

## ACTION DU DIIDO-3,5-L TYROSYL DIIDO-3,5-L TYROSINE SUR LES OXYDOPHOSPHORYLATIONS ET LE GONFLEMENT DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT

D. GODENECHÉ et F. LAPALUS

Unité de Recherche I.N.S.E.R.M. U 71, Etude Métabolique des Molécules Marquées, B.P. 184, 63005  
Clermont-Ferrand Cedex, France

(Received 4 June 1973; accepted 15 September 1973)

**Abstract**—The effect of a new thyroid component, recently isolated from bovine thyroglobulin, on the respiration and swelling of rat liver mitochondria, has been studied. This product is an iodinated peptide, 3,5 diiodo-L-tyrosyl 3,5 diiodo-L-tyrosine (TT<sub>4</sub>I) and its action is quite different from that of iodothyronines which act as uncouplers and inhibitors of mitochondrial respiration. 3,5 diiodo-L-tyrosyl 3,5 diiodo-L-tyrosine is an inhibitor of mitochondrial respiration. It acts on the three coupling sites of oxydo-phosphorylations with various intensities. Furthermore, it is able to prevent mitochondrial swelling induced by thyroxine. It seems that the hypothesis that this compound has thyroximimetic properties is incorrect since its peripheral effects are quite different from those of thyroid hormones.

L'ACTION sur les oxydophosphorylations des mitochondries de nombreux composés de structures très différentes a suscité d'importantes recherches.<sup>1-4</sup> C'est ainsi que les phénols iodés et tout particulièrement les iodothyronines ont retenu l'attention<sup>5,6</sup> car ces substances interviennent comme réactifs privilégiés des oxydophosphorylations en agissant sur la respiration des mitochondries de façon élective mais non spécifique. Cette action élective et le fait qu'il existe dans la thyroïde certains phénols iodés de structure voisine de celle des hormones thyroïdiennes (T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>) ou de leurs précurseurs (MIT, DIT) nous ont conduit à étudier l'action de l'un d'entre eux sur les mécanismes d'oxydophosphorylations. Un groupe de chercheurs de notre laboratoire a pu mettre en évidence sous certaines conditions d'hydrolyse, la présence dans la thyroïde d'un dipeptide iodé, le diido-3,5-L tyrosyl diido-3,5-L tyrosine ou TT<sub>4</sub>I<sup>7-12</sup> dont la formule est donnée sur la Fig. 1 et l'a extrait à partir de la thyroglobuline bovine.

La présence de ce nouveau composé iodé dans la glande thyroïde mais également dans le sang circulant dans certains états de dysthyroïdies<sup>13</sup> et son rôle éventuel dans la biosynthèse des hormones thyroïdiennes nous a amené à étudier, dans diverses conditions expérimentales, son action sur la respiration des mitochondries hépatiques de rat que les hormones thyroïdiennes influencent de façon complexe:<sup>6</sup> celles-ci accélèrent, à faible concentration, la respiration des mitochondries placées dans l'état contrôlé et à forte concentration jouent le rôle d'inhibiteurs. Dans l'état actif, on constate toujours une inhibition respiratoire. Les iodothyronines provoquent d'autre part une fixation active de l'eau, entraînant le gonflement de ces organites.

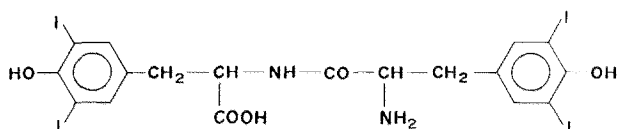


FIG. 1. Diiodo-3,5-t tyrosyl diiodo-3,5-t tyrosine.

La structure orthodiiodophénolique de la molécule de  $TT_4I$  nous a paru intéressante quant à des effets possibles de ce composé sur les oxydophosphorylations et le gonflement des mitochondries.

#### MATERIEL ET METHODES

*Synthèse du  $TT_4I$ .* Le  $TT_4I$  est préparé par iodation du L tyrosyl-L tyrosine. A la solution agitée de 0,2 mM de L tyrosyl-L tyrosine,  $2H_2O$ , dans 1 ml d'ammoniaque concentrée, on ajoute goutte à goutte une solution de 200 mg d'iode dans l'éther. L'agitation est maintenue pendant 24 h. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé à sec; le résidu dissous dans le minimum d'eau est ajusté à pH 3 par addition d'acide chlorhydrique 0,1 N. Cette solution est ensuite relarguée par l'acétate de sodium jusqu'au pH 5, point isoélectrique du produit. Après centrifugation, le précipité est lavé à plusieurs reprises à l'eau afin d'éliminer les iodures puis à l'éthanol. Finalement, le  $TT_4I$  est séché sous vide en présence de  $P_2O_5$ . Le rendement de l'iodation est de 75 pour cent.

Le contrôle de pureté et l'identification du produit sont effectués par les critères physico-chimiques suivants: analyse du produit en chromatographie sur résines échangeuses d'anions ou de cations et sur couche mince,<sup>14</sup> spectre infra-rouge et spectre de masse.

*Préparation des mitochondries.* Les mitochondries hépatiques de rats mâles de souche Wistar sont préparées par la technique de Schneider légèrement modifiée.<sup>15,16</sup> Les mitochondries sont conservées en suspension dans du saccharose 0,25 M à 0°.

*Dosage des protéines.* Les protéines mitochondriales sont dosées par la méthode au biuret en présence de cholate de sodium.

*Mesure de la consommation d'oxygène.* La mesure de la consommation d'oxygène s'effectue par méthode polarographique à 28° à l'aide d'un oxygraphe Gilson, Modèle K. M., muni d'une électrode de Clark.

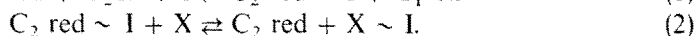
2,5 mg de protéines mitochondriales, sont additionnés à 1,5 ml de milieu à pH 7,4 de composition suivante:  $H_2KPO_4$  3 mM,  $HK_2PO_4$  13 mM, NaCl 25 mM, KCl 58 mM, NaF 12 mM,  $MgCl_2$  6 mM. A chaque essai, la qualité des mitochondries est vérifiée par la mesure de leur contrôle respiratoire et de leur rapport P/O.

*Mesure du gonflement des mitochondries.* Le gonflement des mitochondries est suivi par l'étude de la variation de l'extinction E, à 520 nm avec un photomètre Beckmann. Le milieu d'incubation, maintenu à 20°, contient 5 ml d'un mélange Tris-HCl 0,02 M et KCl 0,125 M à pH 7,4. La quantité de mitochondries est choisie pour que la densité optique, avant toute addition d'agent gonflant, soit de 0,80, ce qui correspond à environ 1 mg de protéines mitochondriales.

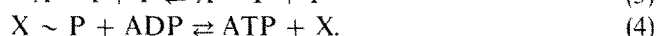
#### RESULTATS ET DISCUSSION

Nous rappelons brièvement le schéma le plus classique conduisant à la synthèse de l'ATP qui fait intervenir la théorie chimique des intermédiaires de couplage.<sup>17</sup>

Réactions de couplage de l'énergie:



Réactions de transfert de l'énergie:



$C_1$  et  $C_2$  sont des transporteurs d'électrons voisins sous la forme réduite ou oxydée.  $I$  et  $X$  sont des intermédiaires de couplage dont la nature n'est pas encore déterminée.

*Effets du  $\text{TT}_4\text{I}$  sur la respiration dans l'état contrôlé 4 et l'état actif 3.* Quatre substrats intervenant à des points différents de la chaîne respiratoire et divers inhibiteurs respiratoires ont été utilisés<sup>6</sup> le  $\beta$  hydroxybutyrate 13 mM et le mélange glutamate 6,7 mM malate 3 mM en présence de malonate 3 mM, le succinate 6 mM en présence de roténone 1,5  $\mu\text{M}$  et le mélange tétraméthylphenylènediamine (TMPD) 0,15 mM. ascorbate 33 mM en présence d'antimycine A.

L'état 3 est obtenu par addition d'ADP 250  $\mu\text{M}$ .

Le  $\text{TT}_4\text{I}$  est dissous dans NaOH 0,02 M. A chaque essai, un témoin est réalisé avec la même quantité du solvant utilisé pour la mise en solution du produit.

Les moyennes des vitesses respiratoires obtenues dans l'état 4 et l'état 3 en présence de quantités variables de  $\text{TT}_4\text{I}$  font l'objet des Tableaux 1 et 2.

Les courbes des Figs. 2 et 3 indiquent la moyenne des pourcentages de respiration calculée en faisant le rapport des vitesses respiratoires en présence et en absence du dipeptide iodé.

La respiration est légèrement inhibée dans l'état contrôlé pour trois des substrats:  $\beta$ -hydroxybutyrate, glutamate-malate et succinate. Aucune inhibition n'est mise en évidence pour le mélange TMPD-ascorbate. Il faut noter que l'effet freinateur respiratoire est plus intense avec les substrats NAD liés pour lesquels malgré tout, l'inhibition respiratoire n'est jamais supérieure à 30 pour cent.

L'état actif est très influencé par la présence du dipeptide iodé: le ralentissement de la respiration, plus important que dans l'état 4, est d'autant plus grand que le substrat utilise toute la chaîne respiratoire: l'activité inhibitrice de 50 pour cent avec les substrats NAD liés est de 10  $\mu\text{M}$  en présence de  $\beta$ -hydroxybutyrate et de 40  $\mu\text{M}$  avec le mélange glutamate-malate. Pour le succinate, l'activité inhibitrice de 50 pour cent

TABLEAU 1. EFFETS DU  $\text{TT}_4\text{I}$  SUR LES VITESSES RESPIRATOIRES DES MITOCHONDRIES PLACÉES DANS L'ÉTAT 4. CHAQUE VALEUR REPRÉSENTE LA MOYENNE DES VITESSES RESPIRATOIRES EXPRIMÉE EN  $\mu\text{MO}_2/\text{sec}/\text{mg}$  DE PROTÉINES CALCULÉE À PARTIR DE 15 DÉTERMINATIONS. CHAQUE MOYENNE EST SUIVIE DE SON ÉCART TYPE

Substrat	Vitesse respiratoire ( $\mu\text{MO}_2$ sec mg)				
	0	20	50	100	150
Succinate	0,182 $\pm$ 0,011	0,167 $\pm$ 0,007	0,168 $\pm$ 0,009	0,168 $\pm$ 0,005	0,167 $\pm$ 0,005
$\beta$ -Hydroxybutyrate	0,083 $\pm$ 0,005	0,073 $\pm$ 0,002	0,065 $\pm$ 0,003	0,060 $\pm$ 0,004	0,060 $\pm$ 0,003
Glutamate-malate	0,123 $\pm$ 0,006	0,105 $\pm$ 0,006	0,094 $\pm$ 0,003	0,086 $\pm$ 0,005	0,086 $\pm$ 0,003
TMPD-ascorbate	0,409 $\pm$ 0,048	—	—	—	—

TABLEAU 2. EFFETS DU  $\text{TT}_4\text{I}$  SUR LES VITESSES RESPIRATOIRES DES MITOCHONDRIES PLACÉES DANS L'ÉTAT 3. CHAQUE VALEUR REPRÉSENTE LA MOYENNE DES VITESSES RESPIRATOIRES EXPRIMÉE EN  $\mu\text{MO}_2/\text{sec}/\text{mg}$  DE PROTÉINES CALCULÉE À PARTIR DE 15 DÉTERMINATIONS. CHAQUE MOYENNE EST SUIVIE DE SON ÉCART TYPE

Substrat	Vitesse respiratoire ( $\mu\text{MO}_2/\text{sec}/\text{mg}$ )					
	0	10	20	50	100	150
Succinate	$0.910 \pm 0.030$	$0.836 \pm 0.032$	$0.793 \pm 0.025$	$0.647 \pm 0.020$	$0.457 \pm 0.024$	$0.307 \pm 0.018$
$\beta$ -Hydroxybutyrate	$0.290 \pm 0.010$	$0.141 \pm 0.006$	$0.122 \pm 0.007$	$0.107 \pm 0.005$	$0.100 \pm 0.004$	$0.092 \pm 0.005$
Glutamate-malate	$0.492 \pm 0.023$	$0.369 \pm 0.011$	$0.308 \pm 0.015$	$0.217 \pm 0.010$	$0.114 \pm 0.006$	$0.115 \pm 0.007$
TMPD-ascorbate	$0.650 \pm 0.045$	—	—	—	—	$0.586 \pm 0.020$

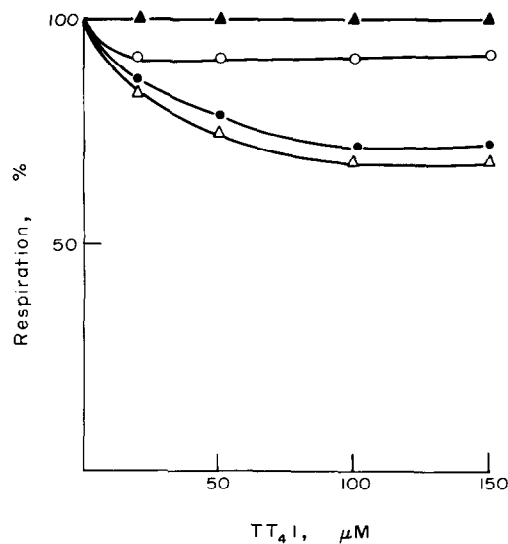


FIG. 2. Influence du TT<sub>4</sub>I sur l'activité respiratoire, en pour cent de l'activité initiale, des mitochondries placées dans l'état 4 en présence de différents substrats: (Δ) glutamate-malate; (●) β hydroxybutyrate; (○) succinate; (▲) TMPD, ascorbate.

correspond à une concentration d'inhibiteur de 100 μM et pour le mélange TMPD-ascorbate, elle est supérieure à 200 μM.

Ces résultats tendent à prouver que le TT<sub>4</sub>I influence les trois sites de phosphorylations avec des intensités différentes. Les rapports P/O ne sont pas affectés par la présence de l'inhibiteur. D'autre part, tous les essais de levée d'inhibition de l'état

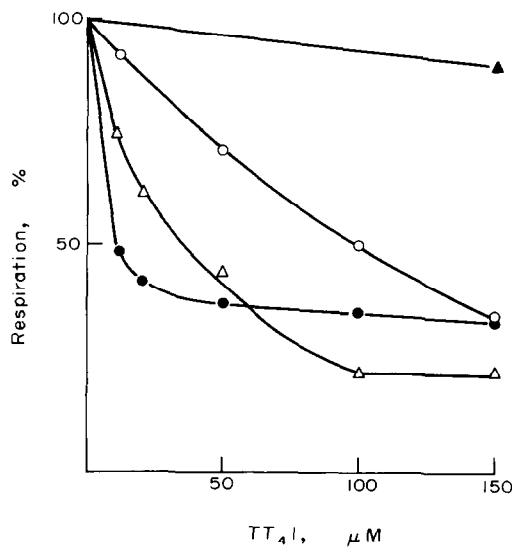


FIG. 3. Influence du TT<sub>4</sub>I sur l'activité respiratoire, en pour cent de l'activité initiale, des mitochondries placées dans l'état 3 en présence de différents substrats: (Δ) glutamate-malate; (●) β hydroxybutyrate; (○) succinate; (▲) TMPD, ascorbate.

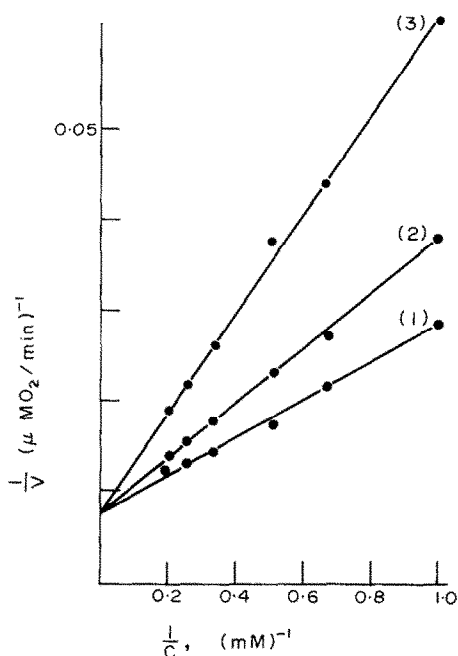


FIG. 4. Inhibition de l'oxydation du succinate à différentes concentrations par le TT<sub>4</sub>I en présence de mitochondries placées dans l'état 3. En ordonnée figure l'inverse de la vitesse respiratoire  $1/v$  en  $(\mu\text{MO}_2/\text{mn})^{-1}$  et en abscisse l'inverse de la concentration en succinate  $1/C$  en  $(\text{mM})^{-1}$ . Courbe 1 solvant, courbe 2 TT<sub>4</sub>I 20  $\mu\text{M}$ , courbe 3 TT<sub>4</sub>I 50  $\mu\text{M}$ .

actif, par le 2,4 dinitrophénol (DNP) ont été négatifs ce qui exclut une intervention de ce produit sur les étapes de transfert de l'énergie mais suggère plutôt une action au niveau des étapes de couplage de l'énergie.

*Effets du TT<sub>4</sub>I sur la vitesse respiratoire dans l'état 3 en présence de quantités variables de substrat.* Dans la cellule de mesure contenant le tampon sont introduits successivement: les mitochondries, l'ADP, l'inhibiteur ou le solvant et le substrat qui démarre la réaction.<sup>18</sup>

A partir des vitesses respiratoires initiales, à des concentrations variables de succinate (1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM et 5 mM) et de TT<sub>4</sub>I (20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ), nous avons tracé les courbes de Lineweaver-Burke (Fig. 4). Pour chaque expérience, nous avons déterminé les droites de régression par les moindres carrés. Cette analyse montre une corrélation très nette des points d'intersection des courbes sur l'axe des ordonnées aux deux concentrations de TT<sub>4</sub>I utilisées. L'inhibition observée dans l'état 3 succinate est donc de nature compétitive avec le substrat, ce que l'on peut expliquer par une compétition au niveau d'un transporteur d'électrons intervenant dans l'oxydation du succinate, probablement la succinodeshydrogénase.

Des essais identiques conduits avec le  $\beta$ -hydroxybutyrate comme substrat et le TT<sub>4</sub>I à doses inhibitrices moyennes (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) montrent qu'il n'y a pas d'inhibition compétitive entre ce substrat et le dipeptide iodé. L'inhibition est donc compétitive avec le site II et non avec le site I.

*Effets du TT<sub>4</sub>I sur la respiration dans l'état 4 activé par le DNP ou l'acide triiodothyroacétique.* Le Tableau 3 met en évidence une inhibition nette, par le TT<sub>4</sub>I, de

TABLÉAU 3. EFFETS DU TT<sub>4</sub>I SUR LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE DES MITOCHONDRIES PLACÉES DANS L'ÉTAT 4 ACTIVÉ PAR LE DNP EN PRÉSENCE DE SUCCINATE 6mM. CHAQUE VALEUR REPRÉSENTE LA MOYENNE DES VITESSES RESPIRATOIRES EN  $\mu\text{MO}_2/\text{sec}/\text{mg}$  DE PROTÉINES À PARTIR DE 17 DÉTERMINATIONS. CHAQUE MOYENNE EST SUIVIE DE SON ÉCART TYPE

DNP ( $\mu\text{M}$ )	Vitesse respiratoire ( $\mu\text{MO}_2/\text{sec}/\text{mg}$ ) TT <sub>4</sub> I ( $\mu\text{M}$ )				
	0	20	50	100	200
15	$0,520 \pm 0,030$	$0,439 \pm 0,009$	$0,400 \pm 0,014$	$0,259 \pm 0,017$	$0,113 \pm 0,017$
50	$0,810 \pm 0,040$	$0,567 \pm 0,029$	$0,460 \pm 0,026$	$0,272 \pm 0,021$	$0,105 \pm 0,020$

l'état 4 découplé par le DNP en présence de succinate 6 mM. Le ralentissement respiratoire est identique, que le TT<sub>4</sub>I soit ajouté avant ou après le DNP. Le point d'intervention du TT<sub>4</sub>I est donc situé en amont ou au niveau de celui du DNP, c'est-à-dire sur les tous premiers intermédiaires de couplage.

La similitude du comportement du TT<sub>4</sub>I dans l'état 3 et l'état 4 découplé par le DNP exclut définitivement un effet de ce produit sur les étapes de transfert de l'énergie.

Des essais effectués en présence d'acide triiodothyroacétique (TA<sub>3</sub>) utilisé à dose accélératrice de l'état 4 (20  $\mu\text{M}$ ) montrent également un effet freinateur respiratoire important du TT<sub>4</sub>I, une concentration en inhibiteur de 100  $\mu\text{M}$  supprimant totalement l'effet accélérateur de TA<sub>3</sub>.

*Effets du TT<sub>4</sub>I sur le gonflement des mitochondries provoqué par la thyroxine (T<sub>4</sub>).* Le gonflement, étudié en présence de glutamate 5 mM, malate 1 mM et malonate 1 mM, est induit par addition de T<sub>4</sub> 10  $\mu\text{M}$ , après 3 min d'incubation des mitochondries avec le TT<sub>4</sub>I. La valeur de l'extinction E est lue toutes les minutes. La courbe 1 (Fig. 5) représente le gonflement en absence de TT<sub>4</sub>I. Les courbes 2 à 4 illustrent le gonflement des mitochondries en présence de quantités variables de TT<sub>4</sub>I. Nous notons une inhibition progressive du gonflement, pratiquement totale pour une concentration de 200  $\mu\text{M}$ , ce qui est également en faveur d'une intervention du TT<sub>4</sub>I avant le deuxième intermédiaire de couplage.

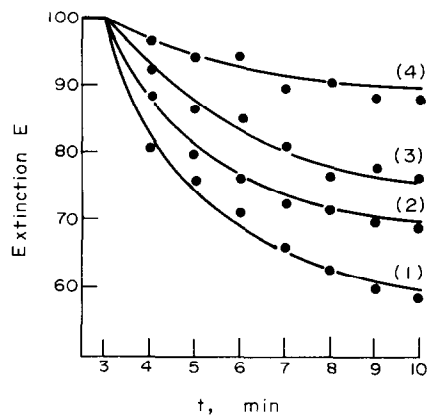


FIG. 5. Effets du TT<sub>4</sub>I sur le gonflement des mitochondries en présence de glutamate 5 mM, malate 1 mM et malonate 1 mM. En ordonnée figure l'extinction E normalisée à 100 et en abscisse le temps en minute. Chaque point représente la moyenne de 10 déterminations. Courbe 1 en absence de TT<sub>4</sub>I, courbes 2, 3 et 4 en présence de TT<sub>4</sub>I 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  et 200  $\mu\text{M}$ .

## CONCLUSION

Un nouveau dipeptide iodé, récemment isolé de la thyroglobuline bovine, le diiodo-3,5-L tyrosyl diiodo-3,5-L tyrosine ou TT<sub>4</sub>I entraîne, en présence de différents substrats, une inhibition respiratoire faible des mitochondries hépatiques de rat dans l'état contrôlé mais beaucoup plus importante dans l'état 3 ou l'état 4 activé par des découplants. Le fait également que le TT<sub>4</sub>I inhibe le gonflement induit par T<sub>4</sub>, suggère que ce produit affecte les trois sites de phosphorylations et agit vraisemblablement sur les intermédiaires de couplage directement liés aux transporteurs d'électrons. Il se distingue d'un inhibiteur respiratoire vrai comme le malonate car l'inhibition de l'état 4 n'est que partielle et des inhibiteurs des phosphorylations tels l'oligomycine dont l'inhibition est levée par le DNP.

Nous nous trouvons, avec le TT<sub>4</sub>I, en présence d'un effecteur respiratoire dont l'action diffère nettement de celle des iodothyronines, qui sont à la fois des inhibiteurs et des découplants des oxydophosphorylations mitochondriales.<sup>6</sup> Il semble que le remplacement de la liaison éther-oxyde présente dans la thyroxine par une liaison peptide modifie considérablement les propriétés de la molécule.

En fait, le diiodo-3,5-L tyrosyl diiodo-3,5-L tyrosine possède, comme l'amytal utilisé à faibles concentrations, un caractère d'inhibiteur partiel de la respiration mitochondriale.

L'ensemble de ces mécanismes d'action ne paraissent pas vérifier l'hypothèse selon laquelle le TT<sub>4</sub>I serait doué de propriétés thyroximimétiques.<sup>19</sup>

## BIBLIOGRAPHIE

1. B. CHANCE et G. HOLLUNGER, *J. biol. Chem.* **238**, 432 (1963).
2. A. BOVERIS et A. O. M. STOPPANI, *Archs Biochem. Biophys.* **141**, 641 (1970).
3. F. DI JESÙ, R. MICHEL, O. MICHEL et A. RUFFO, *C. r. Soc. Biol.* **164**, 506 (1970).
4. R. MICHEL, R. TRUCHOT et V. GULLY-MARTIN, *Biochem. Pharmacol.* **20**, 2587 (1971).
5. H. WYNN et W. FORB, *J. biol. Chem.* **240**, 1766 (1965).
6. R. MICHEL et A. LEBLANC, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **51**, 355 (1969).
7. S. C. WERNER et R. J. BLOCK, *Nature, Lond.* **183**, 406 (1959).
8. P. BLANQUET, C. VRIGNAUD, M. CROIZET, A. BRANDRICK et G. MEYNIEL, *C. r. Soc. Biol.* **157**, 804 (1963).
9. R. RIVIERE, D. COMAR, P. BLANQUET et C. KELLERSHOHN, *Nature, Lond.* **200**, 682 (1963).
10. J. MICHELOT, G. MEYNIEL, G. GAILLARD, J. A. BERGER et P. BLANQUET, *C. r. Soc. Biol.* **162**, 132, 1795 (1968).
11. J. MICHELOT, G. MEYNIEL, G. GAILLARD, J. A. BERGER et P. BLANQUET, *C. r. Soc. Biol.* **163**, 132 (1969).
12. J. MICHELOT et G. MEYNIEL, *C. r. Soc. Biol.* **164**, 2497 (1970).
13. J. MICHELOT, G. MEYNIEL et P. CHOLLET, à paraître.
14. J. MICHELOT, J. C. MADELMONT et G. MEYNIEL, *C. r. Soc. Acad. Sci.* **276**, 1357 (1973).
15. W. C. SCHNEIDER, *J. biol. Chem.* **176**, 259 (1948).
16. J. ROCHÉ, J. E. RALL, R. MICHEL, O. MICHEL et S. VARRONI, *Biochem. biophys. Acta.* **56**, 188 (1962).
17. B. CHANCE et G. R. WILLIAMS, *Adv. Enzymol.* **17**, 65 (1956).
18. D. F. WILSON et R. D. MERZ, *Archs Biochem. Biophys.* **119**, 470 (1967).
19. G. MEYNIEL, P. DELOST, J. A. BERGER, P. BLANQUET, R. N. ARNAUD et N. RIGAUDIERE, *C. r. Soc. Biol.* **160**, 981 (1966).

**Résumé** L'effet, sur la respiration et le gonflement des mitochondries hépatiques de rat, d'un nouveau composé thyroïdien, récemment isolé de la thyroglobuline bovine, a été étudié. Ce produit est un peptide iodé le diiodo-3,5-L tyrosyl diiodo-3,5-L tyrosine (TT<sub>4</sub>I). Son action est nettement différente de celle des iodothyronines qui sont à la fois des découplants et des inhibiteurs respiratoires. Le diiodo-3,5-L tyrosyl diiodo-3,5-L tyrosine se comporte comme un nouvel inhibiteur de la respiration mitochondriale, affectant les trois sites de



couplage des oxydophosphorylations, avec des intensités différentes; en outre, il est capable de s'opposer au gonflement des mitochondries provoqué par la thyroxine. Il ne semble donc pas que l'hypothèse envisagée par certains d'entre nous quant à une action thyroximimétique de ce nouveau composé thyroïdien, soit vérifiée. Ses effets périphériques sont en effet essentiellement différents de ceux des hormones thyroïdiennes.