

# INFLUENCE D'ANALOGUES STRUCTURAUX DE LA TRIIODO-3,5,3'-L-THYRONINE SUR L'ACTIVITE DE LA GLUTAMATE DESHYDROGENASE ET DE L'ISOCITRATE DESHYDROGENASE MITOCHONDRIALES HEPATIQUES ET CARDIAQUES ET DE L'ALCOOL DESHYDROGENASE HEPATIQUE: *IN VIVO ET IN VITRO*

HERVÉ GOUDONNET, ROGER TRUCHOT et RAYMOND MICHEL

Laboratoire de Biochimie pharmaceutique, U.E.R. des Sciences pharmaceutiques et biologiques de Dijon, 7 Bd. Jeanne d'Arc - 21 000 Dijon et Laboratoire d'Endocrinologie, U.E.R. des Sciences pharmaceutiques et biologiques de Paris Luxembourg, 4 Av. de l'Observatoire - 75270 Paris Cedex 06, France

(Received 20 July 1974; accepted 24 February 1975)

**Abstract**—In thyroidectomized rats, 3,5,3'-triodo-thyroformic ( $TF_3$ ), 3,5,3'-triodo-thyroacetic ( $TA_3$ ) and 3,5,3'-triodo-thyropipionic ( $TP_3$ ) acids, which are structural analogs of 3,5,3'-triodo-L-thyronine ( $LT_3$ ), counteract the decrease of mitochondrial glutamate dehydrogenase (GIDH) activity and the increase of mitochondrial isocitrate dehydrogenase (ICDH) and cytoplasmic alcohol dehydrogenase (ADH) activities in liver. The effect of  $TA_3$  is similar to that of  $LT_3$ , those of  $TP_3$  and  $TF_3$  being, in this order, lower.  $TF_3$ ,  $TA_3$  and  $TP_3$  have no effect on heart mitochondrial ICDH activity, an activity which does not appear to be influenced by thyroidectomy. *In vitro*,  $TF_3$ ,  $TA_3$  and  $TP_3$  inhibit GIDH, ICDH and ADH activities when tested either on liver subcellular fractions or on pure enzymes: the effects are more pronounced on GIDH than on ADH or on ICDH. The three iodinated derivatives present differences in the competitive character of the inhibition they exert against the substrate or cosubstrate involved in the different enzyme reactions investigated.

L'activité de plusieurs enzymes et notamment de nombreuses deshydrogénases à effeteur métallique dépend de l'état thyroïdien [1-3] et est influencée par un traitement hormonal [4-6]. L'activité de l'alcool deshydrogénase hépatique cytoplasmique est nettement stimulée chez l'animal hypothyroïdien alors qu'elle est freinée après administration de L-T<sub>3</sub> [7]. Selon certains auteurs, la thyroidectomie ou l'hypothyroïdie n'affecteraient pas la glutamate deshydrogénase mitochondriale [1], tandis que pour d'autres, elle serait diminuée dans l'hypothyroïdie et accrue chez l'animal rendu hyperthyroïdien [8, 9].

Les résultats apparaissent également contradictoires avec l'isocitrate deshydrogénase des mitochondries hépatiques et cardiaques puisque le traitement par les iodothyrionines augmenterait l'activité de l'enzyme dépendant de NAD et diminuerait celle dépendant de NADP [1, 10].

Les effets produits par les hormones thyroïdiennes *in vitro* sur les enzymes purifiées sont cependant plus homogènes. On observe dans tous les cas une inhibition de l'activité enzymatique, mais celle-ci est plus ou moins importante. L'isocitrate deshydrogénase isolée du cœur de porc et l'alcool deshydrogénase de foie de cheval ou de levure, sont inhibées de 50% pour des concentrations relativement élevées en L-thyroxine [11-13] (de l'ordre de  $10^{-4}$  M), tandis que

la glutamate deshydrogénase de foie de bovins l'est pour une concentration beaucoup plus faible:  $10^{-6}$  M [14-16].

Par ailleurs, de nombreux analogues structuraux des iodothyrionines possèdent des activités thyromimétiques [17, 18], mais l'intensité de leurs réponses dépend souvent de l'essai physiologique. Ainsi nous a-t-il semblé intéressant de comparer les effets de plusieurs composés *in vitro* sur les enzymes sensibles aux hormones thyroïdiennes afin d'une part de préciser le rôle des différentes fonctions des iodothyrionines sur les inhibitions enzymatiques et d'autre part de situer, dans ce domaine, l'intérêt des essais *in vitro* pour la compréhension des effets constatés *in vivo*. Les substances utilisées au cours de notre travail sont des dérivés dans lesquels le reste alanine de la triiodo-3,5,3'-L-thyronine (L-T<sub>3</sub>) est remplacé par une chaîne carboxylique non aminée. Ce sont les acides triiodo-3,5,3'-thyroformique ( $TF_3$ ), triiodo-3,5,3'-thyroacétique ( $TA_3$ ) et triiodo-3,5,3'-thyropipionic ( $TP_3$ ) qui ne diffèrent entre eux que par la longueur de leur chaîne latérale. Nous avons étudié *in vivo* et *in vitro* l'influence de  $TF_3$ ,  $TA_3$  et  $TP_3$  sur trois deshydrogénases différentes, toutes trois à effeteur cationique, mais de localisation différente. Il s'agit de la NAD-glutamate deshydrogénase (EC 1.4.1.3) mitochondriale hépatique [19, 20], de l'alcool deshydrogénase

(EC 1.1.1.1), oxydoréductase à cation  $Zn^{2+}$  présente dans la fraction soluble de la cellule [21, 22], étudiée dans le surnageant final de centrifugation de l'homogénat hépatique, et de l'isocitrate deshydrogénase [23, 24] (EC 1.1.1.42) enzyme activée par  $Mn^{2+}$ ; il existe plusieurs isocitrate deshydrogénases; nous avons étudié celle dépendante de NADP, présente dans la mitochondrie cardiaque et dans la mitochondrie hépatique.

## METHODES EXPERIMENTALES ET RESULTATS

### I Produits chimiques et biologiques

La triiodo-3,5,3' L-thyronine, l'acide triiodo-3,5,3' thyroacétique et l'acide triiodo-3,5,3' thyropropionique sont fournis par les Laboratoires Sigma. L'acide triiodo-3,5,3' thyroformique est un produit Pfaltz-Bauer. Les coenzymes NAD et NADP sont des produits Boehringer. La thréo-D-isocitrate NADP oxydoréductase cardiaque cristallisée de porc d'activité égale à 2 U.  $\times mg^{-1}$  de protéine et l'éthanol NAD oxydoréductase hépatique cristallisée de cheval titrant 50 U.  $\times mg^{-1}$  de protéine sont des préparations Boehringer. L'alcool deshydrogénase lyophilisée de levure (200 U.  $\times mg^{-1}$ ) est une enzyme Koch-Light. La L-glutamate deshydrogénase hépatique cristallisée de boeuf (3 à 5 U.  $\times mg^{-1}$  de protéine) est fournie par Sigma. La protéinase bactérienne "Nagarse" est fournie par les Laboratoires Nagarse et Co., Ltd., Osaka, Japon. Le triton  $\times 100$  est fourni par Koch-Light.

### II Expérimentation in vivo

(1) *Traitement des animaux.* Les expériences sont réalisées sur des rats Wistar mâles. Hormis les témoins, ces animaux sont thyroïdectomisés chirurgicalement à un poids de 60 à 80 g. L'installation de l'hypothyroïdie qui demande plusieurs semaines après l'opération est surveillée par la mesure du métabolisme de base grâce à un analyseur d'oxygène Beckman modèle 777 et par la courbe de poids des animaux en fonction du temps. Au cours d'un premier essai, des lots de 8 rats thyroïdectomisés sont traités respectivement par L-T<sub>3</sub>, TF<sub>3</sub>, TA<sub>3</sub> et TP<sub>3</sub> administrés par voie intraperitoneale à raison de 3  $\mu g$  (soit environ 5 nmoles) pour 100 g de poids corporel, par jour, en solution rendue isotonique par NaCl. Le traitement dure 21 jours. Un lot de 8 rats thyroïdectomisés non traités et un lot de 8 rats normaux servent de témoins. Pour le seconde expérience destinée à mettre en évidence les effets à court terme des substances employées à doses élevées, le traitement des animaux thyréoprives est conduit en 3 jours à raison de 30  $\mu g/100$  g de poids/jour. Enfin, une troisième expérience est effectuée sur des rats thyroïdectomisés chez lesquels l'administration des thyromimétiques est mise en oeuvre avant que la thyroïdectomie ait pu produire une hypohormonémie préalable. Le traitement par L-T<sub>3</sub> et TA<sub>3</sub> est institué immédiatement après l'ablation de la glande et dure 21 jours à raison de 10  $\mu g/100$  g de poids corporel. Les témoins sont constitués par un lot de 8 rats non traités qui ont été thyroïdectomisés à la même date que les animaux traités et par un lot de rats normaux.

Dans tous les cas, les animaux sont sacrifiés 18 h après la dernière injection. On prélève le cœur et le

foie qu'on homogénéise au Potter pour isoler les fractions subcellulaires suivant le protocole décrit plus loin. Les préparations sont conduites séparément pour chaque rat, ce qui permet de connaître les valeurs individuelles des activités enzymatiques et de calculer pour chaque lot les valeurs moyennes et les écarts-types.

(2) *Préparation des fraction subcellulaires.* (a) Mitochondries hépatiques—Les mitochondries sont séparées selon la méthode de Beattie [25] par centrifugation différentielle et lavages répétés 3 fois (centrifugeuse Sorvall type RC 2 B) en milieu saccharose 0,25 M amené à pH = 7,4 à l'aide de Tris 2 mM.

(b) Mitochondries cardiaques—Les mitochondries cardiaques sont préparées par la méthode de Chappell et Hansford [26]. Le milieu de suspension: manitol 0,21 M, saccharose 0,07 M, Tris-HCl pH = 7,5:5 mM, EGTA 1 mM est additionné d'une enzyme protéolytique (Nagarse 0,5 mg/g cœur). Cette préparation est effectuée dans des conditions de température très strictes (0°).

La qualité de la suspension mitochondriale est contrôlée par un essai oxygraphique (oxygraphe Gilson type GME équipé d'une électrode vibrante) et d'autre part, par la détermination de la contamination microsomale objectivée par l'activité de la NADPH cytochrome *c* réductase [27], marqueur enzymatique de cette fraction (moins de 3% de contamination microsomale par la méthode de Beattie).

(c) Dosage des protéines mitochondrielles—Les protéines mitochondrielles sont dosées par la méthode colorimétrique du biuret [28], en présence de cholate de sodium à 4% (p/v) pour accélérer la lyse des membranes.

(d) Fraction cytoplasmique soluble hépatique—L'homogénat de foie de rat en milieu saccharose 0,25 M tamponné à pH = 7,4 à l'aide de Tris 2 mM est soumis à une centrifugation d'une heure à 105,000 g dans une centrifugeuse réfrigérée sous vide (Beckman Spinco type L 2, rotor 50). Le surnageant final est recueilli pour l'étude de l'activité alcool deshydrogénasique.

(3) *Mesure des activités enzymatiques.* (a) NAD-glutamate deshydrogénase mitochondriale hépatique—Après centrifugation de la suspension mitochondriale hépatique, le culot est repris par une solution de saccharose 0,25 M contenant 1% (p/v) de Triton  $\times 100$  (0,5 ml/mg de protéine mitochondriale) permettant la solubilisation totale des protéines. L'activité enzymatique est déterminée uniformément 15 min après l'addition de Triton afin d'éviter les effets de l'inactivation progressive due au détergent (4% en une h). La réduction enzymatique de NAD (0,4 mM) en présence de glutamate de potassium (15 mM) en tampon phosphate de potassium 0,2 M de pH = 7,6 est suivie par spectrophotométric U.V. à 340 nm grâce à un spectrophotomètre Beckman DB [29]. Les résultats sont exprimés en nmoles d'acide glutamique transformé par minute et par mg de protéine mitochondriale.

(b) NADP-isocitrate deshydrogénase mitochondriale hépatique et cardiaque—L'activité de la préparation mitochondriale cardiaque obtenue dans les mêmes conditions que la précédente, est mesurée en suivant à 340 nm la réduction de NADP (0,42 mM) en présence d'isocitrate de sodium (1 mM) comme

Tableau 1. Effets du traitement de rats thyréoprives par L-T<sub>3</sub>, TF<sub>3</sub>, TA<sub>3</sub> et TP<sub>3</sub> sur les activités enzymatiques: NAD-glutamate deshydrogénase mitochondriale hépatique (GIDH (1)), NADP-isocitrate deshydrogénase mitochondriale hépatique (ICDH (2a)) et cardiaque (ICDH (2b)) et NAD-alcool deshydrogénase hépatique cytoplasmique (ADH (3))

Séries d'animaux			Activités enzymatiques (nmoles. mn <sup>-1</sup> . mg <sup>-1</sup> )			
Etat thyroïden	Traitement	Nombre d'animaux	GIDH (1)	ICDH (2a)	ICDH (2b)	ADH (3)
N*	0	8	135 ± 9	71 ± 10	483 ± 86	8,1 ± 0,6
THX†	0	8	98 ± 5‡	135 ± 31‡	525 ± 104	14,2 ± 0,4‡
THX	L-T <sub>3</sub>	8	144 ± 6§	78 ± 17§	463 ± 93	6,6 ± 0,7§
THX	TF <sub>3</sub>	7	126 ± 10§	138 ± 40‡	691 ± 65	13,2 ± 1,2‡
THX	TA <sub>3</sub>	7	140 ± 11§	85 ± 15§	547 ± 59	8,4 ± 0,5§
THX	TP <sub>3</sub>	8	127 ± 9§	83 ± 22§	520 ± 107	10,8 ± 1,0§

Les rats sont traités pendant 21 jours par chacun des dérivés iodés à raison de 3 µg/100 g/jour ( $\approx$  5 nmoles/100 g/jour).

\* N = animaux normaux.

† THX = animaux thyroïdectomisés.

‡ P < 0,01 par rapport à N.

§ P < 0,01 par rapport à THX.

Tableau 2. Effets du traitement de rats thyréoprives par L-T<sub>3</sub>, TF<sub>3</sub>, TA<sub>3</sub> et TP<sub>3</sub> sur les activités enzymatiques: NAD-glutamate deshydrogénase mitochondriale hépatique (GIDH (1)), NADP-isocitrate deshydrogénase mitochondriale hépatique (ICDH (2a)) et cardiaque (ICDH (2b)) et NAD-alcool deshydrogénase hépatique cytoplasmique (ADH (3))

Séries d'animaux			Activités enzymatiques (nmoles. mn <sup>-1</sup> . mg <sup>-1</sup> )			
Etat thyroïden	Traitement	Nombre d'animaux	GIDH (1)	ICDH (2a)	ICDH (2b)	ADH (3)
N*	0	8	154 ± 10	76 ± 9	580 ± 37	7,3 ± 0,8
THX†	0	7	115 ± 5‡	115 ± 11†	576 ± 42	13,4 ± 0,5†
THX	L-T <sub>3</sub>	8	136 ± 7§	91 ± 6§	473 ± 36	7,1 ± 0,6§
THX	TF <sub>3</sub>	7	119 ± 14	121 ± 11	647 ± 52	13,9 ± 1,1
THX	TA <sub>3</sub>	8	135 ± 10§	97 ± 12§	561 ± 74	10,1 ± 0,9
THX	TP <sub>3</sub>	8	124 ± 13	105 ± 11	611 ± 88	11 ± 0,6

Les rats sont traités pendant 3 jours par chacun des produits iodés à raison de 30 µg/100 g/jour, ( $\approx$  50 nmoles/100 g/jour).

\* N = animaux normaux.

† THX = animaux thyroïdectomisés.

‡ P < 0,01 par rapport à N.

§ P < 0,01 par rapport à THX.

|| P < 0,05 par rapport à THX.

Tableau 3. Effet du traitement de rats thyroïdectomisés de 24 h par L-T<sub>3</sub> et TA<sub>3</sub> sur les activités enzymatiques: NAD-glutamate deshydrogénase mitochondriale hépatique (GIDH (1)), NADP-isocitrate deshydrogénase mitochondriale hépatique (ICDH (2a)) et cardiaque (ICDH (2b)) et NAD-alcool deshydrogénase hépatique cytoplasmique (ADH (3))

Séries d'animaux			Activités enzymatiques (nmoles. min <sup>-1</sup> . mg <sup>-1</sup> )			
État thyroïdien	Traitement	Nombre d'animaux	GIDH (1)	ICDH (2a)	ICDH (2b)	ADH (3)
N*	0	8	159 ± 11	86 ± 8	511 ± 47	8,4 ± 0,6
THX†	0	8	118 ± 9‡	108 ± 9‡	503 ± 38	12,5 ± 0,5‡
THX	L-T <sub>3</sub>	8	176 ± 8§	76 ± 6§	408 ± 31	7,9 ± 0,3§
THX	TA <sub>3</sub>	8	183 ± 12§	72 ± 8§	390 ± 26	8,1 ± 0,3§

Les rats sont traités pendant 21 jours à raison de 10 µg/100 g/jour ( $\approx$  17 nmoles/100 g/jour).

\* N = rats normaux.

† THX = rats thyroïdectomisés.

‡ P < 0,01 par rapport à N.

§ P < 0,01 par rapport à THX.

substrat, et de  $MnCl_2$  (0,58 mM) dans un tampon phosphate de potassium 0,2 M de pH = 7,4 [30]. Les résultats sont également donnés en nmoles substrat transformé  $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de protéine.

(c) Alcool deshydrogénase cytoplasmique—L'activité alcool deshydrogénase du surnageant à 105,000 g est déterminée par la mesure spectrophotométrique à 340 nm de la réduction de NAD (0,7 mM) dans un tampon pyrophosphate de sodium (0,1 M) de pH = 8,5 en présence d'éthanol 10 mM et de chlorhydrate de semicarbazide 2 % (p/v) [31]. L'activité s'exprime en fonction de la teneur en protéines du milieu.

Les Tableaux 1, 2 et 3 rassemblent l'ensemble des résultats.

### III Influence sur les activités enzymatiques subcellulaires

Des préparations de mitochondries lysées hépatiques et cardiaques et de fraction cytoplasmique soluble, obtenues, dans les conditions décrites plus haut, à partir de rats normaux non traités, sont utilisées pour établir l'inhibition produite "in vitro" par l'addition respective de  $L-T_3$ ,  $TF_3$ ,  $TA_3$  ou  $TP_3$  sur les activités de la glutamate deshydrogénase, de l'isocitrate deshydrogénase et de l'alcool deshydrogénase.

La réaction enzymatique est réalisée dans des conditions de concentration, de pH et de tampon, identiques à celles décrites dans le paragraphe précédent. Les inhibiteurs iodés sont ajoutés à concentrations croissantes et la réaction déclenchée par l'addition du substrat. Les courbes des Figs. 1-3 représentent le pourcentage de diminution de l'activité enzymatique en fonction du logarithme des concentrations en inhibiteurs.

### IV Influence sur l'activité des enzymes pures

Les activités de  $L-T_3$ ,  $TF_3$ ,  $TA_3$  et  $TP_3$  ont enfin été testées sur les enzymes suivantes:  $L$ -glutamate deshydrogénase hépatique cristallisée de boeuf; isocitrate deshydrogénase cardiaque cristallisée de porc; alcool deshydrogénase de levure lyophilisée et alcool deshydrogénase hépatique cristallisée de cheval.

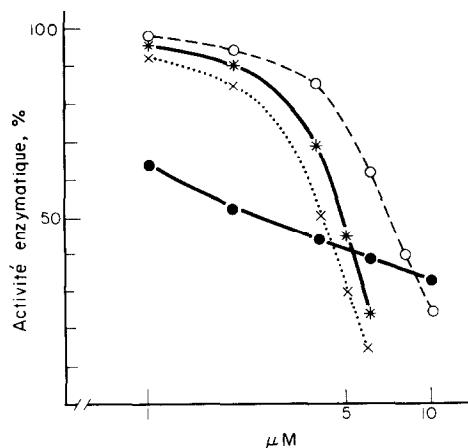


Fig. 1. Effets de  $L-T_3$  (●—●),  $TF_3$  (×—×),  $TA_3$  (○—○) et  $TP_3$  (\*—\*) ajoutés *in vitro* à concentrations variables sur la GIDH mitochondriale hépatique de rat. La valeur 100 représente l'activité enzymatique en l'absence d'inhibiteur.

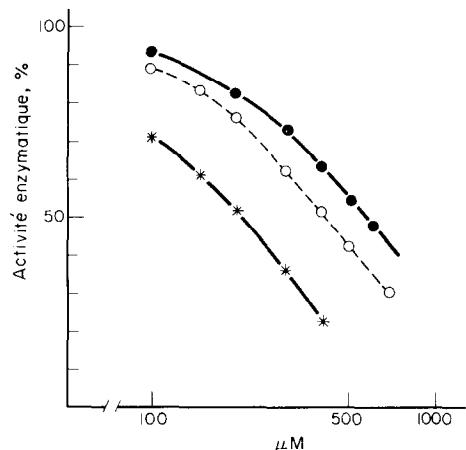


Fig. 2. Effets de  $L-T_3$  (●—●),  $TA_3$  (○—○) et  $TP_3$  (\*—\*) ajoutés *in vitro* à concentrations variables sur l'ADH cytoplasmique de foie de rat. La valeur 100 représente l'activité enzymatique en l'absence d'inhibiteur.

Les essais sont conduits dans les conditions décrites précédemment en utilisant au moins cinq concentrations différentes de chaque effecteur amenant une baisse de l'activité enzymatique comprise entre 20 et 80%. Chaque détermination est répétée 5 fois avec un écart inférieur à 3%.

La représentation graphique des pourcentages d'inhibition en fonction du logarithme des concentrations d'inhibiteur, nous permet de calculer la valeur  $I_{50}$  représentant la concentration de la substance qui réduit de 50% l'activité enzymatique dans les conditions expérimentales choisies.

Le parallélisme des résultats obtenus *in vitro*, d'une part avec les enzymes pures et d'autre part avec les enzymes des préparations mitochondrielles lysées et de la fraction cytoplasmique, nous autorise à poursuivre nos essais avec les premières afin d'établir les caractères de compétitivité de chacun des inhibiteurs vis-à-vis du substrat et du cosubstrat.

La méthode graphique de Lineweaver et Burk [32] est utilisée, chaque point expérimental étant la

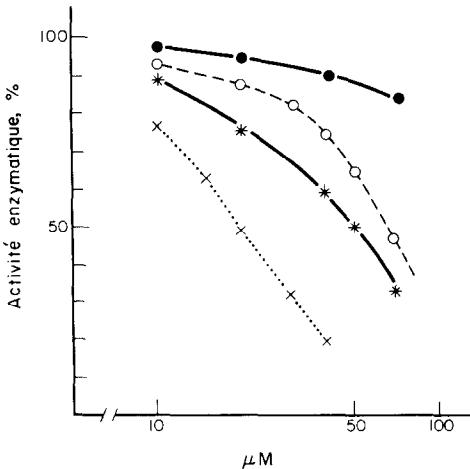


Fig. 3. Effets de  $L-T_3$  (●—●),  $TF_3$  (×—×),  $TA_3$  (○—○) et  $TP_3$  (\*—\*) ajoutés *in vitro* à concentrations variables sur l'ICDH mitochondriale de foie de rat. La valeur 100 représente l'activité enzymatique en l'absence d'inhibiteur.

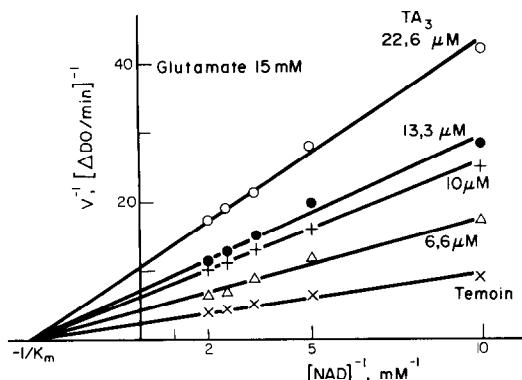


Fig. 4. Inhibition de l'activité GIDH hépatique de bœuf par TA<sub>3</sub> pour des concentrations variables de NAD. Représentation en double inverse de Lineweaver-Burk.

moyenne des valeurs obtenues après cinq déterminations identiques.

Pour la L-glutamate deshydrogénase hépatique de bœuf, la compétitivité vis-à-vis du substrat est étudiée pour des concentrations en glutamate de potassium variant entre 1 et 15 mM, les autres paramètres, constants, reproduisant ceux du paragraphe II. L'étude de la compétitivité vis-à-vis du cosubstrat s'effectue pour des concentrations en NAD échelonnées de 0,05 mM à 0,5 mM.

Pour ce qui concerne l'alcool deshydrogénase de levure ou de foie, les caractères de compétitivité vis-à-vis du substrat et du cosubstrat sont établis respectivement pour des concentrations en éthanol comprises entre 2 et 20 mM, et pour des concentrations en NAD de 0,1 à 1 mM. Dans le cas de l'isocitrate deshydrogénase de cœur de porc, les concentrations varient de 0,05 à 1 mM pour le substrat et de 0,025 à 0,5 mM pour le cosubstrat NADP.

Un exemple de représentation graphique selon Lineweaver-Burk est donné par la Fig. 4. Par ailleurs les représentations graphiques selon Dixon [33] sont

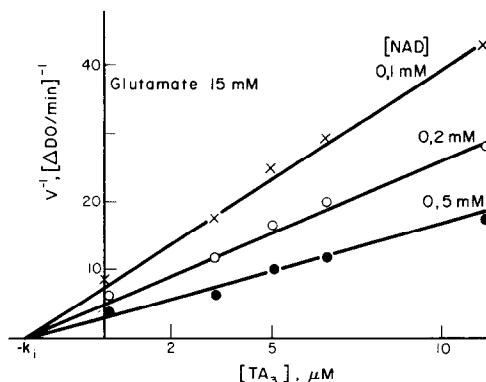


Fig. 5. Inhibition de l'activité de la GIDH hépatique de bœuf en fonction de doses croissantes de TA<sub>3</sub> en présence de diverses concentrations en NAD. Représentation de Dixon.

utilisées pour la détermination du  $K_i$ . La Fig. 5 en fournit un exemple. Le tableau IV rend compte de l'ensemble des résultats déduits des représentations précédentes.

#### DISCUSSION DES RESULTATS

##### (1) Effets de TF<sub>3</sub>, TA<sub>3</sub>, TP<sub>3</sub> et L-T<sub>3</sub> in vivo

La thyroïdectomie provoque des modifications dans les propriétés des enzymes hépatiques étudiées. Nous avons observé qu'elle se traduit au niveau du foie par une baisse de plus de 25% de l'activité de la glutamate deshydrogénase mitochondriale, ce qui est en accord avec les résultats de Clot, Baudry et Michel [8] mais s'oppose à ceux de Lee et Lardy [1] et par une très forte augmentation des activités NADP-isocitrate deshydrogénase mitochondriale et alcool deshydrogénase cytoplasmique, effets déjà signalés par Kadenbach [10] et Hillborn [7]. A l'opposé l'isocitrate deshydrogénase de la mitochondrie cardiaque n'est pas affectée de façon significative.

Tableau 4. Inhibitions provoquées par L-T<sub>3</sub> et ses analogues formique, acétique et propionique sur diverses deshydrogénases cristallisées et pures

Enzyme	Inhibiteur	$I_{50}$ (M)	Compétitivité et valeur du $K_i$ (M) par rapport au cosubstrat	Compétitivité par rapport au substrat
Glutamique deshydrogénase hépatique de bœuf NAD: $K_m = 3,0 \times 10^{-4}$ M	L-T <sub>3</sub>	$6,5 \times 10^{-6}$	NC*	NC
	TF <sub>3</sub>	$2,0 \times 10^{-6}$	NC	NC
	TA <sub>3</sub>	$9,1 \times 10^{-6}$	NC	NC
	TP <sub>3</sub>	$5 \times 10^{-6}$	C*	NC
Alcool deshydrogénase de levure NAD: $K_m = 2,5 \times 10^{-4}$ M	L-T <sub>3</sub>	$5,8 \times 10^{-5}$	C	NC
	TF <sub>3</sub>	$1,0 \times 10^{-4}$	C	NC
	TA <sub>3</sub>	$5,5 \times 10^{-5}$	C	I*
	TP <sub>3</sub>	$9,1 \times 10^{-5}$	C	NC
Alcool deshydrogénase hépatique de cheval NAD = $K_m = 1,1 \times 10^{-4}$ M	L-T <sub>3</sub>	$9,5 \times 10^{-5}$	C	NC
	TF <sub>3</sub>	$8,0 \times 10^{-4}$	C	NC
	TA <sub>3</sub>	$6,4 \times 10^{-4}$	C	NC
	TP <sub>3</sub>	$7,2 \times 10^{-4}$	C	NC
Isocitrate deshydrogénase cardiaque de porc NADP: $K_m = 1,1 \times 10^{-5}$ M	L-T <sub>3</sub>	$2,0 \times 10^{-4}$	NC	C
	TF <sub>3</sub>	$1,5 \times 10^{-4}$	NC	C
	TA <sub>3</sub>	$1,9 \times 10^{-4}$	NC	C
	TP <sub>3</sub>	$2,1 \times 10^{-4}$	C	C

\* C = compétitif; NC = non compétitif; I = intermédiaire.

Le traitement par L-T<sub>3</sub> compense tous les effets de la thyroïdectomie sur les enzymes hépatiques et son influence peut aller au delà d'une simple compensation puisque chez l'animal rendu hyperthyroïdien après traitement chronique par L-T<sub>3</sub>, les activités enzymatiques apparaissent augmentées pour la glutamate deshydrogénase et diminuée pour l'isocitrate et l'alcool deshydrogénases au niveau du foie. Il est intéressant d'observer que l'influence des analogues formique, acétique et propionique de la L-T<sub>3</sub> est qualitativement similaire à celle de l'hormone iodée, mais en général plus faible et surtout d'intensité très différente de l'un à l'autre. L'analogue acétique possède l'activité la plus proche de L-T<sub>3</sub> avec cependant une influence nettement moindre que celle de cette dernière sur l'alcool deshydrogénase hépatique. TF<sub>3</sub> est beaucoup moins actif: c'est ainsi qu'à la dose de 5 nmoles/100 g pendant 21 jours, ce produit s'est révélé inactif sur l'isocitrate deshydrogénase et l'alcool deshydrogénase hépatiques. A cet égard TP<sub>3</sub> occupe une position intermédiaire entre TA<sub>3</sub> et TF<sub>3</sub>. On peut en outre remarquer que si l'intensité des effets varie selon le protocole expérimental, les rapports d'activités des substances testées restent, quant à eux, inchangés.

## (2) Effets de TF<sub>3</sub>, TA<sub>3</sub>, TP<sub>3</sub> et L-T<sub>3</sub> in vitro

Les différences de structure chimique entre L-T<sub>3</sub> d'une part et TF<sub>3</sub>, TA<sub>3</sub>, TP<sub>3</sub> de l'autre se traduisent par des changements d'ordre qualitatifs et quantitatifs des effets inhibiteurs d'enzymes: tous les produits iodés se comportent comme des inhibiteurs vis-à-vis des enzymes pures étudiées et ceci permet de noter que la fonction amine, présente au niveau de la chaîne latérale des iodothyronines, n'est nullement indispensable à cet égard et que de surcroit, la longueur de la chaîne ne constitue pas un paramètre essentiel.

L'effet frénateur est cependant assez différent d'une enzyme à l'autre, et pour une même enzyme, les divers inhibiteurs iodés testés sont loin de provoquer la même réponse. C'est la glutamate deshydrogénase qui est la plus sensible à l'effet de L-T<sub>3</sub> et de ses analogues puisque des concentrations de l'ordre de 10<sup>-6</sup> M suffisent pour l'inhiber partiellement. Par contre, il faut des concentrations de 5 × 10<sup>-4</sup> M pour obtenir le même effet avec les deux autres deshydrogénases. En outre les caractères de compétitivité vis-à-vis du substrat ou du cosubstrat ne sont pas uniformes. Ainsi L-T<sub>3</sub> comme ses analogues sont compétitifs de NAD vis-à-vis de l'alcool deshydrogénase, mais ils sont, à l'exception de TP<sub>3</sub>, inhibiteurs non compétitifs de NAD et NADP respectivement vis-à-vis de la glutamate et de l'isocitrate deshydrogénase.

Par ailleurs, les effets de L-T<sub>3</sub> et de ses analogues de structure sur les activités enzymatiques des mitochondries lysées ne diffèrent pas très sensiblement de celles obtenues sur des enzymes pures. Les substances iodées se comportent ainsi comme des inhibiteurs enzymatiques dont l'effet n'est pas modifié par la présence des autres protéines solubilisées en présence de Triton X100, à partir de la mitochondrie.

On observe cependant que la courbe représentative de l'effet de L-T<sub>3</sub> vis-à-vis de GLDH des mitochondries hépatiques lysées est différente de celles des autres dérivés triiodés: il n'est pas impossible que dans les conditions particulières de la détermination, les con-

centrations en L-T<sub>3</sub> soient suffisantes pour amener une dissociation de l'enzyme en sous-unités selon le mécanisme envisagé par Wolf [34].

## (3) Comparison des effets de TF<sub>3</sub>, TA<sub>3</sub> et TP<sub>3</sub> in vivo et in vitro

Alors qu'*in vivo* L-T<sub>3</sub> et ses analogues TA<sub>3</sub>, TP<sub>3</sub> et TF<sub>3</sub> se classent dans un ordre uniforme d'activité décroissante vis-à-vis de toutes les enzymes essayées, il n'en est pas de même *in vitro*. On note dans ces conditions que l'activité de L-T<sub>3</sub> est plus intense que celles de TA<sub>3</sub> ou TF<sub>3</sub> sur l'ADH tandis qu'avec la GIDH de même qu'avec l'ICDH, c'est TF<sub>3</sub> l'inhibiteur le plus actif.

Ceci constitue un argument pour admettre que les activités inhibitrices d'enzymes mises en évidence *in vitro* ne sauraient être l'explication des effets constatés sur les enzymes hépatiques *in vivo*. Il s'y ajoute le fait que les doses employées *in vitro* sont très importantes et sans aucun rapport avec les taux physiologiques d'hormonémie ou même avec les doses pharmacologiques employées au cours des essais sur l'animal.

On observe ainsi que pour les analogues structuraux de L-T<sub>3</sub>, les essais effectués *in vitro* soit sur des enzymes pures, soit sur les activités enzymatiques des fractions subcellulaires, ne peuvent rendre compte de l'influence développée par ces mêmes substances sur les activités enzymatiques *in vivo*.

En résumé, l'étude des effets inhibiteurs de TF<sub>3</sub>, TA<sub>3</sub>, TP<sub>3</sub> et éventuellement d'autres analogues structuraux *in vitro* sur des enzymes pures ne permet pas d'expliquer le mécanisme d'action de ces substances chez l'animal entier ni *a fortiori* de présager de l'intérêt ou des effets secondaires de leur utilisation thérapeutique. Cependant ces recherches se révèlent opportunes pour préciser les relations entre l'activité et la structure chimique dans le domaine des inhibitions enzymatiques par les iodothyronines et leurs analogues.

## BIBLIOGRAPHIE

- Y. P. Lee and H. A. Lardy, *J. biol. Chem.* **240**, 1427 (1965).
- J. R. Tata, L. Ernster, O. Undberg, E. Arrhenius, S. Pedersen and R. Hedman, *Biochem. J.* **86**, 408 (1963).
- R. A. Freedland, *Endocrinology* **77**, 19 (1965).
- F. L. Hoch, *Physiol. Rev.* **42**, 630 (1962).
- M. Suzuki, K. Imai, A. Ito, T. Omura and R. Sato, *J. Biochem. (Tokyo)* **62**, 447 (1967).
- R. Pitt-Rivers, J. R. Tata, in *The Thyroid Hormones*, p. 101. Pergamon Press, Oxford (1959).
- M. E. Hillbom and P. H. Pikkarainen, *Biochem. Pharmacol.* **19**, 2097 (1970).
- J. P. Clot, M. Baudry and R. Michel, *Biochimie* **55**, 451 (1973).
- G. F. Maley, *Am. J. Physiol.* **188**, 35, (1957).
- B. Kadenbach, H. Goebell and M. Klingenberg, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **14**, 335 (1964).
- R. J. P. Williams, F. L. Hoch and B. L. Valle, *J. biol. Chem.* **232**, 465 (1958).
- K. Mc. Carthy, W. Lovenberg and A. Sjoerdjma, *J. biol. Chem.* **243**, 2754 (1968).
- M. J. Gilleland and J. D. Shore, *J. biol. Chem.* **24**, 5357 (1969).
- W. S. Caughey, J. D. Smiley and L. Hellerman, *J. biol. Chem.* **224**, 59 (1957).

15. J. Wolff and E. C. Wolff, *Biochem. biophys. Acta* **26**, 387 (1957).
16. B. L. Vallee and F. L. Hoch, *Ergeb. Physiol. biol. Chem. exp. Pharmak.* **51**, 52 (1961).
17. J. Roche, R. Michel, P. Jouan and W. Wolf *C. R. Soc. Biol.* **149**, 1219 (1955).
18. J. Roche, R. Michel, R. Truchot, W. Wolf and O. Michel, *Biochim. biophys. Acta* **20**, 337 (1956).
19. S. J. Adelstein and B. L. Vallee, *J. biol. Chem.* **233**, 589 (1958).
20. A. Younes, Y. Briand, J. Comte, R. Durand and D. Gautheron, *Biochimie* **55**, 833 (1973).
21. D. E. Drum and B. L. Vallee, *Biochemistry* **9**, 4078 (1970).
22. A. Akeson, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **17**, 211 (1964).
23. W. Cleland, W. Thompson, W. Virginian and R. E. Bardeu, in *Methods in Enzymology* (Eds. S. P. Kolowick and N. O. Kaplan), Vol. 13, p. 30. Academic Press, New York (1969).
24. H. Goebell and M. Klingenbergs, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **13**, 209 (1963).
25. D. S. Beattie, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **31**, 901 (1968).
26. J. B. Chappell and R. G. Hansford, in *Subcellular Components* (Ed. G. D. Birnie), p. 81. University Park Press Baltimore (1972).
27. M. Baudry, J. Bouhnik, O. Michel and R. Michel, *Biochimie* **54**, 219 (1972).
28. E. Layne, in *Methods in Enzymology* (Eds. S. P. Kolowick and N. O. Kaplan), Vol. 3, p. 450. Academic Press, New York (1957).
29. H. Beaulay, D. S. Bendall, P. Baudhun and C. de Duve, *Biochem. J.* **73**, 623 (1959).
30. S. Ochoa, in *The Enzymes* (Eds. Sumner and K. Myrback), Vol. II, p. 929. Academic Press, New York (1951).
31. F. Racker, *J. biol. Chem.* **184**, 313 (1950).
32. S. A. Bernhard, in *The Structure and Function of Enzymes* (Ed. W. A. Benjamin), p. 83 (1969).
33. M. Dixon, *Biochem. J.* **55**, 170 (1953).
34. J. Wolff, *J. biol. Chem.* **237**, 236 (1961).

**Résumé**—Les acides triiodo-3,5,3' thyroformique ( $TF_3$ ), triiodo-3,5,3' thyroacétique ( $TA_3$ ) et triiodothyropropionique ( $TP_3$ ), analogues structuraux de la triiodo-3,5,3' L-thyronine ( $LT_3$ ) sont capables, comme l'hormone iodée, lorsqu'ils sont administrés *in vivo*, de compenser la baisse de l'activité de la glutamate deshydrogénase mitochondriale (GIDH) et de réduire l'augmentation des activités isocitrate deshydrogénase mitochondriale (ICDH) et alcool deshydrogénase cytosolique (ADH), observées au niveau du foie de l'animal thyroïdectomisé. L'effet de  $TA_3$  est d'intensité proche de celui de  $LT_3$ , tandis que  $TP_3$  et  $TF_3$  se classent ensuite dans l'ordre d'efficacité décroissante.  $TF_3$ ,  $TA_3$  et  $TP_3$  sont dénués d'influence sur l'ICDH mitochondriale cardiaque dont l'activité apparaît indépendante de la thyroïdectomie. *In vitro*  $TF_3$ ,  $TA_3$  et  $TP_3$  inhibent les activités des enzymes GIDH, ICDH et ADH aussi bien au niveau de préparations obtenues à partir du fractionnement cellulaire du foie de rat, qu'en présence des enzymes pures. Toutefois, les effets sont plus intenses sur la GIDH que sur l'ADH ou l'ICDH. En outre, les inhibitions enzymatiques produites par les 3 dérivés iodés présentent des différences dans leurs caractères de compétitivité vis-à-vis du substrat et du cosubstrat des différentes réactions enzymatiques considérées.