. 1991 n° 334

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



M. BOULANGÉ





Résumé

La révélation *in situ* de l'activité de la catalase par cytochimie ultrastructurale a permis de suivre l'évolution des peroxysomes hépatiques au cours de la métamorphose naturelle ou induite par la triiodothyronine (T3) chez les Amphibiens Anoures.

Les activités enzymatiques de la catalase et de diverses oxydases peroxysomales ont été analysées par dosages spectrophotométriques pendant le développement post-embryonnaire d'*Alytes obstetricans* et de *Xenopus laevis*. Des différences s'établissent dans le comportement des peroxysomes hépatiques entre les animaux dont la métamorphose s'accompagne d'un changement d'habitat (Alyte) et ceux qui restent aquatiques (Xénope). Le traitement des larves d'*Alytes obstetricans* a permis de montrer que les peroxysomes étaient sensibles à l'action de la T3.

Les effets du clofibrate sur les peroxysomes hépatiques ont été recherchés chez les Amphibiens Anoures. Cette substance est sans effet apparent sur les peroxysomes des larves d'*Alytes obstetricans*. Elle provoque une prolifération des peroxysomes hépatiques ainsi qu'une induction de leurs enzymes en particuliers celles de la β -oxydation chez *Rana esculenta* adulte (espèce terrestre) et n'induit que les activités enzymatiques peroxysomales dans le foie de *Xenopus laevis* adulte (espèce aquatique).

L'expression de la catalase et de la D-aminoacide oxydase post-embryonnaire a été étudiée chez ces différentes espèces d'Amphibiens par électrophorèse monodimensionnelle et Western blotting à partir des protéines extraites de fractions hépatiques enrichies en peroxysomes.

Mots clés : Amphibiens Anoures - Métamorphose - Foie - Peroxysomes - Catalase - Oxydases peroxysomales - β -oxydation peroxysomale - Triiodothyronine - Clofibrate.

UNIVERSITE DE NANCY I

NOM DE L'ETUDIANT : MONSIEUR CIOLEK ERIC

NATURE DE LA THESE : DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I
EN BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 10 JUL. 1991 n° 334

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

