

SHORT COMMUNICATIONS

sc 63232

L'activité α -glycérophosphate oxydase du foie de rat au cours du développement

La thyroxine augmente la consommation d'oxygène du jeune rat dès la période d'allaitement¹⁻². Par ailleurs il existe une étroite corrélation entre la fonction thyroïdiennne et l'activité d'une enzyme mitochondriale, l' α -glycérophosphate oxydase (*L*-glycérrol-3-phosphate:(accepteur) oxydoréductase, EC 1.1.99.5)³⁻⁶. Ceci nous a amené à étudier l'activité de cette enzyme au cours du développement du rat et à chercher si elle est contrôlée par la thyroïde.

Les animaux utilisés sont des mâles Wistar*, élevés à 22-23°, nourris avec l'aliment cuit UAR complémenté d'aliments frais. Les mitochondries sont préparées par une méthode dérivant de celle de SCHNEIDER⁷ pour tenir compte de leur fragilité⁸. Toutes les opérations ont lieu à 2-4°. Après décapitation et saignement des animaux, les foies sont prélevés, mis dans du saccharose 0.25 M et pesés. Ils sont coupés en morceaux, rincés deux fois et homogénéisés doucement à la main avec un homogénéiseur de Potter-Elvehjem en téflon; un gramme de foie correspond à 10 ml d'homogénat. Cet homogénat est centrifugé 5 min à 700 × g, puis le surnageant 10 min à 7000 × g. Le dépôt obtenu est homogénéisé dans du saccharose 0.25 M après que la couche superficielle ait été enlevée. Un ml de cette suspension correspond à un gramme de foie; sa teneur en protéines est déterminée par la méthode de LOWRY⁹. L'activité

TABLEAU I

ACTIVITÉ α -GLYCÉROPHOSPHATE OXYDASE HÉPATIQUE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT CHEZ LES RATS TÉMOINS (MOYENNES ± INTERVALLES DE CONFIANCE DE CES MOYENNES POUR $P = 0.95$)

Remplissage des fioles: dans le compartiment principal 1.7 ml d'eau contenant 100 μmoles KCl, 15 μmoles MgSO₄, 50 μmoles tampon phosphate (pH 7.7), 3 μmoles NaCN et 0.2 ml de suspension mitochondriale; au centre 0.2 ml KOH 10% et papier filtre, latéralement 0.4 ml d'eau contenant 2 mg de phénazine méthosulfate et 120 μmoles de DL- α -glycérophosphate. Température, 37°. Chaque mesure est faite en double avec trois manomètres avec substrat et trois sans substrat. Durée: équilibration 10 min, activation 5 min, mesure 20 min.

Poids (g)	Age post- natal (jours)	Nombre de cas	Activité α - glycérophosphate oxydase (μl d' O_2 /mg protéines par h)
4.5-5.5	-1 (21 jours post-coitum)	3	2.2 ± 1.2
5-6	0	5	4.8 ± 1.3
6.5-8.5	2	4	8.7 ± 2.6
12-14	7	5	9.7 ± 2.1
16-20	10	5	8.7 ± 2.1
25-30	14	5	9.4 ± 1.0
35-45	21	5	12.1 ± 1.9
55-65	28	5	7.5 ± 1.5
100-170	6-8 sem.	6	5.5 ± 1.3

* Avant la naissance, tous les foetus d'une même portée sont utilisés.

α -glycérophosphate oxydase est mesurée par une méthode voisine de celle de RICHERT⁴ (*cf.* Tableau I). Le premier surnageant contient 65–90% de l'activité totale de l'homogénat de foie, la fraction mitochondriale 50–70% : ceci indique un mauvais rendement de l'homogénéisation.

Le contrôle de cette fraction au microscope électronique a été fait chez le nouveau-né, après fixation par la méthode de PALADE¹⁰ et inclusion dans l'araldite. On constate une contamination par des particules microsomalement. Les mitochondries sont gonflées, leur membrane externe présente souvent des images de décollement important. Les cellules hématopoïétiques, présentes encore plusieurs jours après la naissance, ont des mitochondries plus petites et moins nombreuses que celles des hépatocytes : nous avons négligé leur présence. De plus quelques expériences faites à l'aide de la méthode manométrique, avec du succinate, semblent indiquer que les mitochondries ainsi préparées sont susceptibles de contrôle respiratoire.

L'activité α -glycérophosphate oxydase des témoins (*cf.* Tableau I) est faible en fin de gestation ; elle augmente rapidement après la naissance, conservant une valeur élevée pendant toute la période d'allaitement. Après une augmentation transitoire à la fin de cette période, l'activité redescend à partir de la quatrième semaine vers les faibles valeurs qui caractérisent les animaux plus âgés. L'injection de thyroxine augmente considérablement l'activité de l'enzyme à tous les âges (*cf.* Tableau II). La quantité de thyroxine injectée est relativement plus grande dans les premiers stades, mais elle reste dans le domaine des doses physiologiques défini par TATA¹¹ (100 µg de L-thyroxine/100 g par jour au maximum).

Chez les animaux radiothyroïdectomisés, l'activité α -glycérophosphate oxydase, déterminée à 21 jours, soit deux semaines environ après la destruction totale de la

TABLEAU II

ACTIVITÉ α -GLYCÉROPHOSPHATE OXYDASE HÉPATIQUE CHEZ DES RATS HYPERTHYROIDIENS

2 injections sous-cutanées de DL-thyroxine en solution alcaline, dans NaCl 9%, 48 h et 24 h avant la détermination de l'activité.

Age post-natal (jours)	Quantité de thyroxine reçue à chaque injection (µg)	Activité α -glycéro- phosphate oxydase (moyen- nes de trois mesures en µl d' O_2 /mg protéines per h)
2	10	39.2
12	20	54.6
23	40	35.6
6–8 sem.	40	22.3

thyroïde¹², correspond à 15% environ de celle des témoins du même âge. L'injection de thyroxine amène dans les 48 h cette activité à une valeur élevée (*cf.* Tableau III). Dans un lot de rats âgés de 21 jours élevés par une mère gavée depuis quatre semaines avec du propylthiouracile nous avons de même constaté une activité très faible (0.9 µl d' O_2 /mg Protéines par h).

L'augmentation rapide de l'activité α -glycérophosphate oxydase dans la période périnatale est à rapprocher de celle de l' α -glycérophosphate déshydrogénase cyto-

TABLEAU III

ACTIVITÉ α -GLYCÉROPHOSPHATE OXYDASE HÉPATIQUE CHEZ DES RATS RADIOTHYROIDECTOMISÉS
 $200 \mu\text{C d'}^{131}\text{I}$ en injection intrapéritonéale à la naissance et 2 injections de $20 \mu\text{g}$ de DL-thyroxine,
à 21 jours après la première mesure, et à 22 jours.

<i>Age (jours)</i>	<i>Activité α- glycérophosphate oxydase moyenne (<math>\mu\text{l d'}\text{O}_2/\text{mg protéines par h}</math>)</i>
21	2.1 (3 mesures)
23 (+ thyroxine)	17.0 (4 mesures)

plasmique (L-glycérol-3-phosphate:NAD⁺ oxydoréductase, EC 1.1.1.8) observée pendant la même période¹³⁻¹⁴: elle permet une sorte de mise en marche du cycle glycérophosphate; on peut voir dans ce phénomène une adaptation biochimique au passage de la relative anaérobiose de la vie foetale à l'aérobiose de la vie libre, puisqu'elle permet d'intensifier la glycolyse aérobie¹⁵.

Les résultats qui viennent d'être présentés montrent que la thyroïde contrôle très tôt l'activité de l' α -glycérophosphate oxydase (SHAPIRO¹⁶ vient de signaler brièvement le même résultat), mais l'absence de données quantitatives précises sur le fonctionnement thyroïdien du jeune rat ne permet pas d'affirmer que l'activité de cette enzyme est un reflet périphérique du niveau d'activité des glandes thyroïdes. Plusieurs auteurs ont montré à l'aide d'inhibiteurs de la synthèse protéique que la thyroxine induit probablement la synthèse *de novo* de l' α -glycérophosphate oxydase^{3,17}. Nous avons constaté qu'en mélangeant des mitochondries de nouveau-né (activité faible) et de rats de 21 jours (activité élevée) les activités s'ajoutent: ce résultat exclue la possibilité de la présence d'un inhibiteur ou d'un activateur diffusible qui serait sous contrôle thyroïdien.

L'activité α -glycérophosphate oxydase des mitochondries hépatiques de rat augmente après la naissance. Au moment du sevrage elle redescend vers les valeurs faibles caractéristiques de l'adulte. Cette activité est sous la dépendance des hormones thyroïdiennes. La signification biologique de cette régulation au cours du développement demande à être précisée.

Nous remercions le Professeur A. JOST, dans le laboratoire duquel ce travail a été réalisé, le Professeur A. J. ROSENBERG, le Dr P. HAHN et le Dr F. L. MARGOLIS pour leurs nombreux conseils. Nous remercions aussi Y. BOULIGAND sans lequel les observations au microscope électronique n'auraient pu être faites.

*Laboratoire de Physiologie comparée de la
Faculté des Sciences, Paris (France)*

PHILIPPE HEMON

Addendum: Depuis la rédaction de cet article nous avons cherché à préciser l'activité au moment du maximum. Les moyennes sont (3-5 mesures par stade): 11.0 à 14 jours, 13.7 à 18 jours, 11.6 à 21 jours, 10.1 à 24 jours, 9.8 à 28 jours. De plus nous avons déterminé la cinétique de la réponse à une injection unique de thyroxine à des rats radiothyroïdectomisés de 21 jours: 95% de la réponse en 48 h, maximum en 72 h, temps de renouvellement de 4 jours $1\frac{1}{2}$ -5 jours. Un article très récent indique une évolution semblable de l'activité α -glycérophosphate oxydase hépatique chez le jeune rat¹⁸. (Reçu le 29 septembre, 1966).

- 1 PH. HEMON, *J. Physiol. Paris*, 57 (1965) 385.
- 2 PH. HEMON, *J. Physiol. Paris*, 58 (1966) 41.
- 3 Y. P. LEE, A. E. TAKEMORI ET H. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 3051.
- 4 D. A. RICHERT, J. SCHENKMAN ET W. W. WESTERFELD, *J. Nutr.*, 83 (1964) 332.
- 5 W. R. RUEGAMER, W. W. WESTERFELD ET D. A. RICHERT, *Endocrinology*, 75 (1964) 908.
- 6 Y. P. LEE ET H. A. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 1427.
- 7 W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 259.
- 8 E. PERKOWSKA, *Bull. Acad. Sci. Polon.*, 8 (1960) 45.
- 9 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 10 G. E. PALADE, *J. Exptl. Med.*, 95 (1952) 285.
- 11 J. R. TATA, dans G. LITWACK ET D. KRITCHEVSKY, *Action of hormones on molecular processes*, Wiley, New York, 1964, 73.
- 12 R. C. GOLDBERG ET I. L. CHAIKOFF, *Endocrinology*, 45 (1949) 64.
- 13 G. E. BOXER ET C. E. SHONK, *Cancer Res.*, 20 (1960) 85.
- 14 H. B. BURCH, O. H. LOWRY, A. M. KUHLMAN, J. SKERJANCE, E. J. DIAMANT, S. R. LOWRY, ET P. VON DIPPE, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 2267.
- 15 G. E. BOXER ET T. M. DEVILIN, *Science*, 134 (1961) 1495.
- 16 S. SCHAPIRO, *Endocrinology*, 78 (1966) 527.
- 17 O. Z. SELLINGER ET K. L. LEE, *Biochim. Biophys. Acta*, 91 (1964) 183.
- 18 W. H. FLORSHEIM, M. A. FAIRCLOTH, N. L. CORCORAN ET P. RUDKO, *Acta Endocrinol.*, 52 (1966) 375.

Reçu le 31 mai, 1966

Manuscrit revisé reçu le 29 septembre, 1966

Biochim. Biophys. Acta, 132 (1967) 175-178

BBA 6323I

The activation of chick liver tyrosine transaminase *in vitro*

The several-fold activation of tyrosine transaminase (*L*-tyrosine:2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.5) obtained by homogenizing chick livers in α -ketoglutarate was reported in a previous paper¹. The purpose of the present study was to determine the requirements and the time course of this activation in order to assay the total enzyme. Some of these results were briefly reported².

Newly hatched White Rock chicks from a commercial supplier were fed a regular chick diet and used systematically at ages from 1 to 38 days. Since no age differences in the enzyme levels or the activations were observed, the different age groups are not separately reported. In half of the chicks the tyrosine transaminase activity was elevated by injecting hydrocortisone (2.4 mg per 100 g body wt.) intraperitoneally 4 h before killing. The livers were chilled and promptly homogenized in a Potter-Elvehjem homogenizer with 3 ml of cold 0.14 M KCl per g of liver. The homogenates were centrifuged at 100 000 \times g for 1 h and the clear supernatant fractions withdrawn carefully with a pipette to avoid contamination with the particulate fraction. The conditions of the assay and the activation are described in Table I.

If pyridoxal phosphate and α -ketoglutarate were added to fresh homogenate of livers from either treated or untreated chicks, there was more than a threefold increase in tyrosine transaminase activity, to a maximum after a 1-2-h period, as previously reported¹. A similar increase occurred if the additions were made to a liver supernatant

Biochim. Biophys. Acta, 132 (1967) 178-181