

SYNTHESES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DE CERTAINS DERIVES THYROXINIENS ET ADRENERGIQUES—VII

INFLUENCE DE DIVERS DERIVES PHENOLIQUES IODES SUR LA MONOAMINE OXYDASE HEPATIQUE DE COBAYE ET SUR LA MONOAMINE OXYDASE CEREBRALE DE RAT

RAYMOND MICHEL, ROGER TRUCHOT, NICOLE AUTISSIER et BÉATRICE ROSNER*

Laboratoires de Chimie Pharmaceutique, Ecole Nationale de Médecine et Pharmacie, et Biochimie Cellulaire I.B.A.N.A. Dijon, France

(Received 13 December 1965; accepted 9 February 1966)

Abstract—The action on hepatic and cerebral monoamine oxidase of several iodinated phenols derivated from 3:5-diiodotyramine (DITa) and thyroid hormones and some of their structural analogues was studied. The enzymatic activity was tested by a variety of methods and in addition a new technique was developed using polarographic measurement of dissolved oxygen. Iproniazid was used as standard inhibitor. 3:5-Diiodotyramine is a potent inhibitor of guinea-pig liver MAO but no effect was obtained on rat cerebral MAO. Iodothyroacetic acids [3:5-diiodothyroacetic acid (TA₂) and 3:5:3'-triiodothyroacetic acid (TA₃)] and 3:5-DL-diiodothyrooadrenaline- (TAd₂) were inhibitors of both liver and cerebral MAO. L-thyroxine (T₄) and 3:5:3'-triiodo-L-thyronine (T₃) no activity on liver MAO, whereas triiodothyronine has a relative effect on the cerebral enzyme.

L'ACTION des hormones thyroïdiennes et de certains dérivés phénoliques iodés, sur la monoamine oxydase (MAO), a fait l'objet de divers travaux dont les résultats sont contradictoires. Pour certains auteurs, la MAO hépatique est activée chez le rat thyroïdectomisé, alors qu'elle est diminuée après administration de thyroxine et dérivés.^{1, 2} Mais pour d'autres, l'activité monoamine oxydase est au contraire augmentée par les produits thyromimétiques.³ On a cru pouvoir expliquer en partie ces différences en invoquant le fait que l'activité de l'enzyme varie avec le sexe des animaux.⁴ Cependant, au cours d'essais pratiqués *in vitro*, on a semblé montrer que les thyroxiniens demeurent sans effet.² Toutefois, Fischer *et al.*, récemment, ont établi que la moniodotyramine inhibe la MAO d'origine bovine.⁵

L'action des hormones thyroïdiennes sur la MAO cérébrale n'a fait l'objet que de rares travaux, mais ces produits sont considérés comme peu actifs.⁶

Devant ces discordances, nous nous sommes proposés de reprendre les recherches dans le but de préciser l'action de divers phénols iodés sur des préparations enzymatiques obtenues soit à partir de foie de Cobaye, soit à partir de cerveau de rat.

CONDITIONS EXPERIMENTALES

Nos travaux ont porté, d'une part sur les dérivés de la 3:5-diiodotyramine (DITa)⁷ comme la 3:5-diiodo-DL-norsynéphrine (DINS)⁸, la 3:5-diiodo-DL-synéphrine

* Avec la participation technique de Paul Dumas (CNRS).

(DIS),⁹ la 3:5-di-(TN₂) et 3:5:3'-triodothyronamine (TN₃), et d'autre part sur lathyroxine et certains de ses analogues structuraux, la 3:5:3'-triodo-L-thyronine (T₃), les acides 3:5-di-(TA₂), 3:5:3'-tri-(TA₃)-iodothyroacétiques, la 3:5-diiodo-DL-thyro-N-méthyléthanolamine (TAd₂) et la 3:5:3'-triodo-DL-thyro-N-méthyléthanolamine (TAd₃). L'iproniazide (IIH) a été utilisé comme anti-MAO de référence.

La source de MAO hépatique est constituée par des mitochondries de foie de cobaye préparées selon la méthode de Schneider et Hogeboom¹⁰ en partie modifiée.¹¹ La suspension mitochondriale est conservée dans le saccharose 0,25 M, de telle sorte que 1 ml correspond à 1 g de tissu frais. Les mitochondries de cerveau de rat, isolées selon la technique de Gey et Pletscher,¹² représentent la source de MAO cérébrale. La suspension mitochondriale, dont 1 ml correspond à 400 mg de tissu frais, est gardée dans le tampon phosphate 0,2 M, pH = 7,4. Les deux préparations sont conservées congelées à -20° par petites fractions. On ne constate pas de baisse sensible de l'activité monoamine-oxydase pendant 3 semaines environ.

Les substrats aminés sont la tyramine et la sérotonine, la première étant oxydée préférentiellement par la MAO hépatique et la seconde par l'enzyme cérébral.

Les activités enzymatiques ont été suivies par des méthodes classiques, telle la détermination de la consommation d'oxygène à l'appareil de Warburg et la mesure colorimétrique de l'aldéhyde formé à partir de la tyramine dans les conditions indiquées par Green *et al.*¹³ De plus, dans le cas de MAO hépatique de Cobaye, nous avons mis au point une méthode qui comporte le dosage par polarographie de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel.

Détermination des activités enzymatiques par la méthode de Warburg

Par la méthode de Warburg, nous avons suivi l'oxydation des amines—tyramine et sérotonine—en mesurant la consommation d'oxygène en fonction du temps. Le protocole adopté pour étudier l'activité de la MAO hépatique de Cobaye est le suivant: on commence par déposer dans la fiole une prise d'essai de solution de produits iodés dans l'éthanol à 95° très légèrement sodique. Après évaporation complète du solvant sous courant d'air tiède, on ajoute 0,5 ml de suspension mitochondriale diluée au 1/4 par une solution phosphatée sodique 0,2 M, pH = 7,4, puis 0,8 ml de ce même tampon. Le bras latéral renferme 0,4 ml de chlorhydrate de tyramine 0,05 M. On agite avec précaution pendant 20 mn à 37° afin de solubiliser la fine pellicule de produit iodé. Après 2 mn d'oxygénéation et 20 mn d'agitation à 37° pour équilibrer la température du milieu, le substrat est mis en contact avec l'enzyme. La consommation d'oxygène est mesurée toutes les 5 mn pendant 15 à 20 mn. Les résultats exprimés en moles d'oxygène en fonction du temps sont rapportés soit au ml de suspension enzymatique, soit au mg de protéines mitochondrielles dosées par la réaction du biuret.¹⁴

L'activité de la MAO cérébrale de rat en présence des divers produits iodés a été conduite d'une manière identique. Le produit à étudier est traité de la même façon que précédemment. Le volume total du milieu d'incubation dans les fioles de Warburg est de 2 ml, dont 1 ml de suspension mitochondriale de cerveau de rat, 0,8 ml de tampon phosphate 0,2 M, pH = 7,2. On ajoute 0,2 ml de sérotonine 0,045 M ou, exceptionnellement, de chlorhydrate de tyramine 0,05 M, le substrat étant placé dans le bras latéral. Après oxygénéation des fioles pendant 2 mn et équilibration à 37° sous courant d'oxygène pendant 15 mn, les amines sont amenées au contact de l'enzyme.

Les mesures sont suivies pendant 1 h, de 10 en 10 mn. L'activité enzymatique est exprimée en moles d'oxygène consommé par heure et par ml de suspension mitochondriale.

Dans quelques expériences, nous avons étudié par cette technique manométrique, l'oxydation de certaines amines iodées, lesquelles se comportent alors en substrats pour les différentes préparations mitochondrielles. Le mode opératoire adopté est identique à celui que nous avons établi précédemment. Aux produits iodés évaporés dans les fioles de Warburg, on ajoute une quantité déterminée de tampon phosphate, la suspension mitochondriale étant placée dans le bras latéral. Le volume total de l'incubat est de 1,7 ml dans le cas des préparations obtenues à partir de foie de Cobaye et de 2 ml lorsque l'on opère en présence de suspension mitochondriale provenant de cerveau de Rat. Après oxygénation et équilibration de la température à 37°, l'enzyme est mis en contact avec le produit iodé. On mesure la consommation d'oxygène à intervalles de temps réguliers.

Dans tous les cas, des essais de contrôle ont été réalisés en présence de préparation enzymatique seule ou de substrat sans mitochondries, la consommation d'oxygène est alors négligeable.

La technique manométrique de Warburg présente l'avantage d'être très générale. Toutes les fois que l'on a à suivre un phénomène d'oxydation, elle permet de mesurer avec précision la quantité d'oxygène consommée quel que soit le substrat oxydable. C'est donc par cette méthode que nous avons fait systématiquement tous les essais avec les produits iodés. Mais par le fait qu'elle est très générale, nous l'avons complétée au cours de notre travail sur les préparations enzymatiques de foie de Cobaye qui oxydent préférentiellement la tyramine, par une méthode inspirée de celle de Green qui permet de déterminer spécifiquement par un dosage colorimétrique, le *p*-hydroxyphénylacétaldéhyde ayant pris naissance au cours de la réaction enzymatique.

Mesure de l'activité de la MAO hépatique de Cobaye selon la technique de Green et al.¹³

L'oxydation de la tyramine peut être suivie en dosant l'aldéhyde formé grâce à la réaction colorée obtenue avec la 2:4-dinitrophénylhydrazine. On opère en présence de semi-carbazide qui bloque la fonction aldéhydique. La technique que nous avons employée est adaptée de celle décrite par Green *et al.*,¹³ elle comporte les opérations suivantes: les produits iodés en solution dans l'éthanol à 95° légèrement sodique sont évaporés directement dans les fioles de la réaction. On ajoute, après évaporation complète, 1 ml de suspension mitochondriale d'origine hépatique diluée au 1/10e dans le tampon phosphate 0,2 M pH = 7,4. On laisse en contact à 25° pendant 20 mn. Ensuite, sont ajoutés successivement 1 ml de chlorhydrate de semicarbazide 0,05 M, 1 ml de tampon phosphate, puis, en dernier lieu, 1 ml de chlorhydrate de tyramine 0,01 M. Le mélange est agité au bain-marie à 25° pendant 30 mn. La réaction est arrêtée par 1 ml de CH₃COOH 0,5 N, et le mélange déprotéinisé par chauffage au bain-marie bouillant pendant 3 mn. Après refroidissement, les protéines sont séparées par centrifugation. A 2 ml de surnageant sont ajoutés 2 ml de 2:4-dinitrophénylhydrazine en solution à 0,5 g/l dans HCl 2 N; la réaction est abandonnée pendant 10 mn à la température du laboratoire. La dinitrophénylhydrazone qui a pris naissance est extraite par 5 ml de benzène, 4 ml de la couche benzénique sont agités avec 4 ml de NaOH 0,1 N. Au cours de ces deux extractions, il est nécessaire de centrifuger pour assurer une bonne séparation des couches. On isole la couche alcaline et la porte au

bain-marie à 80° pendant 10 mn pour transformer la coloration rouge de la dinitrophénylhydrazone en coloration jaune orange plus stable. Après refroidissement, on mesure l'intensité de la coloration au spectrophotomètre dans une cuve de 1 cm et à la longueur d'onde de 450 m μ . De cette mesure, il faut déduire la valeur du témoin privé de substrat, et traité dans les mêmes conditions que la réaction enzymatique.

Ces deux dernières méthodes, l'une très générale, l'autre plus spécifique, nous ont permis de suivre dans diverses conditions les activités enzymatiques des préparations mitochondriales de foie de Cobaye et de cerveau de Rat, en présence de tous les produits iodés étudiés. Cependant, par le fait qu'il faut un certain temps de mesure pour obtenir une réponse, il était difficile d'étudier par l'un quelconque de ces deux procédés, l'influence précoce des effecteurs enzymatiques. Pour éviter cet inconvénient, nous avons mis au point une méthode polarographique qui permet de suivre la diminution de la concentration de l'oxygène dissous.¹⁵ L'avantage de la technique que nous proposons, réside dans sa grande sensibilité: elle n'exige la mise en oeuvre que de volumes très faibles de suspensions mitochondriales et des quantités minimales de substrats, et donne une réponse immédiate.

Mesure de l'activité de la MAO hépatique par la méthode oxygraphique

La mesure de l'oxygène dissous est réalisée par polarographie au moyen d'un oxygraphe GME modèle K qui comprend une cathode vibrante en platine plongeant dans une cuve terminée par un verre fritté, lequel, grâce à un pont de solution saturée de KCl, assure le contact avec une électrode au calomel qui sert d'anode de référence. Le courant de diffusion amplifié est proportionnel à la concentration d'oxygène en solution.

Le milieu réactionnel est constitué par un tampon phosphate sodique 0,2M, pH = 7,4; la tyramine est le substrat oxydable et la préparation enzymatique est fournie par des mitochondries hépatiques de Cobaye. On opère en présence de semi-carbazide qui arrête l'oxydation au stade aldéhyde.

Les conditions opératoires adoptées sont les suivantes: on ajoute, dans la cuve, 1,5 ml de tampon phosphate sodique 0,2 M pH = 7,4, préalablement saturé par un courant d'air, puis, après équilibration à 25°, 25 μ l de suspension mitochondriale dans le saccharose 0,25 M, 20 μ l de chlorhydrate de semi-carbazide, et en dernier lieu, 25 μ l de chlorhydrate de tyramine 0,1 M. La température d'expérience est de 25°. Dans le cas des effecteurs, ces derniers sont mis au préalable en contact avec l'enzyme à l'extérieur et c'est le mélange enzyme-effecteur qui est placé dans la cuve. A l'exception de l'iproniazide et de DITa qui, pour des concentrations de l'ordre de 0,01 M sont solubles dans le tampon phosphate, tous les autres dérivés iodés sont mis en suspension dans ce même milieu. Par agitation, on obtient un mélange homogène dont on prélève une partie aliquote qui est ajoutée à 25 μ l de suspension mitochondriale, laquelle assure la solubilisation des produits essayés.

L'appareil est étalonné avec un tampon saturé d'oxygène puis avec le même tampon débarrassé de ce gaz par un système enzymatique rapide (glucose-oxydase, succino-oxydase). Il est alors possible en tenant compte des volumes de solutions, de calculer à partir de l'enregistrement obtenu à l'oxygraphe, la consommation d'oxygène des suspensions mitochondriales au cours de chaque essai (μ l/mn). L'enregistreur est réglé de telle sorte que les variations entre 0 et 100% de l'oxygène dissous correspondent à 20 cm de largeur; la vitesse de déroulement du papier est de 12 mm/mn.

Comme la quantité d'oxygène dissous à 25° dans les solutions aqueuses de faible concentration ionique est environ de 0,25 μ mole par ml et que le volume total est voisin de 1,6 ml, la quantité d'oxygène est d'environ 0,40 μ mole représentée par 20 cm en ordonnées; 1 cm correspond donc sensiblement à 0,02 μ mole. Les résultats sont exprimés en mole d'oxygène consommé par minute et par mg de protéines mitochondrielles. A titre d'exemple, nous avons représenté deux courbes types obtenues par enregistrement à l'oxygraphe(Figs. 1 et 2).

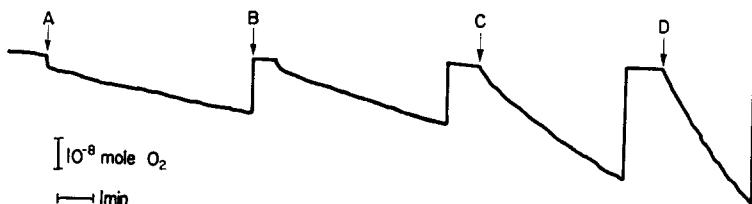


FIG. 1. Consommation d'oxygène de milieux d'incubation renfermant des doses croissantes de préparations mitochondrielles hépatiques,
Tyramine $1,5 \cdot 10^{-3}$ M. A:10 μ l, B:25 μ l, C:50 μ l, D:100 μ l.—Volume total 1,6 ml.

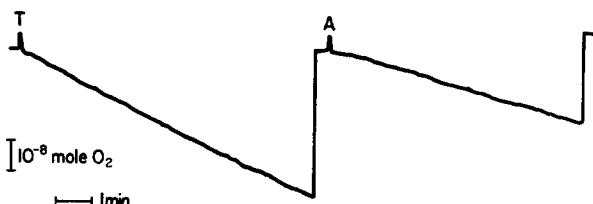


FIG. 2 Influence de DITa ($6,25 \cdot 10^{-5}$ M) (courbe A) sur l'oxydation de la tyramine ($1,5 \cdot 10^{-3}$ M)—fonction du temps en minutes présence de mitochondries hépatiques.
(T) courbe témoin sans produit iodé. Volume total 1,6 ml.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont traduits soit par des courbes représentant la consommation d'oxygène en fonction du temps, soit par des tableaux où figure l'influence des dérivés phénoliques iodés à diverses concentrations. L'iproniazide a été employé comme anti MAO de référence.

En ce qui concerne la MAO d'origine hépatique, nous constatons, comme le montrent les Figs. 3 et 4 représentant la quantité d'oxygène consommé déterminée selon la technique manométrique que DITa est un inhibiteur puissant de cet enzyme, les substrats oxydables étant de la tyramine, ou la sérotonine. Cependant, cet effet inhibiteur reste partiel et inférieur à celui obtenu avec l'iproniazide. La Fig. 5 où l'aldéhyde formé a été dosé colorimétriquement confirme ce fait.

TAd₂, TA₂ et TA₃ sont aussi des inhibiteurs puissants de la MAO hépatique (Tableau 1) alors que DINS, DIS, T₃ et T₄ sont pratiquement dépourvus d'effet. Le résultats précédents ont été confirmés par la mesure de la consommation d'oxygène A titre d'exemple, l'action de TA₃ sur l'oxydation de la tyramine est donnée par la Fig. 6.

On ne saurait rapporter l'inhibition de la MAO à la deshalogénéation éventuelle des produits iodés, puisque l'iodure, même à forte concentration, est totalement inactif. L'action anti-MAO des amines iodées pourrait être expliquée, par contre, selon un effet compétitif, car la suspension mitochondriale est capable d'oxyder DITa (Fig. 7).

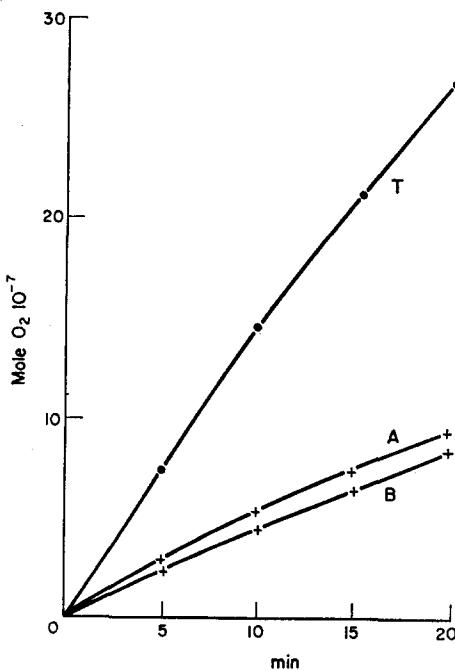


FIG. 3. Influence de la 3:5-diiodotyramine—courbe A ($1,2.10^{-3}$ M), courbe B ($2,4.10^{-3}$ M)—sur l'oxydation en 10^{-7} mole O_2 de la tyramine ($5,9.10^{-3}$ M) en fonction du temps en minutes, en présence de mitochondries hépatiques. T: courbe témoin sans produit iodé. Volume total 1,7 ml.

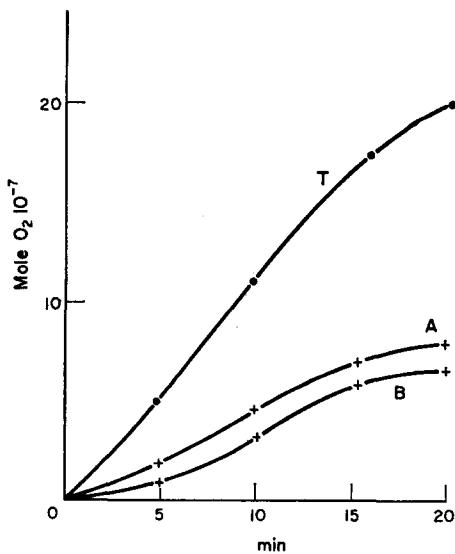


FIG. 4. Influence de la 3:5 diiodotyramine—courbe A ($1,2.10^{-3}$ M), courbe B ($2,4.10^{-3}$ M)—sur l'oxydation en 10^{-7} mole O_2 de la sérotonine ($5,9.10^{-3}$ M) en fonction du temps en minutes, en présence de mitochondries hépatiques. T courbe témoin sans produit iodé. Volume total: 1,7 ml.

La dégradation de ce produit n'est cependant que partielle et beaucoup plus lente si on la compare à celle de la tyramine; DINS et DIS inhibiteurs peu efficaces, sont encore de plus mauvais substrats. En ce qui concerne TAd_2 , son action inhibitrice vraisemblablement compétitive est difficile à apprécier car, par suite de sa très faible solubilité, on ne peut connaître sa concentration exacte dans le milieu.

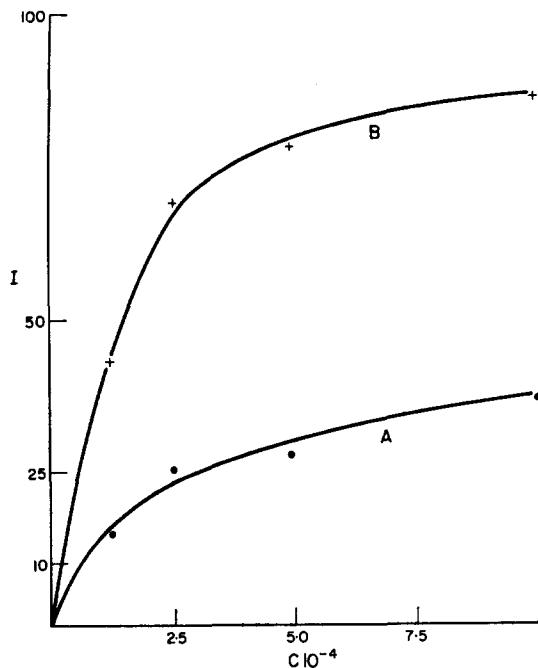


FIG. 5. Pourcentage d'inhibition (I) (ordonnées) de l'oxydation de $1.10^{-3} M$ de tyramine par des concentrations molaires (C) croissantes (abscisses) de 3:5-diiodotyramine (A) et d'iproniazide (B) en présence de mitochondries hépatiques.

TABLEAU 1. ACTION DE DIVERS PRODUITS IODÉS SUR L'OXIDATION DE LA TYRAMINE ($2.5.10^{-3} M$). VOLUME TOTAL 4 ml

Nature du produit iodé	Pourcentage d'inhibition d'oxydation de la tyramine en présence de concentrations variables de dérivé iodé					
	$2.5.10^{-5} M$	$1.25.10^{-4} M$	$2.5.10^{-4} M$	$5.10^{-4} M$	$10^{-3} M$	$2.5.10^{-3} M$
TA_2	—	—	0	16,6	25	48,5
TA_3	18	23	26	30	52	85
TA_4	—	—	2	20,9	53,5	45,4
TAd_2	13	55,3	72,3	84,6	—	insoluble
IK	—	—	—	—	—	0

Le comportement des acides iodothyroacétiques semble dû à un mécanisme tout à fait différent. La possibilité de formation d'un dérivé séquestrant le substrat par salification paraît exclue, puisque l'oxydation de la tyramine est considérablement réduite quel que soit son excès dans le milieu. On peut supposer que les acides iodés bloqueraient l'enzyme par fixation au niveau de ses groupements actifs.

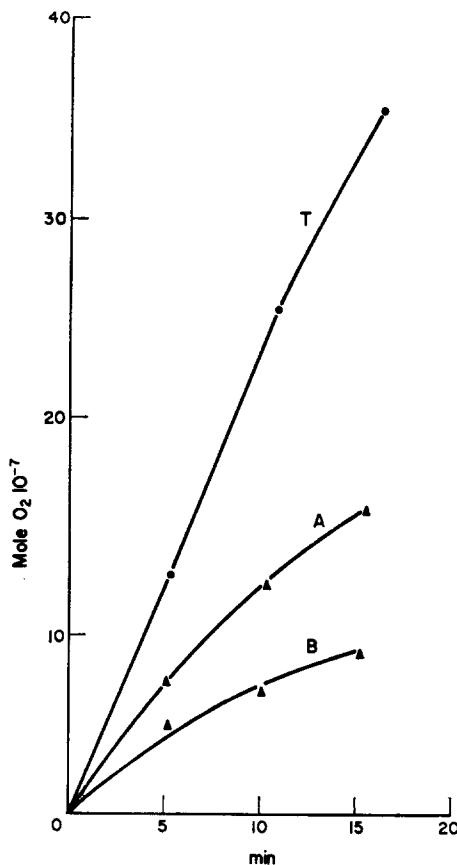


FIG. 6. Influence de TA₃ sur l'oxydation mitochondriale hépatique en 10^{-7} mole O₂ de la tyramine ($1,2.10^{-2}$ M) en fonction du temps en minutes. Courbe A: $5,9.10^{-4}$ M. Courbe B: $1,2.10^{-3}$ M. La courbe T correspond à l'oxydation de la tyramine sans produit iodé. Volume total 1,7 ml.

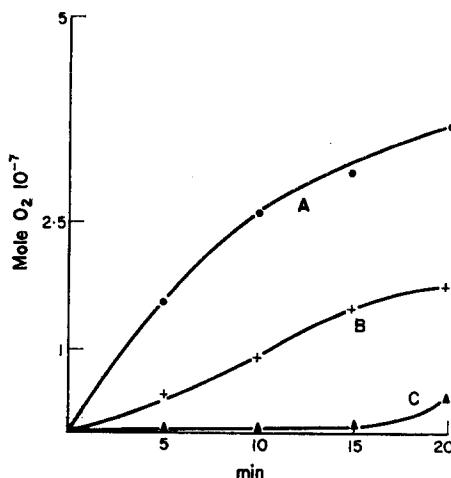


FIG. 7. Oxydation en 10^{-7} mole O₂ de DITa (courbe A), DINS (courbe B), DIS (courbe C) en fonction du temps en minutes, en présence de mitochondries hépatiques. Concentration $5,9.10^{-3}$ M. Volume total 1,7 ml.

Les résultats rassemblés dans le Tableau 2 et établis par la méthode oxygraphique confirment les observations faites précédemment. On constate de plus que des substances peu actives comme T_3 , T_4 , DIS et DINS, demeurent sans effet même lorsque leur concentration molaire est dix fois supérieure.

TABLEAU 2. EFFETS DE DIVERS DÉRIVÉS PHÉNOLIQUES IODÉS SUR LA CONSOMMATION D'OXYGÉNE DE LA SUSPENSION MITOCHONDRIALE HÉPATIQUE EN PRÉSENCE DE TYRAMINE ($1,5 \cdot 10^{-3} M$) apres 30 MN D'INCUBATION. VOLUME TOTAL: 1,6 ml

Nature du produit	Concentration molaire (M)	Consommation moyenne d' O_2 en 10^{-9} mole $O_2/mn/mg$ de protéines		Pourcentage d'inhibition
		Témoin	Avec inhibiteurs	
Iproniazide	$3,2 \cdot 10^{-5}$	$11,5 \pm 0,4$	$6,4 \pm 0,2$	44
DITa	$6,25 \cdot 10^{-5}$	$12 \pm 0,5$	$6,4 \pm 0,2$	46
TA ₃	$3,2 \cdot 10^{-4}$	$12,8 \pm 0,4$	$7,2 \pm 0,3$	43
TA ₂	$6,25 \cdot 10^{-4}$	$9,6 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,1$	50
TA _{d2}	$6,25 \cdot 10^{-4}$	$12 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,5$	43
TN ₂	$6,25 \cdot 10^{-4}$	$12 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,2$	43
T ₃	$6,25 \cdot 10^{-5}$	$15,2 \pm 0,6$	$13,6 \pm 0,5$	10
	$6,25 \cdot 10^{-4}$	$16,4 \pm 0,6$	$14,4 \pm 0,6$	14
TN ₃	$6,25 \cdot 10^{-5}$	$15,6 \pm 0,6$	$14,8 \pm 0,6$	5
	$6,25 \cdot 10^{-4}$	$14,4 \pm 0,6$	$12,4 \pm 0,5$	13
T ₄	$6,25 \cdot 10^{-5}$	$15,2 \pm 0,5$	$13,6 \pm 0,8$	10
	$6,25 \cdot 10^{-4}$	$15,6 \pm 0,5$	$12 \pm 0,7$	24
DIS	$6,25 \cdot 10^{-5}$	$15,2 \pm 0,5$	$13,6 \pm 0,5$	10
	$6,25 \cdot 10^{-4}$	$15,2 \pm 0,5$	$12,4 \pm 0,4$	18
DINS	$6,25 \cdot 10^{-5}$	$19,6 \pm 0,7$	$18 \pm 0,7$	8
	$6,25 \cdot 10^{-4}$	$19,6 \pm 0,7$	$16,4 \pm 0,6$	16
IK	$6,25 \cdot 10^{-4}$	$14 \pm 0,6$	$13,6 \pm 0,6$	3

TABLEAU 3. EFFETS DE L'IPRONIAZIDE ET DE DITA SUR LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE D'UNE SUSPENSION MITOCHONDRIALE DE FOIE EN PRÉSENCE DE TYRAMINE, ($1,5 \cdot 10^{-3} M$) SANS ET APRES 30 MN DE PRÉINCUBATION. VOLUME TOTAL 1,6 ml

Nature de l'inhibiteur	Mole O_2 consommé par mn et par mg	Pourcentage d'inhibition immédiat	Pourcentage d'inhibition apres 30 mn preincubation
Témoin	$1,2 \cdot 10^{-8}$		
DITa $6,25 \cdot 10^{-4} M$	$0,93 \cdot 10^{-8}$	22,5	46,6
Témoin	$1,15 \cdot 10^{-8}$		
Iproniazide $6,25 \cdot 10^{-5} M$	$1,05 \cdot 10^{-8}$	5,2	51,4

Par cette méthode qui permet de suivre les premiers instants de la réaction enzymatique, nous avons étudié l'influence de la préincubation sur l'action des anti-MAO. Nous avons vérifié ainsi, que l'iproniazide devait être mis en contact avec l'enzyme pendant 20 à 30 mn pour que son action soit efficace, ce qui confirme les résultats établis par d'autres auteurs.¹⁶ DITa réagit au contraire dès les premiers instants de la réaction enzymatique. L'incubation préalable de 20 à 30 min ne fait que doubler son effet, comme l'indique l'exemple donné par le Tableau 3.

Les divers phénols iodés que nous avons fait agir sur la MAO hépatique, se sont montrés efficaces sur la MAO cérébrale avec cependant, quelques différences de comportement. Les résultats de l'action des divers produits étudiés sur l'oxydation de la sérotonine sont rassemblés dans le Tableau 4. L'influence de TA₃ est représentée, à

TABLEAU 4. ACTION DE DIVERS PRODUITS SUR L'OXYDATION DE LA SÉROTONINE (4,5.10 M PAR LES MITOCHONDRIES CÉRÉBRALES. VOLUME TOTAL 2 ml

Nature du produit	Concentration molaire M	Consommation moyenne d'O ₂ en mole O ₂ /heure/ml de suspension	Pourcentage d'inhibition
Témoin	—	(2,15 ± 0,13).10 ⁻⁶	—
IIH	5 .10 ⁻⁵	(2,90 ± 0,20).10 ⁻⁷	87
	2,5.10 ⁻⁴	(4,10 ± 0,29).10 ⁻⁷	81
	5 .10 ⁻⁴	(2,80 ± 0,19).10 ⁻⁷	87
T ₃	10 ⁻³	(2,07 ± 0,14).10 ⁻⁶	4
	2,5.10 ⁻³	(1,58 ± 0,11).10 ⁻⁶	27
	5 .10 ⁻³	(1,30 ± 0,09).10 ⁻⁶	40
T ₄	10 ⁻³	(2,15 ± 0,23).10 ⁻⁶	—
	2,5.10 ⁻³	(2,08 ± 0,22).10 ⁻⁶	3
	5 .10 ⁻³	(1,94 ± 0,22).10 ⁻⁶	10
TA ₂	10 ⁻³	(1,62 ± 0,11).10 ⁻⁶	25
	2,5.10 ⁻³	(1,10 ± 0,07).10 ⁻⁶	49
	5 .10 ⁻³	(5,17 ± 0,30).10 ⁻⁶	76
TA ₃	10 ⁻³	(2,07 ± 0,16).10 ⁻⁶	4
	2,5.10 ⁻³	(1,47 ± 0,12).10 ⁻⁶	32
	5 .10 ⁻³	(6,65 ± 0,50).10 ⁻⁷	70
TAd ₂	10 ⁻³	(4,64 ± 0,32).10 ⁻⁷	79
	2,5.10 ⁻³	(2,85 ± 0,29).10 ⁻⁷	87
	5 .10 ⁻³	(1,69 ± 0,22).10 ⁻⁷	92
TAd ₃	10 ⁻³	(1,81 ± 0,20).10 ⁻⁶	16
	2,5.10 ⁻³	(1,76 ± 0,20).10 ⁻⁶	18
DITa	10 ⁻³	(1,97 ± 0,15).10 ⁻⁶	8
	2,5.10 ⁻³	(2,16 ± 0,17).10 ⁻⁶	—
	5 .10 ⁻³	(1,79 ± 0,14).10 ⁻⁶	17
DINS	10 ⁻³	(2,39 ± 0,19).10 ⁻⁶	—
	2,5.10 ⁻³	(1,90 ± 0,15).10 ⁻⁶	11
	5 .10 ⁻³	(1,50 ± 0,12).10 ⁻⁶	30
DIS	10 ⁻³	(1,83 ± 0,15).10 ⁻⁶	15
	2,5.10 ⁻³	(1,76 ± 0,14).10 ⁻⁶	18
	5 .10 ⁻³	(1,72 ± 0,14).10 ⁻⁶	20
IK	5 .10 ⁻³	(2,05 ± 0,10).10 ⁻⁶	5
	10 ⁻²	(2,03 ± 0,10).10 ⁻⁶	6

titre d'exemple, par la Fig. 8. On remarque que les acides iodothyroacétiques, de même que TAd₂, sont des inhibiteurs puissants de la MAO cérébrale de Rat, comme dans le cas de la MAO hépatique de Cobaye. Cependant, étant donné que TA₃ ne possède un effet notable qu'à des concentrations voisines de celles substrat aminé, on ne peut pas rejeter, dans ce cas particulier, la possibilité de la formation d'un sel insoluble avec la sérotonine.

T_4 et TAd_3 n'influencent pas sensiblement la vitesse de désamination de la sérotonine, très vraisemblablement à cause de leur insolubilité.

Quant à T_3 , son effet, bien que faible, est néanmoins significatif, ce qui n'est pas observé dans les expériences effectuées sur les préparations mitochondriales hépatiques.

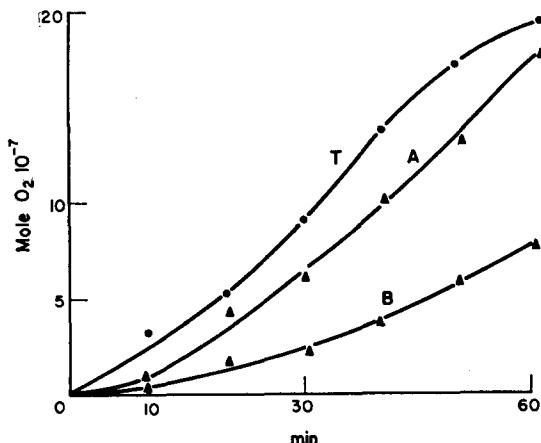


FIG. 8. Influence de TA_3 sur l'oxydation en mole O_2 de la sérotonine ($4.5 \cdot 10^{-3}$ M) par les mitochondries cérébrales, en fonction du temps en—minutes Courbe A: $2.5 \cdot 10^{-3}$ M—Courbe B: $5.0 \cdot 10^{-3}$ M T: courbe d'oxydation de la sérotonine sans produit iodé. Volume total 2 ml.

Enfin, DITa qui était un inhibiteur puissant de la MAO hépatique, se montre peu efficace vis-à-vis de la MAO cérébrale. Il ne s'oppose que faiblement et à fortes concentrations à l'oxydation aussi bien de la sérotonine que de la tyramine, ce qui semble montrer que les deux enzymes sont de nature différente.

CONCLUSIONS

La diiodotyramine est un inhibiteur puissant de la MAO hépatique de Cobaye, par contre, elle est dépourvue d'effet sur la MAO cérébrale de Rat. Un effet compétitif peut être invoqué pour expliquer son action, puisqu'elle est susceptible d'être faiblement oxydée par les préparations enzymatiques.

Les acides iodothyroacétiques, ainsi que TAd_2 sont des inhibiteurs énergiques à la fois de la MAO hépatique et de la MAO cérébrale, avec toutefois des différences de comportement. Il semble, en effet, que leur mode d'action ne soit pas le même sur les deux préparations mitochondriales. La possibilité de la formation d'un sel insoluble avec la sérotonine n'est pas exclu. Dans les autres cas, on peut supposer que l'enzyme est bloqué par fixation du produit iodé sur les groupements actifs.

La thyroxine et les dérivés iodés de la synéphrine et de la norsynéphrine (DIS, DINS) sont sans effet aussi bien sur la MAO cérébrale que sur la MAO hépatique.

La triiodothyronine présente une action anti-MAO significative sur l'enzyme du cerveau.

Enfin, l'action particulière des dérivés iodés vis-à-vis de la MAO suivant qu'elle est d'origine hépatique ou cérébrale permet de considérer que la nature des deux enzymes est différente.

Les implications physiologiques et pharmacologiques de l'inhibition de la MAO hépatique ou cérébrale par certains produits iodés sont difficiles à évaluer. Néanmoins,

une première constatation s'impose : on ne doit pas s'attendre à une activité biologique anti-MAO prolongée avec les thyroxiniens chez l'animal en raison du fait que les quantités nécessaires pour obtenir un effet freinateur significatif, sont trop élevées. Cependant, comme il apparaît par mesure oxygraphique que TA_3 agit à faible concentration, il ne faut pas exclure pour celui-ci un éventuel effet précoce et fugace. La même éventualité est encore plus vraisemblable avec TAd_2 ; il serait d'ailleurs intéressant d'étudier son action anti-MAO chez l'animal car cette substance synthétique est pratiquement dépourvue de propriétés adrénnergiques et thyroïdiennes.¹⁷ En ce qui concerne la diiodotyramine et ses dérivés dont on a montré que les activités sympathomimétiques chez le chien exigeaient des doses de l'ordre de 10^{-6} mole/kg (18), il est permis de supposer, qu'à doses semblables, ces produits seraient capables d'affecter la monoamine oxydase chez l'animal.

RESUME

Des recherches ont été effectuées dans le but de préciser l'action de divers phénols iodés dérivés de la 3:5-diiodotyramine (DITa), d'hormones thyroïdiennes et de certains de leurs analogues structuraux sur la monoamine oxydase (MAO) hépatique et cérébrale.

L'activité enzymatique a été suivie par des méthodes classiques, telles la détermination de la consommation d'oxygène et la mesure colorimétrique de l'aldéhyde formé et par une technique originale basée sur le dosage polarographique de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel.

L'iproniazide a été utilisé comme substance de référence. La DITa s'avère un inhibiteur puissant de la MAO hépatique de Cobaye mais elle est dépourvue d'effet sur l'enzyme cérébral de rat. Les acides 3:5-di-(TA_2) et 3:5:3'-tri-(TA_3) iodothyroacétiques et la 3:5-diido-DL-thyroadrénaline (TAd_2) sont des inhibiteurs énergiques de la MAO, quelle que soit son origine, hépatique ou cérébrale. La L-thyroxine (T_4) et la 3:5:3'-triodo-L-thyronine (T_3) sont sans effet sur l'enzyme du foie; cependant T_3 présente une activité inhibitrice significative sur celui du cerveau.

BIBLIOGRAPHIE

1. A. SPINKS et J. H. BURN, *Br. J. Pharmac.* **7**, 93 (1952).
2. M. ZILE et H. A. LARDY, *Archs Biochem. Biophys.* **82**, 411 (1959).
3. E. WESTERMANN, *Archs exp. Pathol. Pharmakol.* **228**, 159 (1959).
4. R. J. WURTMANN, I. J. KOPIN et J. AXELROD, *Endocrinol.* **73**, 63 (1963).
5. A. G. FISCHER, A. R. SCHULZ et L. OLINER, *47th Meeting of the Endocrine Society*, New York, June 1965.
6. M. H. ZILE, *Endocrinol.* **66**, 311 (1960).
7. R. MICHEL, J. KLEPPING, H. TRON-LOISEL et J. P. DIDIER, *Biochem. Pharmac.* **13**, 1593 (1964).
8. R. MICHEL, R. TRUCHOT et B. POILLOT *C. R. Séanc. Soc. Biol.* **157**, 1959 (1963).
9. R. MICHEL, J. KLEPPING, R. TRUCHOT et H. TRON-LOISEL, *Biochem. Pharmac.* **12**, 717 (1963).
10. G. M. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER, et G. E. PALLADE, *J. biol. Chem.* **72**, 619 (1948).
11. J. ROCHE, J. E. RALL, R. MICHEL, O. MICHEL, et S. VARRONE, *Biochem. biophys. Acta* **56**, 188 (1962).
12. K. F. GEY, et A. PLETSCHER, *J. Neurochem.* **6**, 239 (1961).
13. A. GREEN et T. A. M. HAUGHTON, *Biochem. J.* **73**, 172 (1961).
14. P. FLEURY, J. COURTOIS et R. EBERHARD, *Ann. Biol. Clin.* n° 10, 11, 12, 512, (1959).
15. R. MICHEL, R. TRUCHOT, B. ROSNER et N. AUTISSIER, *C.R. Séanc. Soc. Biol.* **159**, n° 5, (1965).
16. E. A. ZELLER, J. BARSKY et E. R. BERMAN, *J. biol. Chem.* **214**, 267 (1955a).
17. R. MICHEL, J. KLEPPING, R. TRUCHOT et H. TRON-LOISEL, *Biochem. Pharmac.* **12**, 741 (1963).
18. J. KLEPPING, R. MICHEL, R. TRUCHOT, H. TRON-LOISEL et S. BRIET, *Biochem. Pharmac.* **12**, 729 (1963).