

## MECANISME D'ACTION DE L'ACIDE IODO-4-SALICYLIQUE SUR LA RESPIRATION DES MITOCHONDRIES ISOLEES

FRANÇOIS-XAVIER GALEN, ROGER TRUCHOT et RAYMOND MICHEL

Endocrinologie, UER des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris-Luxembourg, 4, Avenue de l'Observatoire 75270 Paris  
Biochimie Pharmaceutique, UER des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Dijon, 7, Boulevard Jeanne d'Arc 21033 Dijon Cedex, France

(Received 12 July 1973; accepted 4 October 1973)

**Abstract** The mechanism of action of 4-iodosalicylic acid on oxidative phosphorylation in isolated rat liver mitochondria was studied. 4-Iodosalicylic acid reversed oligomycin inhibition of respiration in state 3 mitochondria. In a state uncoupled by 2,4-dinitrophenol, however, the  $O_2$  consumption rate was lowered by the iodocompound. The Lineweaver-Burk plot of 4-iodosalicylic acid inhibition of the rate of  $O_2$  consumption with variable concentrations of succinate in the presence of ADP, was represented by straight lines. The inhibition was noncompetitive. With mitochondria in state 3, double wavelength spectrophotometric analysis of oxidoreduction states of respiratory coenzymes, showed that 4-iodosalicylic acid increased the oxidation of all components of the electron transport chain, in spite of the fact that it inhibited the oxygen consumption rate. In conclusion 4-iodosalicylic acid may be considered as an uncoupling agent, for its effects are similar in some aspects to those of 2,4-dinitrophenol. It is possible that there are at least two distinct sites at which the iodo-phenol can inhibit respiration; one site is probably in the respiratory chain and the other, more important, related with the coupling of high-energy intermediates.

LES ACIDES hydroxybenzoïques et leurs dérivés iodés affectent le fonctionnement des mitochondries isolées puisqu'ils stimulent leur respiration lorsqu'elles sont placées dans l'état contrôlé et l'inhibent lorsqu'elles se trouvent dans l'état actif.<sup>1</sup> les effets opposés, dont l'intensité dépend de la position des substituants hydroxylés et iodés, sont obtenus avec des concentrations voisines. Par contre le dinitro-2,4 phénol (DNP) ne ralentit la vitesse de consommation d'oxygène dans l'état 3 qu'avec des concentrations beaucoup plus élevées que celles qui activent considérablement l'état 4<sup>2</sup> tandis que parmi d'autres phénols iodés, les iodothyronines ont un comportement qui se rapproche de celui des composés salicylés, bien que leur réponse sur l'état 4 soit plus faible.

Nous nous proposons d'étudier les mécanismes par lesquels les acides iodosalicyliques affectent les fonctions mitochondrielles. Dans ce but, nous avons choisi l'acide hydroxy-2-ido-4-benzoïque ou acide iodo-4 salicylique qui est un effecteur très puissant parmi les composés précédemment testés.<sup>1</sup> Notre travail consiste à rechercher les réponses du dérivé halogéné lorsqu'il est associé à des effecteurs de la biosynthèse de l'ATP et à déterminer la nature de l'inhibition qu'il provoque sur la respiration activée des mitochondries. Nous avons examiné l'influence de l'acide hydroxyiodobenzoïque sur l'état d'oxydoréduction des coenzymes respiratoires.

### CONDITIONS EXPERIMENTALES

La préparation des mitochondries et les conditions de la mesure de la respiration par polarographie, sont analogues à celles décrites précédemment<sup>1</sup> lorsque les expériences portent sur les effets de l'acide iodo-4 salicylique associé soit avec l'oligomycine qui est un inhibiteur de la phosphorylation de l'ADP, soit avec le dinitro-2,4 phénol, agent découplant type. Les études cinétiques d'inhibition sont réalisées selon une technique préconisée antérieurement:<sup>2</sup> on ajoute successivement dans la cellule de l'oxygraphe thermostatée à 25° et contenant 1,5 ml de solution tamponnée, 2 mg de protéines mitochondrielles en suspension dans le saccharose sous un volume inférieur à 60 µl, de l'ADP 320 µM, et l'acide iodo-4 salicylique ou son solvant. La réaction est déclenchée par le succinate à diverses concentrations, qu'on introduit en dernier lieu. La solution tampon renferme de la roténone 1,5 µM et les sels aux concentrations suivantes: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 13 mM; NaCl 26 mM; KCl 58 mM; MgCl<sub>2</sub> 6 mM; NaF 12 mM, le pH final est 7,35.

Les travaux sur les changements d'état d'oxydoréduction des coenzymes respiratoires sont effectués grâce à un spectrophotomètre différentiel à double longueur d'onde Aminco Chance<sup>3</sup> tandis que la vitesse de consommation d'oxygène des mitochondries est déterminée parallèlement à l'oxygraphe GMF muni d'une électrode de Clark. La cuve renfermant l'électrode et celle du spectrophotomètre sont thermostatées à la température de 25° et le volume final du milieu réactionnel est de 3 ml pour chaque essai. Le β-hydroxybutyrate 2 mM ou le succinate 6 mM, l'ADP 0,9 mM et l'acide iodosalicylique ou son solvant sont introduits successivement au cours de l'enregistrement des phénomènes consécutifs à l'addition de 7 mg de protéines mitochondrielles; la solution d'incubation est constituée par le tampon précédent supplémenté soit par du malonate de sodium 2 mM, soit par de la roténone 1,5 µM selon la nature du substrat oxydable. L'état d'oxydoréduction des différents coenzymes respiratoires est suivi en tenant compte des couples de longueur d'onde indiqués<sup>3</sup> qui sont de 388 et 350 nm pour le coenzyme pyridinique; 465 et 510 nm pour les flavoprotéines; 562 et 575 nm pour le cytochrome b; 550 et 540 nm pour le cytochrome c; 605 et 630 nm pour le cytochrome aa<sub>3</sub>.

### RESULTATS

*Association de l'acide iodo-4-salicylique avec des effecteurs des oxydophosphorylations.* Les essais ont pour objet de mettre en évidence le rôle du produit iodé sur les étapes qui conduisent à la synthèse de l'ATP, grâce à l'emploi d'inhibiteurs dont les effets sont relativement bien connus.<sup>4</sup> On utilise d'une part l'oligomycine qui s'oppose à la prise de phosphate, et d'autre part le dinitro-2,4 phénol qui agit au niveau des réactions de conservation de l'énergie.

La respiration des mitochondries placées en état 3 est inhibée par l'oligomycine, laquelle est sans effet en état 4. L'addition d'acide iodo-4 salicylique lève l'inhibition pour des concentrations comprises entre 0,05 et 0,2 mM ainsi qu'il ressort de la Fig. la, où la réponse est comparée à celle obtenue avec le DNP 0,01 mM.

L'addition de l'acide iodo-4 salicylique aux concentrations de 0,2 à 0,5 mM au cours de l'état activé, qui correspond à la phosphorylation de l'ADP par les mitochondries, se traduit par une inhibition de la consommation d'oxygène de 30 à 60 pour-cent. Le tracé oxygraphique de la Fig. 1b montre que si l'on ajoute ensuite du dinitro-2,4 phénol 0,02 mM, dose totalement découplante, aucun changement de la

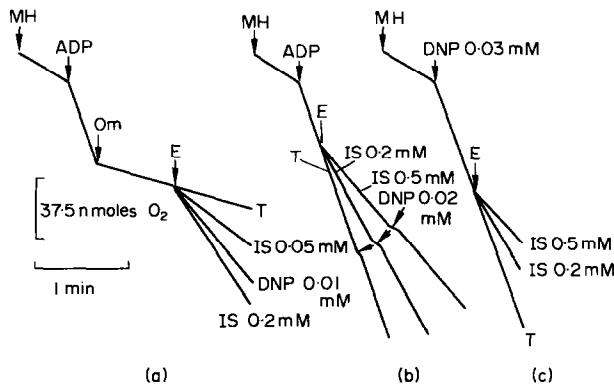


FIG. 1. Enregistrements de la respiration des mitochondries hépatiques de rat (MH) avec le succinate 6 mM et la rotenone 1.5  $\mu\text{M}$  en présence de divers effecteurs (E). Ces derniers comprennent soit l'acide iodo-4 salicylique (IS) ou son solvant comme témoin (T), soit le dinitro-2,4 phénol (DNP) aux concentrations indiquées, sont ajoutés aux temps représentés par les flèches. Abscisse: temps (min); Ordonnée: quantité d'oxygène (nmoles). (a) ADP 320  $\mu\text{M}$ , oligomycine 10  $\mu\text{g}$  (Om) et effecteurs (E); (b) ADP 320  $\mu\text{M}$  et effecteurs (E); (c) dinitro-2,4 phénol (DNP) et effecteurs (E).

vitesse respiratoire ne se manifeste; le phénol nitré ne lève donc pas l'inhibition due au phénol iodé. Il ressort de la Fig. 1c que, lorsque le DNP est ajouté à la concentration de 0,03 mM qui provoque une activation de l'état 4 semblable à celle induite par l'ADP 320  $\mu\text{M}$ , l'acide iodo-4 salicylique additionné après le DNP aux concentrations de 0,2 à 0,5 mM, doses stimulantes de l'état contrôlé, s'oppose à l'effet activateur du découplant nitré. L'intensité de l'inhibition est analogue à celle que provoquent les mêmes doses du phénol halogéné avec des mitochondries respirant en présence d'ADP.

*Cinétique d'inhibition.* Les valeurs de la vitesse respiratoire des mitochondries en état 3, obtenues en faisant varier la concentration en succinate sont rapportées sur

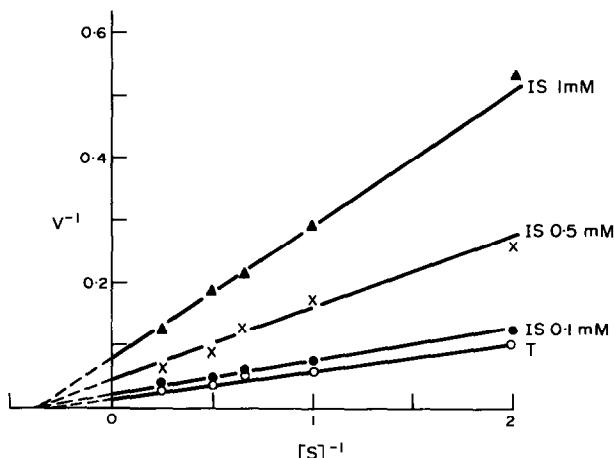


FIG. 2. Cinétique d'inhibition de l'oxydation du succinate à diverses concentrations par l'acide iodo-4-salicylique (IS).  $V^{-1}$  = inverse de la vitesse respiratoire exprimée en nmoles  $\text{O}_2 \times \text{mn}^{-1}$  pour 1 mg de protéines mitochondrielles dans 1 ml.  $S^{-1}$  = inverse de la concentration du substrat en mM. T = témoin effectué en présence du solvant.

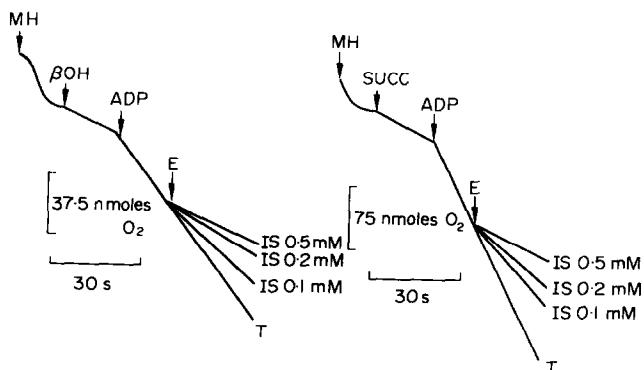


FIG. 3. Enregistrements à l'électrode de Clark de la respiration activée par ADP 0.9 mM en présence de mitochondries hépatiques de rat après addition d'effecteurs (E). MH = mitochondries hépatiques 7 mg;  $\beta$ OH =  $\beta$ -hydroxybutyrate 2 mM; SUCC = succinate 6 mM; IS = Acide iodo-4 salicylique . . T = témoin moins solvant; abscisse: temps (sec); ordonnée: quantité d'oxygène (nmoles).

des courbes réalisées selon la représentation de Lineweaver Burk. On porte en ordonnée l'inverse de la vitesse respiratoire exprimée en nmoles  $O_2 \times mn^{-1}$  pour 1 mg de protéines dans 1 ml. et en abscisse, l'inverse de la concentration mM du succinate. La Fig. 2 qui traduit les expériences effectuées avec 3 concentrations d'acide iodo-4 salicylique et le solvant qui sert de témoin, montre que le système multienzymatique complexe d'oxydophosphorylation des mitochondries semble obéir aux lois de la cinétique michaelienne classique puisque la représentation en double inverse donne lieu à des droites, comme celles-ci convergent sur l'axe des abscisses, il apparaît que l'inhibition est de nature non compétitive vis-à-vis du succinate, la constante d'inhibition calculée étant de 0.28 mM.

*Variation de l'état d'oxydoréduction des coenzymes respiratoires.* Nous avons étudié les variations de l'état d'oxydoréduction des principaux constituants de la chaîne respiratoire afin d'essayer de localiser le site d'intervention de l'acide iodo-4 salicylique sur les chaînes de transport des électrons, lorsque les mitochondries oxydent le succinate ou le  $\beta$ -hydroxybutyrate en état 3. Les concentrations de produit iodé utilisées au cours de ces essais sont comprises entre 0.1 et 0.5 mM : elles provoquent une inhibition respiratoire en état 3 comprise entre 30 et 70 pour-cent ainsi qu'il ressort de la Fig. 3. Les Figs. 4 et 5 sont données à titre d'exemple : elles représentent les enregistrements spectrophotométriques de chaque coenzyme respiratoire, obtenus avec les deux substrats, tandis que le Tableau 1 rend compte des variations de transmission dues au changement d'état d'oxydoréduction.

En présence de  $\beta$ -hydroxybutyrate, l'influence de l'acide iodo-4 salicylique se traduit par une oxydation du NADH. Il convient de remarquer que le phénol iodé interfère avec les mesures de l'état d'oxydoréduction du coenzyme, lesquelles sont réalisées au couple de longueur d'onde 388 nm (point isobestique) et 350 nm (mesure). En effet, si l'acide iodo-4 salicylique ne présente pas d'absorption à 388 nm, par contre il provoque une diminution de transmission à 350 nm de 1.8 et 5 pour-cent, pour des concentrations respectives de 0.1 et 0.5 mM. On doit donc en tenir compte dans l'expression quantitative des résultats rassemblés sur le Tableau 1 qui rapporte également les changements de l'état d'oxydoréduction des autres coenzymes pour lesquels aucune correction n'est nécessaire. Les Figs. 4 et 5 et le Tableau 1 montrent que les

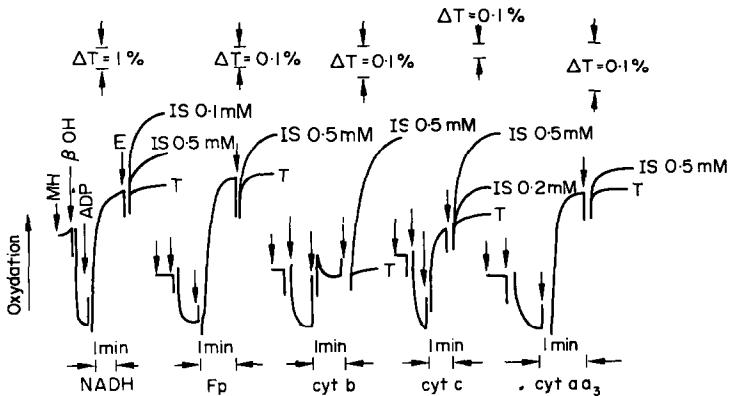


FIG. 4. Enregistrements spectrophotométriques de la variation de transmission  $\Delta T$ , consécutive aux changements d'état d'oxydoréduction des coenzymes respiratoires des mitochondries placées dans l'état activé par l'ADP, en présence de  $\beta$ -hydroxybutyrate. Les flèches indiquent les temps où sont ajoutés les différents produits, l'ordre d'introduction étant le même pour chacun des coenzymes. MH = mitochondries hépatiques 7 mg;  $\beta$ OH =  $\beta$ -hydroxybutyrate 2 mM; ADP 0.9 mM; E = effecteurs: l'acide iodo-4 salicylique (IS) ou son solvant constituant le témoin (T).

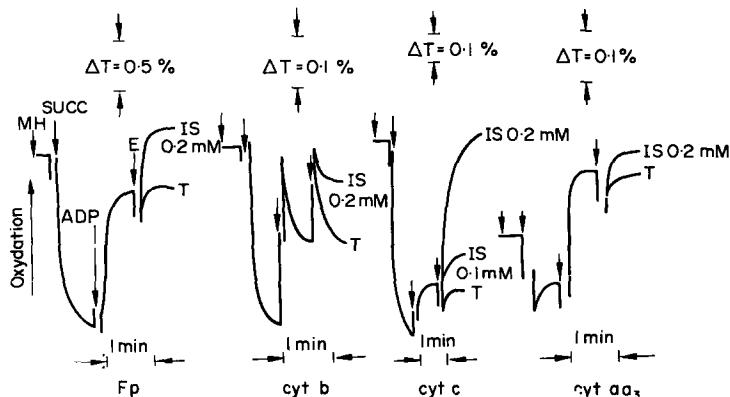


FIG. 5. Enregistrements spectrophotométriques de la variation de transmission  $\Delta T$ , consécutive aux changements d'état d'oxydoréduction des coenzymes respiratoires des mitochondries placées dans l'état activé par l'ADP en présence de succinate. Les flèches indiquent les temps où sont ajoutés les différents produits, l'ordre d'introduction étant le même pour chacun des coenzymes. MH = mitochondries hépatiques 7 mg; SUCC = succinate 6 mM; ADP 0.9 mM; E = effecteurs: l'acide iodo-4 salicylique (IS) ou son solvant constituant le témoin (T).

flavoprotéines liées soit à la succinodéshydrogénase, soit à la NADH déshydrogénase sont toutes deux oxydées sous l'effet de l'acide iodo-4 salicylique, la variation de transmission étant de 0,24 pour-cent pour une concentration de 0,5 mM. Il en est de même pour les cytochromes b, c, communs aux deux déshydrogénases, quel que soit le substrat oxydable. Les phénomènes sont moins nets avec le cytochrome aa<sub>3</sub>, car les variations observées sont très faibles mais vont toujours dans le sens de l'oxydation.

TABLEAU I. VARIATION DE TRANSMISSION CONSÉCUTIVE À L'OXYDATION DES COENZYMES DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE SOUS L'EFFET DE L'ACIDE IODO-4 SALICYLIQUE EN PRÉSENCE D'ADP 0,9 mM ET DE  $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE 2 mM ( $\beta$ OH) OU DE SUCCINATE 6 mM (SUCC)

Acide iodo-4 salicylique (mM)	Variation $\Delta T$ en ‰ de transmission											
	NADH		FpN		FpS		Cyt b		Cyt c		Cyt aa <sub>3</sub>	
	$\beta$ OH (a)	$\beta$ OH (b)	$\beta$ OH	SUCC	$\beta$ OH	SUCC						
0	0.2	0.2	0.01	0.04	0.03	0.01	0.08	0	0	0	0	0
0.1	3.7	5.5							0.16			
0.2				0.60			0.12	0.32	0.60			0.032
0.5	1.7	6.7	0.24		0.44			0.80		0.05		

FpN flavoprotéines liée à la NADH déshydrogénase.

FpS flavoprotéine liée à la succinodéshydrogénase.

(a) Valeurs lues sur l'enregistrement (Fig. 4).

(b) Valeurs corrigées.

### DISCUSSION ET CONCLUSION

La comparaison des effets de l'acide iodo-4 salicylique et du dinitro-2,4 phénol sur la respiration des mitochondries placées en état contrôlé confirme que le premier agit à la façon du second et peut dès lors être considéré comme un agent découpant,<sup>1</sup> puisque comme le phénol nitré<sup>5</sup> il lève l'inhibition respiratoire due à l'oligomycine ajoutée à des particules se trouvant en état 3. Cependant le mécanisme d'action du phénol iodé diffère de celui du DNP, ainsi qu'il ressort des expériences comportant l'association des deux produits. Les enregistrements rapportés sur la Fig. 1 (b et c) montrent que les réponses des deux phénols ne sont pas additives. Or si l'on se réfère à la théorie classique des intermédiaires chimiques de conservation de l'énergie, on aurait dû avoir dans le cas d'un découpant simple, une nouvelle stimulation de la respiration. On admet en effet que les découplants agissent en décomposant instantanément les intermédiaires énergétiques après formation très éphémère d'un complexe ternaire.<sup>4</sup> Il est donc probable que le composé iodé donne naissance à un complexe moins instable que celui dû au DNP, s'opposant ainsi à l'action de ce dernier.

La nature de l'inhibition consécutive à l'addition de fortes doses de dinitro-2,4 phénol sur des mitochondries en état 3 est de nature compétitive vis-à-vis du succinate,<sup>2</sup> alors que l'acide iodo-4 salicylique affecte de façon non compétitive l'oxydation du substrat comme les iodothyronines.<sup>6</sup> Le comportement de l'acide iodosalicylique semble procéder de réponses complexes. L'une qui pourrait être en relation avec une intervention au niveau des étapes de conservation de l'énergie, sans doute avant le DNP. L'autre effet pourrait intéresser les réactions de transfert des électrons.

L'acide iodo-4 salicylique provoque l'oxydation de l'ensemble des coenzymes respiratoires avec des mitochondries placées en état 3. Bien qu'une inhibition respiratoire se manifeste à diverses doses (Fig. 3), le dérivé iodé agit de façon différente de celle des iodothyronines. Car si celles-ci favorisent en état 3, comme en état 4, l'oxydation complète des cytochromes b et c, elles entraînent une réduction partielle des 2 types de flavoprotéines,<sup>7</sup> ce qui caractérise un point d'intervention au carrefour des déshydrogénases dans la région de l'ubiquinone. Par contre, l'acide iodo-4 salicylique possède un comportement analogue à celui des découplants comme le DNP ou le

dibromo-2,4 phénol qui, aux fortes doses, inhibitrices de l'état 3, agissent en oxydant tous les coenzymes, sauf peut-être les cytochromes a et a<sub>3</sub> pour lesquels les phénomènes sont moins nets<sup>3,8</sup> comme d'ailleurs dans nos essais.

En conclusion l'acide iodo-4 salicylique possède au moins deux sites d'action ; l'un qui pourrait être localisé au niveau des chaînes de transfert des électrons mais qui semble masqué par l'autre qui intervient au niveau des intermédiaires conduisant à la synthèse de l'ATP. Ces faits permettent de rapprocher l'influence de l'acide iodo-4 salicylique à la fois de celle du dinitro-2,4 phénol et des iodothyronines sur les particules hépatiques.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. F. X. GALEN, R. TRUCHOT et R. MICHEL, *Biochem. Pharmac.* **23**, 1367 (1974).
2. D. F. WILSON et R. D. MERZ, *Archs. Biochem. Biophys.* **119**, 470 (1967).
3. B. CHANCE et B. HAGHIARA, in *Intracellular Respiration* (Ed. E. C. SLATER) Vol. 5, p. 3. Pergamon Press, Oxford (1963).
4. P. D. BOYER, in *Biological Oxydations* (Ed. T. P. SINGER) p. 193. Interscience, New York (1968).
5. H. A. LARDY, D. JOHNSON et W. C. MCMURAY, *Archs. Biochem. Biophys.* **78**, 587 (1958).
6. R. MICHEL et J. PAIRault, *C.r. Acad. Sci., Paris* **268**, 1549 (1969).
7. R. MICHEL, A. LEBLANC et O. MICHEL, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **51**, 389 (1969).
8. J. E. RALL, R. MICHEL, J. ROCHE, O. MICHEL et S. VARRONE, *J. biol. Chem.* **238**, 1848 (1963).

**Résumé**—Les recherches ont porté sur le mécanisme par lequel l'acide iodo-4 salicylique affecte les mitochondries isolées de foie de rat. L'acide iodo-4 salicylique lève l'inhibition respiratoire due à l'oligomycine avec des mitochondries placées en état 3. Par contre il ralentit la vitesse de consommation d'oxygène lorsque les mitochondries sont découpées par le dinitro-2,4 phénol. La représentation selon Lineweaver-Burk, de l'inhibition de la consommation d'oxygène par l'acide iodo-4 salicylique en état 3 succinate donne lieu à des droites, lesquelles sont convergentes sur l'axe des abscisses, ce qui implique que l'inhibition est de nature non compétitive. Avec les mitochondries en présence d'ADP, l'analyse de l'état d'oxydoréduction des coenzymes respiratoires par spectrophotométrie à double longueur d'onde, montre que l'acide iodo-4 salicylique provoque une oxydation de tous les constituants de la chaîne des transporteurs d'électrons, bien que le composé iodé inhibe partiellement la respiration. En conclusion on peut considérer que l'acide iodo-4 salicylique se comporte comme un découplant puisqu'il oxyde les coenzymes respiratoires. Son action diffère cependant de celle du DNP puisque la cinétique d'inhibition est de nature non compétitive avec le phénol iodé. L'acide iodo-4 salicylique possède probablement deux sites d'action sur les phosphorylations oxydatives, l'un sur la chaîne respiratoire sans doute masqué par l'autre localisé au niveau des étapes de conservation de l'énergie.