

INFLUENCE DU DIIDO-3,5-HYDROXY-4-BENZOATE DE *n*-BUTYLE SUR LES FONCTIONS DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES ET CORTICOSURRENALIENNES DE RAT

JACOB BOUHNİK, ODETTE MICHEL, ANDRÉ LEBLANC et RAYMOND MICHEL*

Endocrinologie, UER des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris-Luxembourg,
4, Avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06. Biochimie Générale et Comparée,
Collège de France, 75231 Paris Cedex 05, France

(Received 14 April 1973; accepted 10 July 1973)

Abstract—The effect of *n*-butyl-3,5-diiodo-4-hydroxybenzoate (DIBB), considered to be an antithyroxine drug, on the oxidative phosphorylation of mitochondria isolated from rat liver and adrenal cortex was studied.

In the presence of liver mitochondria the iodinated compound inhibited state 3 oxidation, stimulated state 4 oxidation and lowered P/O ratio when β -hydroxybutyrate, succinate, glutamate-malate and malate-isocitrate were used as substrates. The Lineweaver-Burk plot of DIBB inhibition of the rate of O₂ consumption with variable concentrations of substrates, in the presence of ADP, produced straight lines. The inhibition was non-competitive, with succinate and competitive, with β -hydroxybutyrate. The swelling of liver mitochondria induced by DIBB was faster and more pronounced than with thyroxine at similar concentrations.

Oxygen consumption by adrenal cortex mitochondria was activated by DIBB at low concentrations in respiratory states 3 and 4. When DOC replaced ADP the 11 β -hydroxylation rate was decreased by the iodinated product.

It is possible that there are at least two distinct sites at which DIBB can inhibit respiration; one site being probably located in the respiratory chain close to the entry of dehydrogenases and a second site in relation with the coupling of high-energy intermediates. The effects of DIBB on oxidative phosphorylation of rat mitochondria which are similar in some aspects to those observed with thyroid hormones could explain its antithyroxine activity.

LES DÉRIVÉS de l'acide diiodo-3,5-hydroxy-4-benzoïque et, en particulier, son ester butylique s'opposent à l'effet calorigénique de la thyroxine.¹ Le diiodo-3,5-hydroxy-4-benzoate de *n*-butyle (DIBB) inhibe le métabolisme périphérique de la thyroxine,² ce qui l'a fait considérer comme un anti-thyroxinien périphérique, et augmente le stockage de la thyroglobuline dans la glande thyroïde, retardant ainsi la sécrétion des iodothyronines.³ Il semble intervenir aussi au niveau hypophysaire pour diminuer la sécrétion de thyroïdostimuline.⁴ Le DIBB administré à l'animal n'active pas son métabolisme basal, contrairement au dinitro-2,4-phénol (DNP)¹ bien que, comme ce dernier, il découple les phosphorylations des oxydations des mitochondries isolées⁵ et empêche le gonflement de ces particules provoqué par la thyroxine.⁶

Nous nous sommes proposé d'étudier les effets du DIBB sur les mécanismes des oxydophosphorylations des mitochondries hépatiques. Nous avons complété ces recherches par des travaux sur l'influence de ce produit sur les propriétés des oxydases à fonctions multiples des mitochondries corticosurrénales de rat.

* Avec l'assistance technique de Mlle B. Souillat (C.N.R.S.).

METHODES EXPERIMENTALES

Les essais sont réalisés sur des rats mâles Wistar. Les mitochondries hépatiques sont préparées et conservées dans le saccharose 0,25 M,^{7,8} celles de la corticosurrénale dans le saccharose 0,33 M.⁹ La concentration en protéines est déterminée par la réaction du biuret;¹⁰ elle est comprise entre 20 et 40 mg/ml. Les mesures de la respiration et des phosphorylations mitochondriales sont effectuées par polarographie à 25°C au moyen d'une électrode vibrante de platine recouverte d'une membrane de polyéthylène.

Le milieu tampon (pH = 7,4) des mitochondries hépatiques possède la composition suivante: K_2HPO_4 13 mM, KH_2PO_4 3 mM, $MgCl_2$ 6 mM, KCl 58 mM, NaCl 30 mM. L'ADP (0,2 à 0,4 mM) est ajouté dans certains essais. Les substrats employés sont soit le succinate 6 mM en présence de roténone 0,7 μ g/ml, soit le β -hydroxybutyrate 12 mM, soit les mélanges glutamate (6,7 mM), malate (3,3 mM) ou malate (10 mM), isocitrate (10 mM); 2 mg de protéines mitochondriales sont utilisés dans un volume final de 1,6 ml.

Le milieu tampon (pH = 7,4) des mitochondries corticosurrénaliennes comprend: KCl 20 mM, tampon phosphate (pH = 7,4) 10 mM, triéthanolamine 15 mM, $MgCl_2$ 5 mM, saccharose 0,25 M.¹¹ Le substrat est le mélange malate (10 mM), isocitrate (10 mM) en présence de malonate 3 mM. La désoxycorticostérone, le dinitro-2,4-phénol, le DIBB sont dissous dans une solution éthanolique ($H_2O-C_2H_5OH$ 1:1 v/v).

La réaction de synthèse de corticostérone à partir de désoxycorticostérone est arrêtée par addition de 1 ml de $HgCl_2$ (0,5%). La corticostérone formée est extraite par 10 ml de dichlorométhane puis dosée par fluorimétrie.¹²

Les essais sur l'effet morphologique du DIBB sont conduits comme précédemment.¹³ Dans des tubes calibrés de 12 mm de diamètre intérieur, on ajoute à 5 ml de tampon Tris 0,02 M-KCl 0,125 M (pH = 7,2) 50 à 70 μ l de suspension mitochondriale renfermant 25 mg environ de protéine par ml. Plusieurs composés iodés sont utilisés, ils sont ajoutés 4 min après le début de la réaction. Les changements de turbidité sont déterminés par mesure de la densité optique à 520 nm.

RESULTATS

Les effets du DIBB sur les fonctions des mitochondries isolées sont enregistrés et les tracés oxygraphiques, dont un exemple est donné pour les mitochondries corticosurrénaliennes (Fig. 3), ont permis de calculer les vitesses respiratoires.

(I) Effets du DIBB sur les mitochondries hépatiques

Respiration contrôlée (état 4)

Dans les Tableaux 1 et 2 sont rassemblées les moyennes des vitesses respiratoires des mitochondries hépatiques placées en état 4 en présence de quatre substrats différents et après addition de DIBB à concentrations croissantes. Elles sont exprimées en nmoles $O_2 \times \min^{-1}$ et par mg de protéine dans 1 ml. On constate que les plus faibles concentrations de DIBB stimulent la consommation mitochondriale d' O_2 tandis que les plus fortes l'inhibent. La concentration optimale de l'ester butylique pour laquelle l'activation respiratoire est maximale est de 1 μ M environ avec le

TABLEAU 1. INFLUENCE DU DIIDO-3,5-HYDROXY-4-BENZOATE DE *n*-BUTYLE (DIBB) A CONCENTRATIONS CROISSANTES SUR LA VITESSE RESPIRATOIRE DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DANS L'ETAT CONTROLE EN PRESENCE DE SUCCINATE (6 mM) OU DE β -HYDROXYBUTYRATE (12 mM) COMME SUBSTRATS

DIBB (μ M)	Succinate		β -hydroxybutyrate	
	Vitesse respiratoire	Effet (%)	Vitesse respiratoire	Effet (%)
0	8,2 \pm 1,1 (4)		4,8 \pm 0,3 (6)	
0,5	11,9 \pm 1,7 (4)*	+31	8,6 \pm 0,9 (6)*	+80
0	8,2 \pm 1,1 (4)		5,3 \pm 1,1 (5)	
1,0	13,5 \pm 1,9 (4)*	+65	9,7 \pm 1,5 (5)*	+85
0	8,2 \pm 1,1 (4)		5,7 \pm 1,4 (4)	
2,5	7,9 \pm 1,0 (4)†	-4	8,4 \pm 1,1 (4)*	+47
0	8,2 \pm 1,1 (4)		6,1 \pm 1,9 (4)	
5,0	6,2 \pm 0,7 (4)†	-24	7,4 \pm 1,3 (4)†	+21
0	10,2 \pm 0,8 (4)		5,5 \pm 1,1 (4)	
7,5	6,2 \pm 0,7 (4)*	-39	6,1 \pm 0,7 (4)†	+11
0	10,0 \pm 0,8 (4)		4,6 \pm 0,2 (7)	
15,0	4,8 \pm 0,7 (4)*	-52	4,9 \pm 0,3 (7)†	+6
0	10,1 \pm 0,7 (4)		4,7 \pm 0,2 (4)	
30,0	4,0 \pm 0,8 (4)*	-60	4,9 \pm 0,4 (4)†	+4
0	10,8 \pm 0,4 (4)		4,9 \pm 0,2 (4)	
60,0	3,6 \pm 0,8 (4)*	-67	4,8 \pm 0,5 (4)†	-2

Les vitesses respiratoires sont exprimées en nmoles O₂ par minute et par mg de protéine mitochondriale dans 1 ml. Les valeurs moyennes sont suivies de l'écart type à la moyenne. Entre parenthèses est indiqué le nombre d'expériences. * Différence significative statistiquement. † Différence non significative.

TABLEAU 2. INFLUENCE DU DIBB A CONCENTRATIONS CROISSANTES SUR LA VITESSE RESPIRATOIRE DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DANS L'ETAT CONTROLE EN PRESENCE DE GLUTAMATE-MALATE (6,7-3,3 mM) OU DE MALATE-ISOCITRATE (10 mM) COMME SUBSTRATS

DIBB (μ M)	Glutamate-malate		Malate-isocitrate	
	Vitesse respiratoire	Effet (%)	Vitesse respiratoire	Effet (%)
0	6,3 \pm 0,6 (4)		5,5 \pm 0,4 (4)	
0,5	9,8 \pm 1,3 (4)†	+55	8,8 \pm 0,8 (4)*	+60
0	6,6 \pm 0,8 (4)		5,2 \pm 0,4 (4)	
1,0	13,5 \pm 1,8 (4)*	+104	11,1 \pm 0,8 (4)*	+113
0	6,3 \pm 0,7 (4)		5,5 \pm 0,4 (4)	
2,5	17,1 \pm 3,3 (4)*	+171	13,3 \pm 1,0 (4)*	+142
0	5,2 \pm 0,5 (4)		4,8 \pm 0,5 (4)	
5,0	20,3 \pm 4,2 (4)*	+290	10,7 \pm 1,0 (4)*	+123
0	5,2 \pm 0,5 (4)		4,5 \pm 0,5 (4)	
7,5	23,4 \pm 4,4 (4)*	+350	11,9 \pm 0,9 (4)*	+164
0	5,1 \pm 0,5 (4)		5,2 \pm 0,2 (4)	
15,0	22,2 \pm 3,6 (4)*	+335	12,7 \pm 1,4 (4)*	+144
0	4,8 \pm 0,4 (4)		5,0 \pm 0,6 (6)	
30,0	17,1 \pm 3,8 (4)*	+256	6,1 \pm 0,5 (6)†	+22
0	6,6 \pm 0,8 (4)		5,7 \pm 0,3 (4)	
60,0	9,4 \pm 2,3 (4)†	+42	5,0 \pm 0,2 (4)†	-12

Les vitesses respiratoires sont exprimées en nmoles O₂ par minute et par mg de protéine mitochondriale dans 1 ml. Les valeurs moyennes sont suivies de l'écart type à la moyenne. Entre parenthèses est indiqué le nombre d'expériences. * Différence significative statistiquement. † Différence non significative.

TABLEAU 3. INFLUENCE DU DIBB A CONCENTRATIONS CROISSANTES SUR LA VITESSE RESPIRATOIRE DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DANS L'ETAT ACTIF EN PRESENCE DE SUCCINATE (6 mM) OU DE β -HYDROXY-BUTYRATE (12 mM) COMME SUBSTRATS

DIBB (μ M)	Succinate		β -hydroxybutyrate	
	Vitesse respiratoire	Inhibition (%)	Vitesse respiratoire	Inhibition (%)
0	38,5 \pm 1,1 (4)			
0,25	28,3 \pm 1,3 (4)*	26		
0	38,9 \pm 1,1 (4)		13,6 \pm 0,6 (6)	
0,5	22,1 \pm 1,3 (4)*	43	10,8 \pm 0,4 (6)*	20
0	39,1 \pm 1,3 (4)			
0,75	16,9 \pm 1,4 (4)*	56		
0	38,1 \pm 0,8 (4)		13,3 \pm 0,6 (4)	
1,0	13,9 \pm 0,7 (4)*	63	9,5 \pm 0,3 (4)*	28
0	39,1 \pm 1,3 (4)		13,7 \pm 0,6 (5)	
1,5	10,6 \pm 0,3 (4)*	73	8,7 \pm 0,4 (5)*	36
0	38,3 \pm 0,8 (4)		14,1 \pm 0,6 (5)	
3,0	5,8 \pm 0,3 (4)*	85	7,2 \pm 0,5 (5)*	49
0			14,4 \pm 0,8 (5)	
4,5			6,5 \pm 0,6 (5)*	55
0			13,5 \pm 0,6 (4)	
6,0			5,1 \pm 0,2 (4)*	62
0			15,0 \pm 1,0 (4)	
7,5			5,7 \pm 0,7 (4)*	62

Les vitesses respiratoires sont exprimées en nmoles O₂ par minute et par mg de protéine mitochondriale dans 1 ml. Les valeurs moyennes sont suivies de l'écart type à la moyenne. Entre parenthèses est indiqué le nombre d'expériences. * Différence significative statistiquement. † Différence non significative.

TABLEAU 4. INFLUENCE DU DIBB A CONCENTRATIONS CROISSANTES SUR LA VITESSE RESPIRATOIRE DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DANS L'ETAT ACTIF, EN PRESENCE DE GLUTAMATE-MALATE (6,7 mM) OU DE MALATE-ISOCITRATE (10 mM) COMME SUBSTRATS

DIBB (μ M)	Glutamate-malate		Malate-isocitrate	
	Vitesse respiratoire	Inhibition (%)	Vitesse respiratoire	Inhibition (%)
0	32,0 \pm 2,0 (4)		16,2 \pm 2,3 (4)	
10,0	27,5 \pm 1,7 (4)†	14	16,0 \pm 2,5 (4)†	1
0	31,5 \pm 1,9 (4)		16,1 \pm 1,7 (4)	
15,0	25,1 \pm 1,5 (4)*	20	15,6 \pm 1,9 (4)†	3
0	31,6 \pm 2,0 (4)		16,2 \pm 2,3 (4)	
20,0	20,6 \pm 1,2 (4)*	34	15,6 \pm 2,7 (4)†	4
0	31,9 \pm 1,8 (4)		17,1 \pm 1,9 (4)	
22,5	20,7 \pm 1,2 (4)*	35	14,9 \pm 2,0 (4)*	13
0	31,3 \pm 1,9 (4)		16,4 \pm 1,5 (4)	
30,0	17,3 \pm 1,8 (4)*	44	9,8 \pm 1,6 (4)*	40
0	30,5 \pm 1,6 (4)		16,1 \pm 1,5 (4)	
45,0	12,8 \pm 0,9 (4)*	58	6,2 \pm 0,2 (4)*	61
0	30,1 \pm 1,5 (4)		16,4 \pm 1,6 (4)	
60,0	9,7 \pm 1,0 (4)*	67	5,1 \pm 0,3 (4)*	69

Les vitesses respiratoires sont exprimées en nmoles O₂ par minute et par mg de protéine mitochondriale dans 1 ml. Les valeurs moyennes sont suivies de l'écart type à la moyenne. Entre parenthèses est indiqué le nombre d'expériences. * Différence significative statistiquement. † Différence non significative.

succinate et de $1,6 \mu\text{M}$ avec le β -hydroxybutyrate (Tableau 1). Les concentrations de DIBB nécessaires pour stimuler l'état 4 sont plus élevées en présence de glutamate-malate et de malate-isocitrate qu'avec les deux substrats précédents, et la concentration provoquant la plus grande activation respiratoire est voisine de $8 \mu\text{M}$ (Tableau 2).

Respiration activée (état 3)

(a) *Divers substrats.* Le DIBB ajouté après l'ADP inhibe la consommation d' O_2 des mitochondries placées en état 3 en présence des quatre substrats, retarde le retour à l'état 4 et diminue les valeurs du rapport P/O. L'inhibition 50 pour cent est obtenue avec $0,6 \mu\text{M}$ environ avec le succinate et $3,6 \mu\text{M}$ avec le β -hydroxybutyrate (Tableau 3). Il faut des concentrations de DIBB beaucoup plus élevées en présence de glutamate-malate et de malate-isocitrate, l'inhibition 50 pour cent nécessite $40 \mu\text{M}$ (Tableau 4).

(b) *Substrats à concentrations variables.* Au cours de ces essais, la solution tamponnée, l'ADP, les mitochondries, le DIBB ou son solvant sont ajoutés successivement puis la respiration est déclenchée par le succinate ou le β -hydroxybutyrate à concentrations variables.¹⁴ Les résultats obtenus sont traduits sous forme de courbes en portant en ordonnées l'inverse de la vitesse respiratoire en $\text{nmoles O}_2 \times \text{min}^{-1}$ et par mg de protéine, et en abscisses l'inverse de la concentration du substrat exprimée en mM^{-1} . La Fig. 1 (a) est réalisée en présence de β -hydroxybutyrate et avec deux concentrations différentes de DIBB, le témoin étant effectué avec son solvant. Il ressort de cette figure que le système multienzymatique semble obéir aux lois de la cinétique michaélienne classique puisque la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk donne lieu à des droites. Ces droites convergent sur l'axe des ordonnées, ce qui implique que l'inhibition est compétitive vis-à-vis du β -hydroxybutyrate; on calcule un K_i de $0,95 \mu\text{M}$.

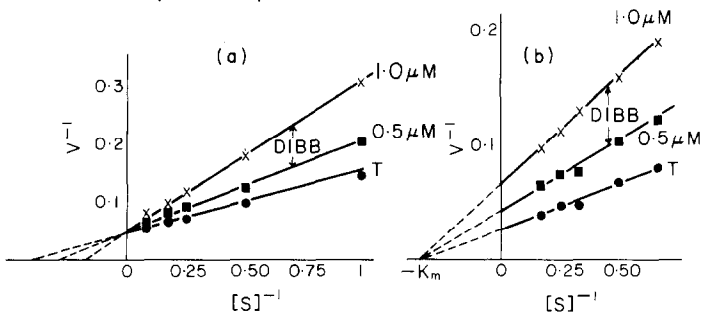


FIG. 1. Inhibition de l'oxydation du β -hydroxybutyrate (a) et du succinate (b) par le diiodo-3,5-hydroxy-4-benzoate de *n*-butyle (DIBB) $0,5$ et $1,0 \mu\text{M}$. V^{-1} = inverse de la vitesse respiratoire exprimée en $\text{nmoles O}_2 \times \text{min}^{-1}$ et par mg de protéine mitochondriale dans 1 ml. $[S]^{-1}$ = inverse de la concentration du substrat en mM . T = témoin en présence du solvant du DIBB.

Dans le cas du succinate, les courbes sont également rectilignes, mais elles se coupent sur l'axe des abscisses (Fig. 1(b)). L'inhibition est donc non compétitive vis-à-vis du succinate, le K_m étant égal en moyenne à $2,6 \text{ mM}$.

Changements morphologiques

La Fig. 2 représente les changements morphologiques des mitochondries hépatiques après addition de $10 \mu\text{M}$ de DIBB, d'acide diiodo-3,5-hydroxy-4-phénylacétique (ADIP), de diiodo-3,5-hydroxy-4-acétophénone (DIA) ou de L-thyroxine (T_4).

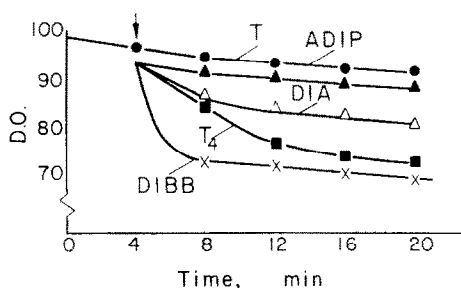


FIG. 2. Action de divers phénols iodés sur la morphologie des mitochondries hépatiques en fonction du temps en minutes. Ordonnées: densité optique ramenée à 100. L'addition des produits iodés à la concentration de $10 \mu\text{M}$ a lieu 4 min après le début de la réaction. DIBB = diiodo-3,5-hydroxy-4-benzoate de *n*-butyle. DIA = diiodo-3,5-hydroxy-4-acétophénone. ADIP = acide diiodo-3,5-hydroxy-4-phénylacétique. T_4 = L-thyroxine. T = témoin avec le solvant des composés iodés.

cette dernière utilisée à titre de référence. La densité optique exprimée en p. 100 est portée en ordonnées et le temps en minutes, en abscisses. La courbe témoin effectuée avec le solvant des différents produits met en évidence la stabilité des particules car la turbidité baisse de moins de 8 p. 100 en 20 min. Après addition de DIBB, il apparaît une diminution très importante de la densité optique consécutive à un gonflement, lequel est beaucoup plus élevé et plus rapide qu'avec la thyroxine. DIA est moins actif que T_4 alors que ADIP est sans effet sur la fixation active de l'eau par les mitochondries.

(II) Effets du DIBB sur les mitochondries de la corticosurrénale

Consommation d' O_2 . La Fig. 3, donnée à titre d'exemple, reproduit les tracés oxygraphiques de la respiration mitochondriale en présence de malate-isocitrate comme substrat. La vitesse respiratoire des mitochondries placées dans l'état 4 est augmentée de plus de 230 p. 100 par l'addition de $15 \mu\text{M}$ de DIBB (Tableau 5). A titre de référence, est représentée sur la Fig. 3(a) l'action de $50 \mu\text{M}$ de DNP. La partie (b) de la Fig. 3 montre qu'après ADP les mitochondries présente un contrôle

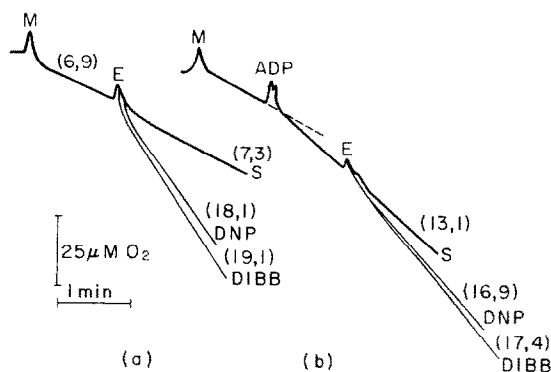


FIG. 3. Enregistrements de la respiration des mitochondries corticosurrénales (M) après addition d'effecteurs (E) soit diiodo-3,5-hydroxy-4-benzoate de *n*-butyle (DIBB) $15 \mu\text{M}$, soit dinitro-2,4-phénol (DNP) $50 \mu\text{M}$, en présence de malate-isocitrate comme substrat. Le témoin est réalisé avec le solvant (S). Partie a: état contrôlé. Partie b: état activé par ADP. Entre parenthèses: la consommation d' O_2 exprimée en $\text{nmoles O}_2 \times \text{min}^{-1}$ et par mg de protéine mitochondriale dans 1 ml.

TABLEAU 5. EFFET DE 15 μM DE DIBB SUR LA CONSOMMATION D'O₂ DES MITOCHONDRIES CORTICOSUR-RENALIENNES DANS L'ETAT CONTROLE (MALATE-ISOCITRATE COMME SUBSTRAT), DANS L'ETAT ACTIF (SUBSTRAT + ADP) OU EN PRESENCE DE DESOXYCORTICOSTERONE (SUBSTRAT + DOC)

Etats respiratoires	Témoïn	DIBB
Malate-isocitrate	7,9 \pm 0,4 (4)	18,7 \pm 1,6 (4)*
Malate-isocitrate + ADP	12,8 \pm 0,5 (4)	18,4 \pm 1,0 (4)*
Malate-isocitrate + DOC	19,6 \pm 2,0 (4)	23,1 \pm 3,4 (4)†

Les vitesses respiratoires sont exprimées en nmoles O₂ par minute et par mg de protéine mitochondriale dans 1 ml. Pour chaque essai, 25 à 50 rats sont utilisés. Les valeurs moyennes sont suivies de l'écart type à la moyenne. Entre parenthèses est indiqué le nombre d'expériences. * Différence significative statistiquement. † Différence non significative.

respiratoire. La même concentration de DIBB (15 μM) provoque une stimulation de la consommation d'O₂ de près de 50 p. 100 (Tableau 5).

Synthèse de la corticostérone. Lorsqu'on remplace l'ADP par la desoxyzcorticostérone (DOC), il se produit une stimulation de la consommation d'O₂ simultanément à la synthèse de corticostérone (Fig. 4(a)). L'addition de 15 μM de DIBB après DOC active l'utilisation d'O₂ (Tableau 5) mais à la concentration de 22,5 μM on observe au contraire une diminution de la consommation d'O₂. Cependant, même à une concentration plus faible (5 μM), DIBB inhibe la réaction d'hydroxylation de la DOC ainsi qu'il ressort du Tableau 6.

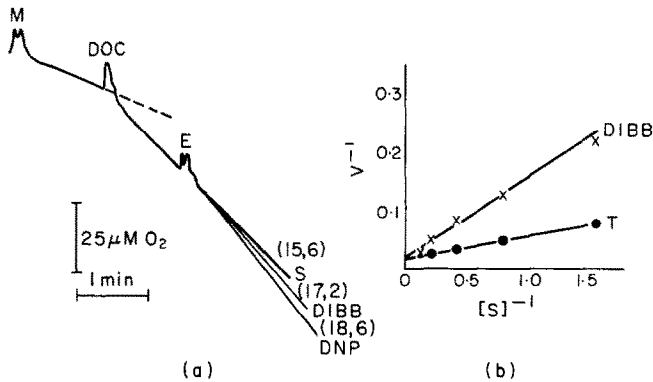


FIG. 4. Vitesses respiratoires des mitochondries corticosurrénaliennes (M) exprimées en nmoles O₂ \times min⁻¹ par mg de protéine dans 1 ml en présence de malate-isocitrate comme substrat et de desoxyzcorticostérone (DOC). Partie a: après addition d'effecteurs (E) soit DIBB 15 μM , soit DNP 50 μM ; le témoin est réalisé avec le solvant (S). Partie b: inhibition de l'oxydation du malate-isocitrate en présence de DIBB (22,5 μM). T = témoin avec le solvant. V^{-1} = inverse de la vitesse respiratoire. $[S]^{-1}$ = inverse de la concentration du substrat en mM.

La Fig. 4(b) illustre l'effet de 22,5 μM de DIBB sur la respiration des mitochondries corticosurrénaliennes en présence de DOC et de concentrations variables de malate-isocitrate. L'inverse de la vitesse respiratoire exprimée en nmoles O₂ \times min⁻¹ \times mg⁻¹ protéine est portée en ordonnées, tandis que les abscisses représentent l'inverse de la concentration en substrat en mM⁻¹. Les courbes obtenues avec DIBB ou son solvant sont des droites qui convergent sur l'axe des ordonnées.

TABLEAU 6. EFFET DE 5 μ M DE DIBB SUR LA SYNTHÈSE DE CORTICOSTÉRONE

Temps (min)	Corticostérone formée (nmoles/mg)		
	Témoin	DIBB	Inhibition (%)
0	0	0	0
2	13,3	7,8	41
4	25,4	14,7	42
6	32,7	23,7	27

Les mitochondries corticosurrénales de rat (0,5 mg/ml) sont incubées en présence de 45 nmoles de désoxycorticostérone par ml du milieu réactionnel décrit dans "Méthodes expérimentales".

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'ensemble de notre travail montre que le diiodo-3,5-hydroxy-4-benzoate de *n*-butyle se comporte comme un agent découplant vis-à-vis des mitochondries isolées de foie ou de corticosurrénale de rat puisque, d'une part, il provoque une stimulation de la consommation d'O₂ lorsque les particules sont placées en état contrôlé et que, d'autre part, il s'oppose en partie à la biosynthèse de l'ATP lorsqu'elles sont dans l'état activé.

Les mitochondries hépatiques présentent une activation maximale de leur vitesse respiratoire de 65 p. 100 avec le succinate, 85 p. 100 avec le β -hydroxybutyrate, 164 p. 100 avec le malate-isocitrate et 350 p. 100 avec le glutamate-malate lorsque les concentrations de DIBB sont de 1 μ M pour les deux premiers substrats et de 7,5 μ M pour les deux autres. L'effet découplant se manifeste également en présence d'ADP car le retour à l'état 4 est retardé et les rapports P/O diminués. Ces derniers, dont les valeurs expérimentales en présence du solvant de DIBB sont de 1,8 avec le succinate et 2,6 avec le β -hydroxybutyrate pour 2 et 3 théoriques, sont abaissés respectivement à 1,2 et 2,1 en présence de 0,5 μ M du produit iodé. Cependant, l'influence du DIBB diffère de plusieurs façons de celle du DNP, que l'on considère comme le découplant type. En effet, les concentrations du dérivé halogéné qui provoquent la plus grande activation de la vitesse respiratoire dans l'état 4 et une inhibition d'environ 50 p. 100 dans l'état 3 sont voisines, tandis que le DNP aux doses fortement activatrices de l'état 4 ne modifie pas sensiblement la respiration des mitochondries placées dans l'état 3.¹⁵ De plus, l'inhibition respiratoire due au DNP en présence de quantités variables de succinate est compétitive vis-à-vis du substrat,¹⁴ alors que celle provoquée par le DIBB est non compétitive. Par contre, elle est compétitive en présence de β -hydroxybutyrate. Il est donc probable que l'intervention du DIBB se situe au niveau des déshydrogénases, mais ce ne doit pas être son seul point d'intervention puisque l'inhibition qu'il provoque à l'état 3 n'est pas levée par le DNP. On peut supposer que la présence du radical butyle qui accroît les propriétés lipophiles est responsable de son effet sur les intermédiaires de couplage puisque les phospholipides semblent impliqués dans les mécanismes liant les phosphorylations aux oxydations.¹⁶

Une autre différence entre le phénol nitré et le phénol iodé est que la fixation active de l'eau par les mitochondries hépatiques n'a pas lieu avec le premier¹⁷ tandis qu'un fort gonflement plus rapide et plus intense qu'avec la thyroxine se manifeste avec le second. Cette différence procède sans doute de la plus grande solubilité du DIBB dans les lipides. L'absence d'action de l'acide diiodo-3,5-hydroxy-4-benzoïque est en faveur de cette hypothèse.

Les mitochondries de la corticosurrénale sont influencées de la même manière que celles isolées du foie lorsqu'elles se trouvent en état 4; mais en état 3, au lieu d'une inhibition, on observe aux faibles concentrations en produit iodé une augmentation de la vitesse respiratoire. Quant l'ADP est remplacé par la désoxycorticostérone, on constate également aux mêmes doses une stimulation de l'utilisation d'O₂ avec, cependant, une diminution de la synthèse de corticostérone. Cette apparente contradiction est sans doute la résultante de deux effets opposés: l'un consécutif à la stimulation respiratoire élevée propre au découplage, l'autre procédant d'un ralentissement relativement faible du transfert des électrons dans la chaîne intervenant dans la 11 β -hydroxylation. Par contre, le DIBB en quantités relativement élevées provoque une inhibition de la consommation d'O₂ des mitochondries lorsque le milieu est supplémenté en DOC, l'effet inhibiteur étant compétitif vis-à-vis du malate-isocitrate comme substrat. Ce fait permet de supposer que le site d'intervention privilégié est localisé au niveau de la chaîne des transporteurs conduisant aux 11 β -hydroxylations.

En conclusion, il est vraisemblable que le diiodo-3,5-hydroxy-4-benzoate de *n*-butyle possède au moins deux sites d'action, l'un localisé au niveau des chaînes de transfert des électrons sans doute proche des déshydrogénases, l'autre soit au niveau des intermédiaires conduisant à la synthèse de l'ATP, soit sur la chaîne responsable des 11 β -hydroxylations stéroïdiques. Ces faits permettent de rapprocher l'influence du DIBB à la fois de celle du dinitro-2,4-phénol sur les mitochondries corticosurrénaliennes¹⁸ et de celle des iodothyronines sur les particules hépatiques,¹⁹ ce qui pourrait expliquer son activité antithyroxinienne.

BIBLIOGRAPHIE

1. M. M. SHEAHAN, J. H. WILKINSON et N. F. MACLAGAN, *Biochem. J.* **48**, 188 (1951).
2. J. H. WILKINSON, W. E. SPROTT, C. H. BOWDEN et N. V. MACLAGAN, *Biochem. J.* **56**, 215 (1954).
3. G. H. DELTOUR et J. BEKAERT, *C.R. Soc. Biol. Paris* **147**, 388 (1953).
4. G. H. DELTOUR et E. VELEZ, *Ann. Endocrinol.* **14**, 233 (1953).
5. S. H. MUDD, J. H. PARK et F. LIPMANN, *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **41**, 571 (1955).
6. R. L. GREIF, in *Advances in Thyroid Research* (Ed. R. PITT-RIVERS) p. 515, Pergamon Press, Oxford (1961).
7. W. C. SCHNEIDER et G. H. HOGEBOOM, *J. biol. Chem.* **183**, 123 (1950).
8. J. ROCHE, J. E. RALL, R. MICHEL, O. MICHEL et S. VARRONE, *Biochim. biophys. Acta* **56**, 188 (1962).
9. Y. NAKAMURA et B. Y. TAMAOKI, *Biochim. biophys. Acta* **85**, 351 (1964).
10. A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL et M. M. DAVID, *J. biol. Chem.* **177**, 751 (1949).
11. W. CAMMER et R. W. ESTABROOK, *Archs Biochem. Biophys.* **122**, 721 (1967).
12. D. MATTINGLY, *J. clin. Pathol.* **15**, 374 (1962).
13. R. MICHEL, J. ROCHE, O. MICHEL, M. GIRARD et J. E. RALL, *J. biol. Chem.* **239**, 3062 (1963).
14. D. F. WILSON et R. D. MERZ, *Archs Biochem. Biophys.* **119**, 470 (1967).
15. E. C. SLATER, in *Fifth Int. Cong. of Biochemistry*, Moscou, 1961, Vol. 5, p. 325, Pergamon Press, Oxford (1963).
16. Y. KAGAWA, A. KANDRACH et E. RACKER, *J. biol. Chem.* **248**, 676 (1973).
17. A. L. LEHNINGER, *Biochim. biophys. Acta* **51**, 442 (1961).

18. R. MICHEL, J. BOUHNİK et O. MICHEL, in *Further Advances in Thyroid Research* (Eds. K. FELLINGER et R. HÖFER), p. 731, Verlag der Wiener Medizinischen Akademie, Vienne (1971).
19. R. MICHEL et A. LEBLANC, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **51**, 355 (1969).

Résumé—Notre travail a consisté à étudier les effets du diiodo-3,5-hydroxy-4-benzoate de *n*-butyle (DIBB), considéré comme antithyroxinien, sur les oxydophosphorylations des mitochondries isolées de foie et de corticosurrénale de rat.

Le produit iodé active fortement à faibles doses la respiration des mitochondries hépatiques lorsqu'elles sont placées dans l'état contrôlé, mais l'inhibe lorsqu'elles se trouvent dans l'état actif; son effet découplant se traduit en particulier par une baisse du rapport P/O. Le DIBB affecte compétitivement l'oxydation du β -hydroxybutyrate en présence d'ATP, mais de façon non compétitive celle du succinate. Il provoque le gonflement des mitochondries plus rapidement et plus intensément que la L-thyroxine.

En présence des mitochondries de la corticosurrénale, le DIBB active la respiration en présence et en l'absence d'ADP, stimule la consommation d'O₂ avec la désoxycorticostérone en s'opposant à la 11 β -hydroxylation.

Il est donc probable que le DIBB possède au moins deux sites d'action, l'un au niveau des chaînes de transfert des électrons, sans doute proche des déshydrogénases, l'autre au niveau des intermédiaires de couplage. Ces faits permettent de rapprocher le comportement du DIBB de celui des iodothyronines, ce qui pourrait expliquer son activité antithyroxinienne.