

EVOLUTION DU CONTENU NUCLEAIRE EN ADN ET PROTEINES DES
HEPATOCYTES D'*ALYTES OBSTETRICANS* (AMPHIBIENS, ANOURES)
AU COURS DE LA METAMORPHOSE SPONTANEE
ET INDUITE PAR LA TRIIODOTHYRONINE :
ANALYSE CYTOPHOTOMETRIQUE.

S. EL AMRANI^{1,2}, J.M. KELLER¹ et M. DAUÇA^{1,*}

1. Laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement, Faculté des Sciences,
Université de Nancy I, BP 239, 54506 - Vandoeuvre-les-Nancy - France

2. Département de Biologie, Faculté des Sciences Ben M'Sik, Université Hassan
II, BP 7955, Sidi Othman - Casablanca - Maroc

* A qui adresser la correspondance

TITRE SIMPLIFIE : Contenu des noyaux hépatiques au cours de la métamorphose
des Amphibiens

MOTS-CLEFS : métamorphose, amphibiens, *Alytes obstetricans*, foie, ADN,
protéines nucléaires, histones, cytophotométrie

** . Communication présentée à la séance du 10 février 1944.

RESUME

Mettant à profit la technique de cytophotométrie, l'évolution du contenu nucléaire des hépatocytes d'*Alytes obstetricans* a été analysée durant la métamorphose spontanée et induite par traitement à la triiodothyronine.

Au cours de ces évènements, le contenu nucléaire hépatique en ADN augmente suggérant que des changements se produisent dans le taux de synthèse de l'ADN. Par ailleurs, le contenu en protéines nucléaires des hépatocytes augmente aussi bien durant la métamorphose naturelle que durant le traitement hormonal. Cet accroissement est accompagné par une augmentation du taux des histones. Au cours de la métamorphose spontanée et induite, les rapports : protéines nucléaires totales/ADN et histones/ADN augmentent également.

Ces résultats indiquent que des changements surviennent dans l'activité de la chromatine et dans le métabolisme des histones des hépatocytes au cours de la métamorphose des larves d'*Alytes obstetricans*.

ABSTRACT

Using cytophotometry the evolution of nuclear content was investigated in *Alytes obstetricans* liver during spontaneous and triiodothyronine-induced metamorphosis.

During these developmental events, the nuclear DNA content increases suggesting that some changes in DNA synthetic rates occur. Furthermore, the total nuclear protein content increases during both natural and induced metamorphosis. This increase is accompanied by a rise in histone content. Increases are also noted in total nuclear protein/DNA and histone/DNA ratios.

These data indicate that in the liver nuclei of metamorphosing *Alytes* tadpoles the chromatin changes its template activity and histone metabolism.

INTRODUCTION

La métamorphose des Amphibiens représente un évènement propice pour étudier les mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes (FRIEDEN et JUST, 1970 ; ATKINSON et FRIEDEN, 1971 ; MORI *et al.*, 1978).

Sous l'action de ces facteurs humoraux, les hépatocytes des larves d'Amphibiens subissent de profonds remaniements structuraux et fonctionnels : (a) une prolifération du réticulum endoplasmique et des altérations morphologiques de cet organe ainsi que des mitochondries (TATA, 1967, 1968 ; COHEN, 1970 ; ATKINSON et FRIEDEN, 1971) et des noyaux (BENNETT et GLENN, 1970 ; BENNETT *et al.*, 1970 ; ATKINSON et FRIEDEN, 1971 ; EL AMRANI, 1988) ; (b) une augmentation de l'activité nucléaire (ATKINSON *et al.*, 1972 ; GRISWOLD et COHEN, 1972 ; KISTLER *et al.*, 1975 ; SMITH-GILL *et al.*, 1979) ; (c) un accroissement du contenu de la matrice mitochondriale en carbamyl phosphate synthetase I (COHEN, 1970) ; (d) une élévation de l'activité spécifique de la cytochrome c-oxydase mitochondriale (TATA, 1967 ; BRUCKER et COHEN, 1976) et (e) une augmentation importante de l'incorporation de précurseurs radioactifs dans l'ADN mitochondrial (CAMPBELL *et al.*, 1969 ; ATKINSON et FRIEDEN, 1971 ; ATKINSON *et al.*, 1972), des phospholipides (TATA, 1967) et des protéines (TATA, 1967).

Ces changements dans le métabolisme des hépatocytes, dans la structure et l'activité de leurs noyaux lors d'une métamorphose naturelle ou induite expérimentalement par les hormones thyroïdiennes, entraînent des modifications dans le contenu moléculaire des noyaux. Ceci peut conduire à des réarrangements moléculaires au niveau des gènes et modifier de ce fait leur activité. La chromatine est composée d'ADN, d'ARN, de protéines histones et non-histones (PNH). Les histones appartiennent à cinq types principaux. Leurs structures primaires ont été très conservées au cours de l'Evolution. Ces protéines basiques sont impliquées dans l'organisation des nucléosomes (KORNBERG, 1977 ; ISENBERG, 1979). A la différence des histones les PNH représentent un groupe complexe et divers de protéines nucléaires acides qui participent non seulement à l'organisation de la chromatine mais en régulent également l'activité (CHIU et HNILICA, 1977). Malgré de nombreux travaux consacrés au contrôle qu'exercent les hormones thyroïdiennes sur l'activité transcriptionnelle de gènes-cibles, les données concernant les effets de ces facteurs endocrines sur le contenu moléculaire des

noyaux des hépatocytes des Amphibiens et sur son évolution au cours de la métamorphose, sont encore fragmentaires. MORRIS et COLE (1978) ont signalé l'existence de changements dans le métabolisme des histones au cours du développement post-embryonnaire des larves d'Anoures. A l'aide de l'électrophorèse en gel polyacrylamide, SHIMADA *et al.* (1982) ont analysé les changements qualitatifs et quantitatifs affectant les PNH chromosomiques dans le foie des têtards de *Rana catesbeiana* lors des métamorphoses naturelle et induite par la thyroxine (T4).

L'objectif du présent travail a donc été d'analyser par cytophotométrie l'évolution du contenu en ADN et protéines des noyaux des cellules hépatiques des larves d'*Alytes obstetricans*, au cours de leur métamorphose spontanée et provoquée par traitement à la triiodothyronine.

MATERIELS ET METHODES

Métamorphose spontanée

Les expériences ont été réalisées sur des larves d'*Alytes obstetricans* récoltées dans les lavognes du Larzac (Région de Montpellier, Sud de la France). Leur stade de développement a été défini à l'aide de la Table de TAYLOR et KOLLROS (1946). Les têtards sont élevés à la température de 12°C et nourris *ad libitum* avec de la salade cuite.

Traitement par la Triiodothyronine (T3)

Afin d'empêcher toute synthèse et sécrétion d'hormones thyroïdiennes endogènes, des larves au stade XV de la prémétamorphose sont élevées à 15°C dans de l'eau contenant 5 nM de propylthiouracil (Sigma-Co, Saint-Louis, MO, USA). Ce traitement bloque le développement post-embryonnaire des têtards en prémétamorphose mais n'a pas d'effet sur leur croissance de sorte que ces larves thyrostatiques acquièrent une taille plus importante que celles normales pour un même stade de développement (HUGUES et ASTWOOD, 1944).

L'induction de la métamorphose de ces larves thyrostatiques est obtenue en les transférant dans une solution de propylthiouracil enrichie par 20 nM de 3,3',5-triiodo-L-thyronine (Sigma Co) à 20°C ± 1°C. La T3 a été choisie car elle est plus efficace que la T4 (KISTLER *et al.*, 1977). La solution d'élevage est remplacée tous les jours pendant les 9 jours que dure le traitement hormonal. Les animaux témoins sont conservés dans la solution de propylthiouracil à 20°C.

Préparation et traitement des coupes histologiques

Les échantillons hépatiques sont fixés par une solution de formaldéhyde à 10 % dans du tampon phosphate (29,3 mM de phosphate de potassium dihydrogéné et 18,5 mM de phosphate mono-hydrogéné di-sodique). Après plusieurs lavages avec ce tampon, les pièces sont déshydratées par passage dans des solutions d'alcool à concentration croissante et incluses dans la paraffine. Des sections de 8 μm d'épaisseur sont réalisées et montées sur des lames histologiques.

En vue d'effectuer des mesures du contenu nucléaire des hépatocytes en ADN, les coupes histologiques sont déparaffinées et traitées selon le protocole classique défini par FEULGEN. L'hydrolyse de l'ADN est obtenue par traitement des coupes avec de l'acide chlorhydrique (5N) pendant 30 min à température ambiante. Le traitement avec le réactif de Schiff est effectué pendant une heure à 4°C selon les conditions mises au point par COLEMAN (1938). Les coupes histologiques sont rincées trois fois avec une solution de sulfite de sodium à 5,26 mM, lavées dans de l'eau, déshydratées et éclaircies par immersion dans du xylol avant d'être montées dans du milieu Eukitt (O. KINDLER Gmb H et Co, Allemagne).

Les coupes histologiques destinées aux mesures du taux des histones sont traitées à 100°C pendant 7 minutes par de l'acide trichloracétique à 5 % (ALFERT et GESCHWIND, 1953). Elles sont ensuite colorées pendant 20 minutes par 0,01 % de Bleu de Bromophenol préparé dans du tampon Tris-HCl à 0,2 M (pH : 8,2) selon les recommandations de RINGERTZ et ZETTERBERG (1966).

D'autres sections histologiques sont colorées selon le protocole de TAS et al. (1974, 1978) afin de déterminer par cytophotométrie le contenu nucléaire en protéines totales. Après hydrolyse de l'ADN comme il a été décrit précédemment, une coloration des coupes est réalisée pendant 20 minutes par une solution de jaune naphthol S à 0,1 %.

Analyse cytophotométrique

Les absorbances relatives sont mesurées avec un cytophotomètre Leitz réglé sur les longueurs d'onde de 550, 600 et 440 nm pour les dosages concernant respectivement l'ADN, les histones et les protéines nucléaires totales. Les mesures sont effectuées avec l'objectif x45 dans les conditions optimales définies par SANDRITTER et al. (1966). Elles s'appliquent à une surface circulaire dont le diamètre est de 5,1 μm . Ces mesures sont rapportées à celles retenues pour "Blanc" en fixant l'absorbance relative à la valeur 100 lorsqu'une zone non colorée de la coupe est observée. Les résultats finaux sont exprimés en extinctions relatives (E).

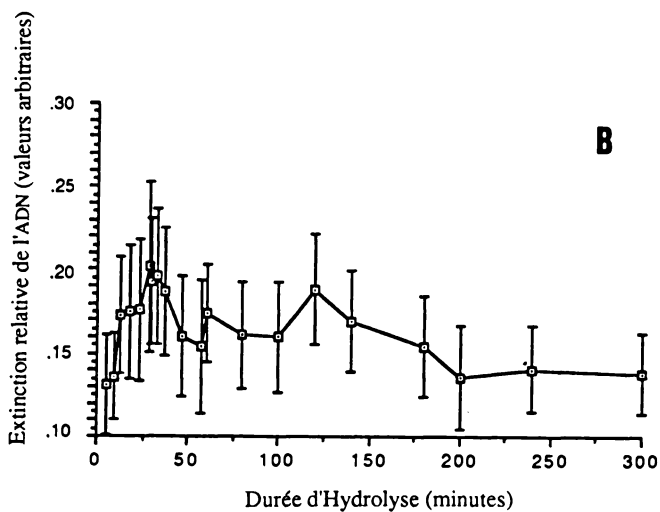
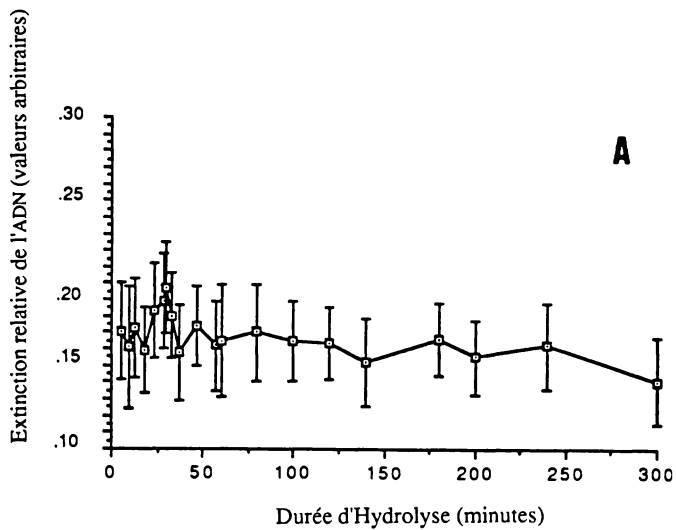


Figure 1 - Courbes d'hydrolyse de l'ADN hépatique de larves en pré-(A) et prométamorphose (B). L'hydrolyse acide est réalisée selon le protocole de FEULGEN décrit dans *Matériels et Méthodes*. Chaque point des courbes correspond à la moyenne des valeurs obtenues à la suite de 100 mesures. Les barres verticales représentent la déviation standard.

Analyse statistique

Pour chaque stade de la métamorphose spontanée ou induite par la T3, trois animaux ont été utilisés. Les analyses cytophotométriques ont été réalisées sur un minimum de 300 noyaux d'hépatocytes pour chaque étape du développement post-embryonnaire, naturel ou provoqué. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard. La déviation standard est fournie. Les différences statistiques sont définies selon le test de co-variance.

RESULTATS

Evolution du contenu en ADN

Acido-labilité de l'ADN du foie d'Alytes obstetricans

L'acido-labilité de l'ADN nucléaire des hépatocytes larvaires a été analysée au cours de l'hydrolyse pendant 5 heures par l'acide chlorhydrique 5N. Les groupements aldéhyde engendrés durant cette hydrolyse réagissent avec le réactif de Schiff engendrant une coloration rouge-violet. Les résultats obtenus avec l'ADN hépatique des larves d'*Alytes obstetricans* en pré- et prométamorphose sont illustrés dans la Figure 1.

La courbe d'hydrolyse de l'ADN présente deux pics suggérant l'existence d'une hétérogénéité de l'ADN nucléaire des hépatocytes. Un premier pic est observé après 18 minutes d'hydrolyse pour l'ADN des hépatocytes en prémétamorphose, et après 13 minutes pour l'ADN des hépatocytes en prométamorphose. Ce pic pourrait concerner de l'ADN particulièrement labile en raison d'une synthèse récente avant division cellulaire. Par ailleurs, un second pic est observé après 30 minutes (ADN des hépatocytes en prémétamorphose) ou 33 minutes (ADN des hépatocytes en prométamorphose) d'hydrolyse. Ce pic tardif concernerait l'ADN stable des hépatocytes formant la population cellulaire fixe du foie.

Sur la base de ces résultats, le temps d'hydrolyse retenu pour l'ensemble de l'étude a été fixé à 30 minutes. Ce choix est conforme à celui retenu par d'autres auteurs (LECHENAULT, 1970, 1971 ; DESSELLE, 1974 ; MELLO, 1983).

		STADES DE LA METAMORPHOSE SPONTANEE			
		Prémétamorphose	Prométamorphose	Climax	Post-climax
E X T I N C T I O N R E L A T I V E	ADN	0,151 ± 0,005 (0,053)	0,154 ± 0,0006 (0,04) ○	0,165 ± 0,0013 (0,036) *	0,180 ± 0,0001 (0,043) *
	Protéines nucléaires totales	0,329 ± 0,0043 (0,11)	0,436 ± 0,005 (0,125) *	0,545 ± 0,004 (0,106) *	0,874 ± 0,0008 (0,206) *
	Protéines nucléaires basiques	0,123 ± 0,0048 (0,046)	0,142 ± 0,001 (0,038) ○	0,151 ± 0,0012 (0,031) ▽	0,400 ± 0,0008 (0,204) *

Tableau I - Valeurs moyennes et déviations standard correspondant au contenu nucléaire en ADN, protéines totales et histones des hépatocytes larvaires d'*Alytes* au cours de la métamorphose spontanée. Pour chaque stade étudié, trois animaux ont été utilisés. Les mesures cytophotométriques ont été réalisées sur un minimum de 300 noyaux hépatiques pour chaque animal. Les différences significatives sont représentées par les symboles suivants (○ : P > 0,05 ; ▽ : P < 0,01 ; * : P < 0,001).

Métamorphose spontanée

Comme le montre le Tableau I, la moyenne de l'extinction relative de l'ADN nucléaire hépatique ne varie pas de façon significative entre la prémétamorphose (stade I) et la prométamorphose (stade XV). Par contre, une légère augmentation de cette extinction est observée entre la prométamorphose et le stade juvénile. Cette augmentation est statistiquement significative ($p < 0,001$).

Traitement par la triiodothyronine

L'absorbance relative de l'ADN a été déterminée après réalisation de la réaction de Feulgen dans les conditions optimales déjà décrites. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau II. Une augmentation significative du contenu nucléaire en ADN des hépatocytes larvaires est constatée après une période latente de 5 jours du traitement hormonal.

Evolution du contenu nucléaire en protéines totales

La coloration par le jaune de naphthol S est une technique particulièrement adaptée pour la mesure du contenu nucléaire en protéines totales grâce à la réaction de leur groupement aminé avec le colorant.

Métamorphose spontanée

Les valeurs concernant les extinctions relatives, obtenues après coloration des protéines nucléaires hépatiques durant la métamorphose naturelle des larves d'*Alytes* sont détaillées dans le Tableau I. Une augmentation significative du contenu nucléaire en protéines totales est constatée dans les hépatocytes au cours du développement post-embryonnaire naturel.

Le rapport : protéines nucléaires totales/ADN augmente dans les hépatocytes tout au long de la métamorphose spontanée des larves d'*Alytes obstetricans* (Tableau III).

Traitement par la triiodothyronine

Le traitement des larves thyrostatiques d'*Alytes* par la T3 induit une augmentation constante de l'extinction relative des protéines nucléaires hépatiques colorées par le jaune naphthol S (Tableau II). Les données cytophotométriques indiquent que le contenu nucléaire en protéines augmente dans les hépatocytes d'*Alytes* au cours de la métamorphose induite par la T3 exogène.

		METAMORPHOSE INDUITE PAR T3 (en jours de traitement)				
		2	4	5	7	9
E X T I N C T I O N R E L A T I V E	ADN	0,180 ± 0,001 (0,036)	0,168 ± 0,001 (0,036)	0,192 ± 0,001 (0,034)	0,200 ± 0,001 (0,031)	0,185 ± 0,001 (0,029)
	Protéines nucléaires totales	0,440 ± 0,004 (0,115)	0,485 ± 0,004 (0,117)	0,494 ± 0,004 (0,112)	0,573 ± 0,005 (0,141)	0,618 ± 0,005 (0,143)
	Protéines nucléaires basiques	0,129 ± 0,001 (0,028)	0,150 ± 0,001 (0,042)	0,195 ± 0,001 (0,036)	0,231 ± 0,002 (0,059)	0,295 ± 0,003 (0,079)

Tableau II - Valeurs moyennes et déviations standard concernant le contenu nucléaire en ADN, protéines totales et histones des hépatocytes larvaires d'*Alytes* durant le traitement par la T3. Pour chaque stade du traitement hormonal, trois animaux sont utilisés et les mesures sont réalisées sur un minimum de 300 noyaux hépatiques pour chaque animal traité. Les différences significatives sont représentées par les symboles suivants (O : P > 0,05 ; ∇ : P < 0,01 ; * : P < 0,001).

Une augmentation significative est aussi observée dans le rapport : protéines nucléaires totales/ADN, entre le 5^e et le 9^e jour de traitement hormonal (Tableau IV).

Evolution du contenu nucléaire en histones

Les histones sont des protéines basiques dont le point isoélectrique est élevé. Elles interagissent de ce fait facilement avec les colorants acides. Nous avons choisi la coloration mise au point par RINGERTZ et ZETTERBERG (1966), car cette technique est particulièrement adaptée pour les analyses cytophotométriques.

Métamorphose spontanée

Quand les histones des noyaux d'hépatocytes sont colorées par le bleu de Bromophénol, une augmentation faible mais significative de la moyenne des extinctions relatives est observée entre le stade I (prémétamorphose) et le stade XXIII (climax). Cet accroissement est plus important à la fin de la métamorphose (Tableau I).

Le rapport : histones/ADN est relativement stable durant les premiers stades du développement post-embryonnaire puis augmente lors de la phase finale de la métamorphose (Tableau III).

Traitement par la triiodothyronine

Les valeurs moyennes des extinctions relatives calculées à partir des données cytophotométriques concernant le contenu nucléaire en histones des hépatocytes des larves d'*Alyte* traitées par la T₃, augmentent régulièrement au cours de la métamorphose induite (Tableau II). Une augmentation de l'ordre de 2,2 fois du contenu nucléaire en histones se produit entre le 2^e et le 9^e jour de traitement hormonal.

Comme le montre le Tableau IV, le rapport histones/ADN augmente légèrement durant le traitement par la T₃. Une augmentation d'environ 2 fois est observée entre le 2^e et le 9^e jour de traitement hormonal.

DISCUSSION

Nos études cytophotométriques montrent que les métamorphoses naturelle et induite expérimentalement par la triiodothyronine exogène, sont

STADES DE LA METAMORPHOSE SPONTANEE				
	Prémétamorphose	Prométamorphose	Climax	Post-climax
Proteines nucléaires totales/ADN	2,17	2,83	3,30	4,85
Protéines nucléaires basiques/ADN	0,81	0,92	0,91	2,22

Tableau III - Evolution des rapports : protéines nucléaires totales/ADN et protéines nucléaires basiques/ADN, dans les hépatocytes des larves *d'Alytes obstetricans* durant la métamorphose spontanée.

accompagnées par des changements dans le contenu nucléaire en ADN et en protéines des hépatocytes des larves d'*Alytes obstetricans*.

Il est important de savoir si les changements moléculaires survenant dans le foie des Amphibiens au cours de la métamorphose se produisent dans une population fixe d'hépatocytes ou bien s'ils sont précédés ou s'ils accompagnent une prolifération de ces cellules. Il était classiquement admis que les hépatocytes constituent une "population cellulaire fixe" pendant la métamorphose des Anoures (COHEN, 1970 ; KISTLER *et al.*, 1975 ; VAN DENBOS et FRIEDEN, 1976 ; MORRIS et COLE, 1978). Par contre, nos résultats montrent que le contenu nucléaire en ADN augmente dans les hépatocytes d'*Alyte* au cours de la métamorphose spontanée et provoquée par la T3 exogène. Ces données concordent avec les résultats fournis par plusieurs études montrant qu'une synthèse importante d'ADN accompagnée même d'un renouvellement cellulaire se produit dans le foie des Anoures durant la métamorphose. ATKINSON *et al.* (1972) ont souligné l'existence d'une augmentation de la synthèse d'ADN nucléaire et mitochondrial et l'absence de polyploidie des hépatocytes des larves d'Anoures traitées par la triiodothyronine. KISTLER et WEBER (1975) ont constaté que les cellules hépatiques du Xénope s'hypertrophient et même entrent en hyperplasie au cours du traitement hormonal. Le nombre des cellules, la synthèse d'ADN, les pools de thymine présentent des valeurs maximales en pré-climax ou au début du climax de la métamorphose spontanée des larves de *Rana pipiens*. Ces valeurs déclinent significativement en fin de métamorphose (SMITH-GILL, 1979 ; SMITH-GILL *et al.*, 1979). Des augmentations du taux de synthèse d'ADN nucléaire sont aussi constatées dans les hépatocytes des larves de *Rana pipiens* traitées par la T3 (SMITH-GILL et CARVER, 1981). L'ensemble de ces résultats suggère que des changements se produisent dans le taux de synthèse de l'ADN nucléaire des cellules hépatiques au cours de la métamorphose spontanée et induite des larves d'Anoures.

Durant ces événements, nos résultats cytophotométriques révèlent l'existence d'une augmentation du contenu nucléaire des hépatocytes en protéines basiques. Cette constatation conforte le travail de MORRIS et COLE (1978) montrant que le taux de synthèse des histones augmente dans les hépatocytes de 190 % au 6e jour et de 133 % au 8e jour du traitement des larves de *Rana catesbeiana* par la T3. Par ailleurs, ces auteurs ont également signalé une phosphorylation accrue des histones H1 et H2a après 8 jours de traitement hormonal. Cette phosphorylation augmente de 2 à 5 fois entre le 4e et le 6e jour. Or, ces deux types d'histones sont fréquemment phosphorylés avant ou pendant la synthèse d'ADN. Par ailleurs, des analyses électrophorétiques portant sur les PNH chromosomiques des hépatocytes larvaires de *Rana catesbeiana* ont montré que ces protéines subissent des

	METAMORPHOSE INDUITE PAR T3 (en jours de traitement)				
	2	4	5	7	9
Protéines nucléaires totales/ADN	2,44	2,88	2,57	2,86	3,34
Protéines nucléaires basiques/ADN	0,71	0,89	1,01	1,15	1,59

Tableau IV - Evolution des rapports : protéines nucléaires totales/ADN et protéines nucléaires basiques/ADN, dans les hépatocytes des larves d'*Alytes obstetricans* au cours du traitement par la triiodothyronine.

changements qualitatifs et quantitatifs au cours de la métamorphose naturelle ou du traitement par la thyroxine (SHIMADA *et al.*, 1982). Un constituant nommé D3 apparaît après 3 jours de traitement par la T4. La présence de cette molécule est aussi révélée dans le foie des larves au cours de leur métamorphose spontanée. L'accroissement du taux de D3 se produit au même moment que les histones subissent une phosphorylation et que plusieurs enzymes sont induites à la suite du traitement hormonal. Nos travaux cytophotométriques montrent aussi que les rapports protéines nucléaires totales/ADN et histones/ADN augmentent tout au long de la métamorphose spontanée ou induite par la T3.

En conclusion, mettant à profit la technique cytophotométrique, la présente étude a permis de révéler l'existence de changements dans la composition moléculaire des noyaux hépatiques lors du développement post-embryonnaire naturel et induit des larves d'*Alytes obstetricans*. Il est vraisemblable que ces modifications sont associées aux remaniements survenant dans les hépatocytes au cours de la métamorphose.

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur reconnaissance à Mme F. FERHANTACHINANTE pour les facilités accordées et à Melle A. STOEKEL pour sa contribution à ce travail. Cette étude a été soutenue financièrement par l'Association de la Recherche sur le Cancer, la Ligue contre le Cancer et la Fondation de la Recherche Médicale.

BIBLIOGRAPHIE

ALFERT, M. et I.I. GESCHWIND - 1953 - A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. *Proc. nat. Acad. Sci. (USA)*, **39** : 991-999 .

ATKINSON, B.G. et E. FRIEDEN - Patterns of macromolecular biosynthesis during amphibian metamorphosis. Relationships of endocrines to growth and development. Dans : *Proceedings of the seventh Midwest Conference of Endocrinology and Metabolism*. (R.P Breitenbach and A.D Kenny, Eds). University of Missouri, Columbia, pp 48-82 (1971).

ATKINSON, B.G, K.H. ATKINSON, J.J. JUST et E. FRIEDEN - 1972 - DNA synthesis in *Rana catesbeiana* tadpole liver during spontaneous and triiodothyronine-induced metamorphosis. *Develop. Biol.*, 29 : 162-175.

BENNETT, T.P. et J.S. GLENN- 1972 - Fine structural changes in liver cells of *Rana catesbeiana* during natural metamorphosis. *Develop. Biol.*, 22 : 535-560.

BENNETT, T.P., J.S. GLENN et H. SHELDON - 1972 - Changes in the fine structure of tadpole (*Rana catesbeiana*) liver during thyroxine-induced metamorphosis. *Develop. Biol.*, 22 : 232-248.

BRUCKER, R.F. et P.P. COHEN - 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

CAMPBELL, A.M., M.H. CORRANCE, J.N. DAVIDSON et H.M. KEIR - 1969 - The metabolism of DNA in the liver during precocious induction of metamorphosis in *Rana catesbeiana*. *Proc. R. Soc. Edinburgh, B.*, 70 : 295-310

CHIU, J.F. et L.S. HNILICA - 1977 - Nuclear non-histone proteins : Chemistry et function. Dans : *Chromatin and chromosome structure* (H. Li, and R.D. Eckhardt, eds). Academic Press, New York, pp 193-254 .

COHEN, P.P. - 1970 - Biochemical differentiation during amphibian metamorphosis. *Science (USA)*, 168 : 533-543.

COLEMAN, L.C. 1938 - Preparation of leucobasic fuschin for use in the Feulgen reaction. *Stain Technol.*, 13 : 123 .

DESSELLE, J.C. - 1974 - Cytophotométrie des acides nucléiques dans les cellules musculaires de membres en régénération, de membres irradiés aux rayons X, de membres irradiés réactivés par implant de cartilage chez *Triturus cristatus*. *Acta Embryol. Exp.*, 3 : 207-235.

EL AMRANI, S. - 1988 - Différenciation cellulaire hépatique chez un Amphibien Anoure Bufonidae : *Bufo mauritanicus* (Schlegel, 1941) Thèse de Doctorat de 3ème Cycle. ENS Takaddoum, Rabat (Maroc).

FRIEDEN, E. et J.J. JUST - 1970 - Hormonal responses in amphibian metamorphosis. *Biochem. Actions Horm.*, 1 : 1-52.

GRISWOLD, M.D. et P.P. COHEN - 1972 - Alteration of deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid polymerase activities in amphibian liver nuclei during thyroxine-induced metamorphosis. *J. Biol. Chem.*, 247 : 353-359.

HARVEY, W. et B.G. ATKINSON - 1982 - Chromatin associated deoxyribonuclease activity in liver nuclei isolated from *Rana catesbeiana* froglets and premetamorphic and T3-induced tadpoles. *Can. J. Biochem.*, 60 : 21-26.

HUGHES, A.M. et E.B. ASTWOOD - 1944 - Inhibition of metamorphosis in tadpoles by thiouracil. *Endocrinology*, 34 : 138-139.

ISENBERG, I. - 1979 - Histones. *Ann. Rev. Biochem.*, 48 : 159-191.

KISTLER, A. et R. WEBER - 1975 - A combined biochemical and morphometric study on tissue changes in *Xenopus* larvae during induced metamorphosis. *Mol. cell. Endocrinol.*, 2 : 261-288.

KISTLER, A., K. YOSHIZATO et E. FRIEDEN - 1975 - Binding of thyroxine and triiodothyronine by nuclei of isolated tadpole liver cells. *Endocrinology*, 97 : 1036-1042.

KISTLER, A., K. YOSHIZATO et E. FRIEDEN - 1977 - Preferential binding of tri-substituted thyronine analogs by bull frog tadpole tail fin cytosol. *Endocrinology*, 100 : 134-137.

KORNBERG, R.D. - 1977 - Structure of chromatin. *Ann. Rev. Biochem.*, 46 : 931-954.

LECHENAULT, H. - 1970 - Etude cytophotométrique des acides nucléiques et des histones des cellules activées au cours de la régénération céphalique de l'Oligochète *Eisenia foetida* (Sav.). *Histochemistry*, 23 : 358-366.

LECHENAULT, H. - 1971 - Analyse cytochimique des histones des cellules activées au cours de la régénération céphalique de l'Oligochète *Eisenia foetida* (Sav.). *Ann. Histochem.*, 16 : 129-140.

MELLO, M.L.S. - 1983 - Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. *Histochem. J.*, 15 : 739-751.

MORI, M. et P.P. COHEN - 1978 - Antipain inhibits thyroxine induced synthesis of carbamyl phosphate synthetase I (E.C.2.7.2.5) in tadpole liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 75 : 5339-5343.

MORRIS, S.D. Jr. et R.D. COLE - 1978 - Histone metabolism during amphibian metamorphosis. *Develop. Biol.*, 62 : 52-64.

RINGERTZ, N.R. et A. ZETTERBERG. - 1966 - Cytochemical demonstration of histones and protamines. Mechanism and specificity of the alkaline Bromophenol blue binding reaction. *Exp. cell. Res.*, 42 : 243-259.

SANDRITTER, W.J., J. PILNY, V. NOVAKOVA et G. KIEFFER - 1966 - Zur Problematik der Gewebspräparation für cytophotometrische messungen. *Histochemie*, 7 : 1-17.

SHIMADA, T., K. MEZAWA et R. SHUKUYA - 1982 - Developmental changes in non-histone chromosomal proteins of Bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 72 : 261-265.

SMITH-GILL, S.J. - 1979 - DNA synthesis in *Rana pipens* tadpole liver during triiodothyronine induced metamorphosis. *Dev. Growth Differ.*, 21 : 291-301.

SMITH-GILL, S.J., J. REILLY-GARRET et E.M. WEBER - 1979 - DNA synthesis and cell turnover in *Rana pipiens* tadpole liver during spontaneous metamorphosis. *Dev. Growth Differ.*, 21 : 281-290.

SMITH-GILL, S.J. et V. CARVER - 1981 - Biochemical characterization of organ differentiation and maturation. Dans : *Metamorphosis : A problem un developmental Biology* (L.I. Gilbert and E. Frieden, eds), Plenum Press, New York, pp 491-544.

TAS, J., P. OUD et J. JAMES - 1974 - The Naphthol Yellow S stain for proteins tested in a model system of polyacrylamide films and evaluated for practical use in histochemistry. *Histochemistry*, 40 : 231-240.

TAS, J., J. JAMES et M. VAN DER PLOEG - 1978 - Adaptation of the Naphthol Yellow S staining for objects with high protein content. *Histochemistry*, 55 : 185-195.

TATA, J.R. - 1967 - The formation, distribution and function of ribosomes and microsomal membranes during induced amphibian metamorphosis. *Biochem. J.*, 105 : 783-803.

TATA, J.R. - 1968 - Hormonal regulation of growth and proteins synthesis. *Nature*, 219 : 331-337.

TAYLOR, A.C. et J.J. KOLLROS - 1946 - Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat. Rec.*, 94 : 7-23.

VAN DENBOS, G. et E. FRIEDEN - 1976 - DNA synthesis and turnover in the bullfrog tadpole during metamorphosis. *J. Biol. Chem.*, 251 : 4111-4114.