

CARACTERES DE L'INHIBITION DE LA GLUTAMATE, DE L'ISOCITRATE ET DE L'ALCOOL DESHYDROGENASES PAR LES ANALOGUES FORMIQUE, ACETIQUE ET PROPRIONIQUE DE LA TRIIDO-3,5,3'-L- THYRONINE

HERVÉ GOUDONNET, BERNARD CHAILLOT, ROGER TRUCHOT et RAYMOND MICHEL

Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique, U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Dijon,
7 Bd. Jeanne d'Arc—21000 Dijon and 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—3,5,3'-Triiodo-thyroformic (TF₃), 3,5,3'-triiodo-thyroacetic (TA₃) and 3,5,3'-triiodo-thyropionic (TP₃) acids, which are structural analogs of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (LT₃), have been found to inhibit beef liver glutamate dehydrogenase (GIDH), horse liver alcohol dehydrogenase (ADH) and pig heart isocitrate dehydrogenase (ICDH), but different mechanisms are involved. TF₃, TA₃ and TP₃ inhibit GIDH non competitively with respect to NADP, but competitively with ADP-ribose, an activator of GIDH. For the inhibition of ADH, the three iodinated derivatives compete with NAD and ADP-ribose; ADP-ribose being itself competitive with NAD. So, it appears that TF₃, TA₃ and TP₃ interfere with the coenzyme binding by blocking the binding site of the ADP-ribose portion of the coenzyme. These iodinated inhibitors quench the enhanced fluorescence which originates from the enzyme-coenzyme binding. However, in the case of the GIDH, TP₃ exhibit an opposite effect. E.s.r. studies showed that ICDH inhibition by TA₃ did not result from the chelation of Mn²⁺, but that TA₃ impaired binding of Mn²⁺ to the enzyme and coenzyme.

La thyroxine et la triiodo 3,5,3'-L-thyronine inhibent *in vitro* un certain nombre d'enzymes tandis que leurs précurseurs la monoiodo 3-L-tyrosine et la diiodo 3,5-L-tyrosine n'ont à cet égard aucun effet [1-7]. Au cours de travaux antérieurs [8-10], nous avons montré que les acides triiodo-3,5,3' thyroformique (TF₃), triiodo-3,5,3' thyroacétique (TA₃) et triiodo-3,5,3' thyropropionique (TP₃) [11] avaient comme les hormones thyroïdiennes et spécialement la triiodo-3,5,3'-L-thyronine (L-T₃), la propriété d'inhiber certaines enzymes d'oxydoréduction à effecteur cationique telles que la glutamate deshydrogénase [8] (GIDH) (EC 1.4.1.3), l'isocitrate deshydrogénase (ICDH) (EC 1.1.1.42) et l'alcool deshydrogénase (ADH) [9,10] (EC 1.1.1.1). Cependant bien que ces deshydrogénases présentent des points communs, tant sur le plan de la structure de métalloenzyme que sur celui de l'activité enzymatique [12-14], l'inhibition produite par L-T₃ et ses dérivés se déroule selon des modalités différentes d'une enzyme à l'autre. L-T₃, TA₃ et TF₃ sont tous trois compétitifs de NAD au cours de l'inhibition de l'ADH, mais par contre non compétitifs vis-à-vis du NAD, cosubstrat de la GIDH et du NADP, cosubstrat de l'ICDH. TP₃ pour sa part entre dans les trois cas en compétition avec le cosubstrat.

Par ailleurs, les caractères de compétitivité par rapport aux substrats, diffèrent d'une enzyme à l'autre. TA₃ et L-T₃ sont compétitifs du substrat en ce qui concerne l'ICDH de coeur de porc, tandis qu'ils ne le sont ni pour la GIDH de foie de boeuf ni pour

l'ADH de foie de cheval. Ce caractère d'hétérogénéité suffit à exclure la possibilité d'un mécanisme commun d'inhibition.

Au demeurant il existe des différences entre les processus catalytiques des trois deshydrogénases considérées. GIDH, enzyme allostérique, comporte deux sites capables de réagir avec les coenzymes nicotiniques [15]: un "site actif" et un "site activateur ou inhibiteur". Un troisième site défini par Frieden [16] comme un "site catalytiquement inactif" permet la fixation des coenzymes réduits. NAD intervient au niveau des deux premiers sites, NADP uniquement au niveau du site actif. L'ADP et l'ADP-Ribose (ADP-R) jouent, à faibles concentrations, un rôle activateur et selon J. Wolff [7], la L-thyroxine agirait spécialement au niveau du site activateur de GIDH, entraînant des modifications de la structure quaternaire de la protéine enzymatique et son inhibition. Dans le cas de l'ADH, le coenzyme NAD est lié simultanément par sa structure nicotinamide et sa structure ADP-ribose [17]. Parmi les inhibiteurs de l'ADH, l'ADP-R compétitif de NAD [18] empêcherait la fixation de ce dernier par sa fraction adénylique sur la protéine enzymatique, tandis que L-T₃, qui d'après Mc. Carthy et Lovenberg [19] modifie le spectre de fluorescence caractéristique de la liaison ADH-NADH, s'oppose à la fixation du coenzyme par sa partie nicotinamide.

L'objet de notre travail a été de mettre en évidence l'influence de TF₃, TA₃ et TP₃ comparée à celle de L-T₃ sur la combinaison de la protéine enzymatique

et du cosubstrat au cours de la catalyse enzymatique de la GIDH de foie de boeuf, de l'ADH de foie de cheval et de levure et de l'ICDH de coeur de porc.

Nous avons successivement étudié l'effet de ces substances iodées, sur la fixation de NAD ou NADP au niveau de leur structure ADP-R, puis les modifications qu'elles apportent à la fluorescence des complexes 'enzyme-cosubstrat réduit'. Nous avons enfin mis à profit le spectre de résonance paramagnétique électronique (r.p.e.) de Mn^{2+} pour rechercher son éventuelle chélation par TA_3 , en présence d'ICDH, enzyme pour laquelle Mn^{2+} constitue un activateur, et de divers effecteurs de la réaction enzymatique.

METHODES EXPERIMENTALES ET RESULTATS

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, NADP et leurs formes réduites NADH, NADPH ainsi que ADP et ADP-Ribose sont des produits Boehringer.

La thréo-D-Isocitrate NADP oxydo-réductase cardiaque cristallisée de porc d'activité égale à 2 Unités \times mg^{-1} de protéine et l'éthanol NAD oxydo-réductase hépatique cristallisée de cheval titrant 50 Unités \times mg^{-1} de protéine sont des préparations Boehringer.

L'alcool deshydrogénase lyophilisée de levure (200 Unités \times mg^{-1}) est une enzyme Koch-Light. La L-glutamate deshydrogénase hépatique cristallisée de boeuf (3 à 5 Unités \times mg^{-1} de protéine) est fournie par Sigma.

Caractères de compétitivité des inhibitions enzymatiques

(1) *Alcool deshydrogénase*. Les essais d'activités [20] sont réalisés à 25° dans un tampon pyrophosphate de Na: 0,1 M de pH = 8,5 contenant 2% (p/v) de chlorhydrate de semi-carbazide, C_2H_5OH : 17 mM, NAD: 0,2 mM et l'alcool deshydrogénase à raison de 6,6 μg protéine enzymatique \times ml^{-1} . L'ADP-ribose à concentration croissante (100 à 400 μM) et chacun des inhibiteurs iodés à concentration constante pour une série d'essais, sont ajoutés immédiatement avant l'enzyme. Chaque essai est ensuite répété en modifiant la concentration du produit iodé. L'activité enzymatique est mesurée en suivant la réduction du NAD à 340 nm, grâce à un spectrophotomètre Beckman DBG muni d'un enregistreur.

L'ADP-ribose se comporte comme un inhibiteur compétitif de NAD vis-à-vis de l'ADH de foie de cheval [18]. Il en est de même pour $L-T_3$ et ses analogues TF_3 , TA_3 et TP_3 (Fig. 1). Nous avons donc été amenés à traiter les résultats obtenus selon la méthode graphique de Yonetani-Theorell [21] qui permet l'étude des interactions entre effecteurs enzymatiques du même type. Un exemple en est donné par la Fig. 2. La représentation de $v^{-1} = f$ (ADP-ribose) pour les différents couples d'inhibiteurs ADP-R- LT_3 , ADP-R- TF_3 , ADP-R- TA_3 et ADP-R- TP_3 conduit à des droites parallèles pour les concentrations différentes d'inhibiteur iodé. Ceci

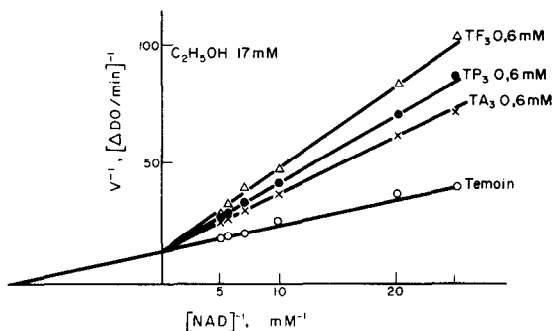


Fig. 1. Inhibition de l'alcool deshydrogénase (ADH) de foie de Cheval par TF_3 , TA_3 et TP_3 pour des concentrations variables de NAD. Représentation en double inverse due à Lineweaver-Burk.

traduit un 'coefficient d'interaction' de valeur $\alpha = \infty$ qui permet de conclure à une compétition entre l'ADP-ribose et les analogues de $L-T_3$ au cours de l'inhibition enzymatique.

(2) *Glutamate deshydrogénase*. L'activité enzymatique de la GIDH [22] est déterminée en suivant la réduction du coenzyme à 340 nm. Les essais sont réalisés à 25° dans un milieu tampon phosphate de potassium 0,2 M de pH = 7,6 contenant L-glutamate de K: 66 mM, NAD ou NADP: 0,4 mM et 2,4 μg de protéine enzymatique \times ml^{-1} pour un volume de 2,5 ml. Dans ces conditions, l'activité enzymatique traduite graphiquement en double inverse s'inscrit dans le cadre d'une cinétique michaelienne (Fig. 3a). Les interactions entre inhibiteurs $L-T_3$, TF_3 , TA_3 et TP_3 d'une part et l'ADP-ribose activateur de la GIDH d'autre part sont établies en déterminant l'activité enzymatique pour des concentrations croissantes d'ADP-ribose (10 μM à 100 μM) en présence de NAD ou NADP (400 μM) et d'inhibiteur (20 μM) à concentration constante.

Les résultats expérimentaux traduits graphiquement selon Lineweaver-Burk permettent de conclure à une interaction compétitive entre ADP-Ribose et tous les composés testés en présence de NAD ou de NADP (Fig. 3 b-d).

(3) *Isocitrate deshydrogénase*. L'activité de l'ICDH de coeur de porc [23] est déterminée en suivant à

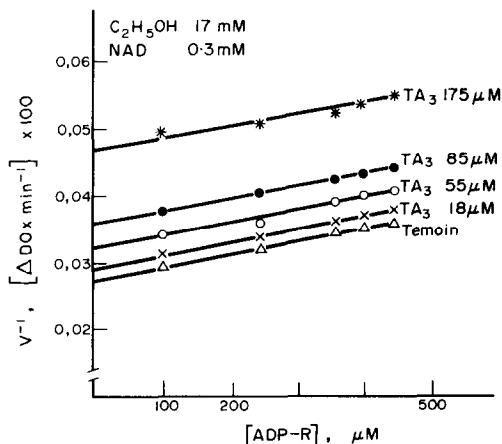


Fig. 2. Inhibition multiple de l'ADH par ADP-ribose et TA_3 à pH = 8,5. Représentation de Yonetani-Theorell.

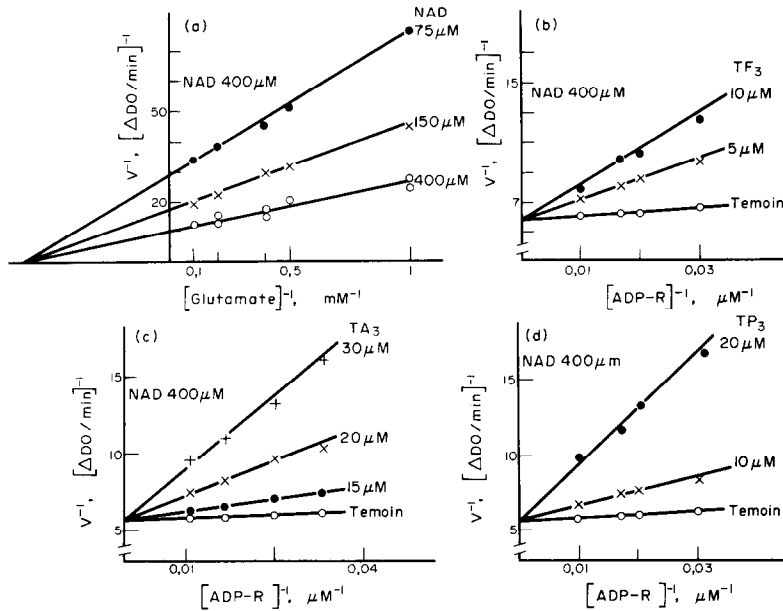


Fig. 3. Représentation en double inverse de la vitesse de la réaction enzymatique catalysée par la glutamate deshydrogénase de foie de boeuf (GLDH) pour différentes concentrations de glutamate de potassium (a). Inhibition de la glutamate deshydrogénase de foie de boeuf par TF_3 (b), TA_3 (c) et TP_3 (d) en présence de concentrations croissantes d'ADP-ribose.

340 nm la réduction de NADP (0,42 mM) en présence d'isocitrate de sodium: 1 mM, de MnCl_2 : 0,58 mM, d'ADP-Ribose à concentrations croissantes: 40 μM à 400 μM et d'inhibiteur iodé à concentration constante: 80 μM dans un tampon phosphate de K: 0,2 M de pH = 7,6. La concentration de la protéine enzymatique est de 40 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$. La présence d'une forte concentration de l'activateur cationique tend à éliminer les effets allostériques et conduit à une cinétique de type Michaelien (Fig. 4).

Parmi les dérivés iodés que nous avons essayés, TP_3 est le seul qui inhibe l'ICDH sur le mode compétitif par rapport à NADP comme le fait l'ADP-ribose. La méthode graphique de Yonetani-Theorell [21] ne s'applique donc en toute rigueur qu'au couple d'inhibiteur ADP-R- TP_3 . La représentation graphique $v^{-1} = f(\text{ADP-ribose})$ montre que la présence d'ADP-ribose favorise l'effet inhibiteur de TP_3 (Fig. 5). Cependant des courbes similaires sont obtenues

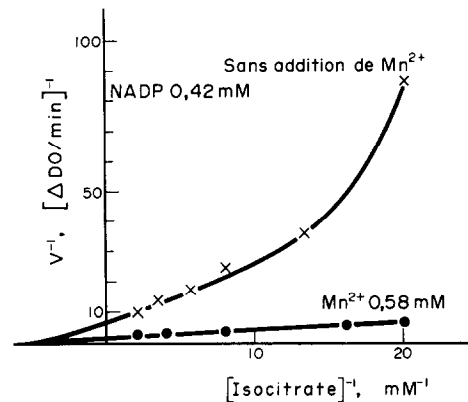


Fig. 4. Représentation en double inverse de la vitesse de décarboxylation oxydative de l'acide D-isocitrique par l'isocitrate deshydrogénase de coeur de porc (ICDH) en présence et en l'absence d'ions Mn^{2+} .

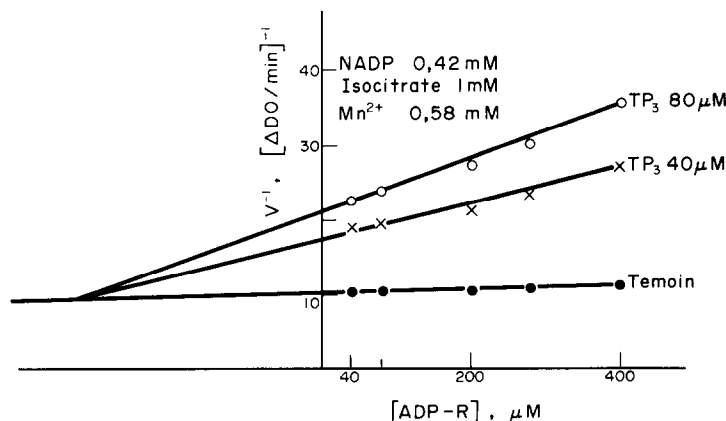


Fig. 5. Inhibition multiple de l'isocitrate deshydrogénase de coeur de porc par ADP-Ribose et TP_3 à pH = 7,6. Représentation de Yonetani-Theorell.

Tableau 1. Caractères de compétitivité de L-T₃, TF₃, TA₃ et TP₃ vis-à-vis des coenzymes NAD ou NADP et de l'ADP-ribose au cours de l'inhibition de la GIDH, ADH et ICDH

Inhibiteur	Glutamate deshydrogénase de foie de boeuf (GIDH)				Alcool deshydrogénase de foie de cheval (ADH)		Isocitrate deshydrogénase de coeur de porc (ICDH)	
	Compétitivité par rapport à				Compétitivité par rapport à		Compétitivité par rapport à	
	NAD	NADP	ADP-R en présence de NAD	ADP-R en présence de NADP	NAD	ADP-R en présence de NAD	NADP	ADP-R en présence de NADP
L-T ₃	NC	intermédiaire	C	intermédiaire	C	C	NC	
TF ₃	NC	NC	C	C	C	C	NC	
TA ₃	NC	NC	C	C	C	C	NC	
TP ₃	C	NC	C	C	C	C	C	NC

C: Inhibiteur compétitif.

NC: Inhibiteur non compétitif.

au cours des essais effectués avec L-T₃, TF₃ et TA₃ en présence de concentrations croissantes d'ADP-ribose; leur interprétation est toutefois plus difficile puisque ces dérivés triodés, contrairement à TP₃, ne sont pas compétitifs de NADP.

Le Tableau 1 résume les caractères de compétitivité observés au cours de l'ensemble de nos essais d'inhibition enzymatique.

Fluorescence des complexes 'enzyme-NADH'

Les études de fluorescence sont effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre Jobin et Yvon à double monochromateur modèle 'Bearn'. L'excitation de fluorescence est obtenue à 328 nm, et la fluorescence émise est analysée entre 300 et 600 nm grâce à un enregistreur automatique [24]. On enregistre tout d'abord les spectres de fluorescence de NADH:16 µM et NADPH:8 µM en tampon phosphate de potassium 0,2 M de pH = 7,4. Dans un second temps, les mêmes déterminations sont effectuées en présence de protéine enzymatique et dans un troisième temps en présence à la fois de protéine enzymatique et de l'inhibiteur iodé ajouté à différentes concentrations. Nous avons par ailleurs vérifié que L-T₃ et ses analogues ne présentaient à 328 nm, aux concentrations utilisées, qu'une absorption optique très faible et aucune émission de fluorescence.

(1) *Alcool deshydrogénase*. Dans les conditions expérimentales précédentes, le spectre d'émission du nucléotide NADH (16 µM) présente un maximum à 462 nm. En présence de l'alcool deshydrogénase (150 µg × ml⁻¹), l'émission maximale est d'une part déplacée (440 nm) et d'autre part considérablement augmentée en intensité (64%); ces résultats recoupent ceux de McCarthy et Lovenberg [19]. On sait à ce sujet que le coenzyme pyridinique se lie d'une part par sa structure ADP-ribose et d'autre part par sa partie nicotinamide. Seule cette dernière interaction est responsable de l'exaltation de la fluorescence de NADH après sa combinaison avec l'enzyme [25].

Nous avons observé que L-T₃ et ses analogues structuraux n'ont aucun effet sur le spectre d'émission de NADH lorsque celui-ci est à l'état libre; par contre ces substances iodées modifient le spectre de fluorescence lorsque le milieu renferme simultanément alcool deshydrogénase et le NAD réduit: l'exaltation de la fluorescence due à la formation du complexe binaire enzyme-NADH est très nettement inhibée.

Pour des concentrations supérieures à 80 µM, L-T₃ et ses analogues produisent un effacement total de l'effet de liaison enzyme-coenzyme et le spectre de fluorescence du milieu 'enzyme-coenzyme réduit-inhibiteur' est alors comparable à celui du coenzyme à l'état libre. A concentrations inférieures l'effet reste incomplet et l'on note que L-T₃ possède un effet un peu plus marqué que ceux des ses analogues ainsi qu'il ressort des données rassemblées dans le Tableau 2.

(2) *Glutamate deshydrogénase*. En présence de GIDH (320 µg × ml⁻¹) l'exaltation de la fluorescence de NADH par effet de liaison enzyme-coenzyme est moindre qu'avec l'alcool deshydrogénase. L'addition de L-T₃, TA₃ et TF₃ (40 µM) diminue l'intensité de fluorescence du complexe enzyme-coenzyme mais dans des proportions qui sont sensiblement moindre que dans l'essai précédent (Tableau 2). Cependant, fait inattendu, TP₃ dont la parenté chimique avec les autres inhibiteurs iodés testés est très étroite, provoque à l'opposé, une exaltation de la fluorescence du complexe enzyme-coenzyme, alors qu'il ne modifie pas le spectre de fluorescence du coenzyme seul et ne provoque pas d'émission de fluorescence en présence uniquement de l'enzyme.

Les courbes de la Fig. 6 mettent en parallèle l'effet de TP₃ et de L-T₃ sur les spectres de fluorescence

Tableau 2. Effet de L-T₃, TF₃, TA₃, TP₃ sur la fluorescence de NADH en présence de ADH, GIDH, ICDH. L'influence des inhibiteurs iodés s'exprime par le pourcentage de disparition de l'exaltation de fluorescence produite au cours de la liaison enzyme-coenzyme

Nature de l'inhibiteur	Concn (µM)	Effacement de l'effet de liaison enzyme-NADH ("a)		
		avec ADH	avec GIDH	avec ICDH
L-T ₃	40	80 ± 3 (5)*	48 ± 3 (5)	26 ± 4 (5)
	80	95 ± 3 (5)	76 ± 3 (5)	48 ± 4 (5)
TF ₃	40	68 ± 4 (5)	30 ± 4 (5)	19 ± 3 (5)
	80	85 ± 3 (5)	52 ± 4 (5)	33 ± 3 (5)
TA ₃	40	72 ± 3 (5)	25 ± 3 (5)	24 ± 3 (5)
	80	88 ± 3 (5)	43 ± 4 (5)	45 ± 3 (5)
TP ₃	40	70 ± 4 (5)	Augmentation de la fluorescence	20 ± 3 (5)
	80	96 ± 3 (5)	Augmentation de la fluorescence	37 ± 3 (5)

* Le chiffre entre parenthèse représente le nombre d'expériences réalisées.

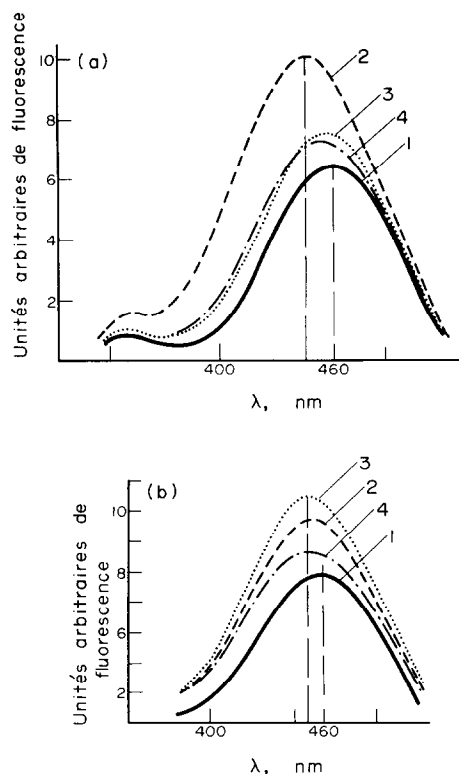


Fig. 6. Influence de TP_3 et $L-T_3$ sur la fluorescence de NADH en présence d'ADH (a) et de GIDH (b). Excitation de fluorescence: 328 nm. (a) 1—NADH 16 μM ; 2—NADH 16 μM , ADH 150 $\mu g \times ml^{-1}$; 3—NADH 16 μM , ADH 150 $\mu g \times ml^{-1}$, TP_3 40 μM ; 4—NADH 16 μM , ADH 150 $\mu g \times ml^{-1}$, $L-T_3$ 40 μM . (b) 1—NADH 16 μM ; 2—NADH 16 μM , GIDH 300 $\mu g \times ml^{-1}$; 3—NADH 16 μM , GIDH 300 $\mu g \times ml^{-1}$, TP_3 40 μM ; 4—NADH 16 μM , GIDH 300 $\mu g \times ml^{-1}$, $L-T_3$ 40 μM .

de NADH obtenus en présence d'ADH d'une part et de GIDH d'autre part.

(3) *Isocitrate deshydrogénase*. Avec l'isocitrate deshydrogénase (150 $\mu g \times ml^{-1}$), la liaison enzyme-NADH conduit également à une augmentation en intensité de la fluorescence du coenzyme (20%) avec un déplacement du maximum d'émission. Cet effet est partiellement contrebalancé par l'addition au milieu de $L-T_3$. L'iodothyronine est à cet égard plus active que ses analogues mais son influence comme celle des autres produits demeurent nettement moins marquée qu'en présence d'ADH, ainsi que le montre les valeurs rassemblées sur le Tableau 2.

Rôle des ions Mn^{2+} lors de l'inhibition de l'ICDH par l'acide TA_3

(1) *Spectre de résonance paramagnétique électronique du manganèse*. La méthode de résonance paramagnétique électronique (r.p.e.) est applicable à l'étude du cation Mn^{2+} , lequel possède lorsqu'il est à l'état libre, 5 électrons périphériques non appariés, dont les transitions produisent un spectre RPE de 6 raies [26, 27]. Cependant, lorsque l'ion Mn^{2+} est complexé, il n'est plus détecté en RPE et la diminution de l'amplitude du signal permet d'évaluer la proportion du cation disparu [28–30]. Nous avons pu ainsi rechercher la formation de complexes du manganèse, dans un

milieu biologique contenant, outre le cation Mn^{2+} , les différents constituants de la réaction enzymatique de transformation de l'acide isocitrique en acide α -cétooglutarate, en présence ou en l'absence de TA_3 .

Diverses solutions en tampon Tris 0,75 M de pH 7,4 ont été analysées, renfermant outre Mn^{2+} , soit NADP à une concentration de 1 mM, soit ICDH (700 μg protéine enzymatique $\times ml^{-1}$) soit l'acide TA_3 à une concentration de 1 mM ou 1,5 mM, ou bien encore plusieurs de ces constituants simultanément.

Pour la détermination du spectre r.p.e., nous avons utilisé un appareillage Varian. L'échantillon à analyser est transféré dans une cellule en quartz de 0,3 ml, conçue pour occuper tout le volume utile de la cavité rectangulaire (mode 1,1,0). La cavité est elle-même déposée dans l'entrefer d'un électroaimant Varian de 9 pouces, couplé à un spectromètre 'Microspin' type ESR 3, bande X. L'appareillage est placé dans une atmosphère à 23°. Le spectre est enregistré une minute après l'addition de l'enzyme. Nous avons choisi de balayer en champ sur une largeur de ± 125 gauss pendant 1 min autour de la valeur H_0 correspondant à $g = 2,00$. De plus, à ce signal, nous avons appliqué une modulation 100 kc crête à crête. De ce fait, toutes les mesures sont effectuées sur une même raie du spectre de Mn^{2+} . On détermine les variations d'amplitude que subit cette raie en fonction des substances présentes dans le milieu et ces variations s'expriment en % de l'amplitude constatée en solution pure.

Nous avons répétés au minimum 5 fois chacun des essais. Les résultats reproduits dans le Tableau 3 représentent les valeurs moyennes calculées à partir de 5 résultats. Les courbes de la Fig. 7 donnée à titre d'exemple, illustrent les effets de TA_3 sur le spectre RPE de l'ion Mn^{2+} , quand ce cation est présent dans un milieu tamponné comprenant les différents constituants biochimiques de la réaction enzymatique.

(2) *Addition d'ion Mn^{2+}* . L'inhibition de l'ICDH par TA_3 est étudiée dans les conditions expérimentales décrites plus haut mais en faisant varier la concentration du milieu en $MnCl_2$ tandis que les quantités d'enzyme et de coenzyme restent fixes.

Les courbes de la Fig. 8 représentent l'inhibition enzymatique observée avec TA_3 10^{-4} M et 2×10^{-4} M en fonction de la concentration en manganèse. On doit noter parallèlement que l'activité

Tableau 3. Amplitude du signal de résonance paramagnétique électronique de Mn^{2+} (0,27 mM) en présence de ICDH, de NADP et TA_3

Expérience no.	Isocitrate deshydrogénase (μg protéine $\times ml^{-1}$)	NADP (mM)	TA_3 (mM)	Variations d'amplitude exprimées en p. 100 de l'amplitude de référence du cation seul
Témoin	—	—	—	—
1	—	—	1	7
2	—	—	1,5	9
3	380	—	—	0
4	700	—	—	10
5	700	—	1	29
6	700	—	1,5	35
7	—	1	—	32
8	700	1	—	41
9	—	1	1,5	45
10	700	1	1,5	60

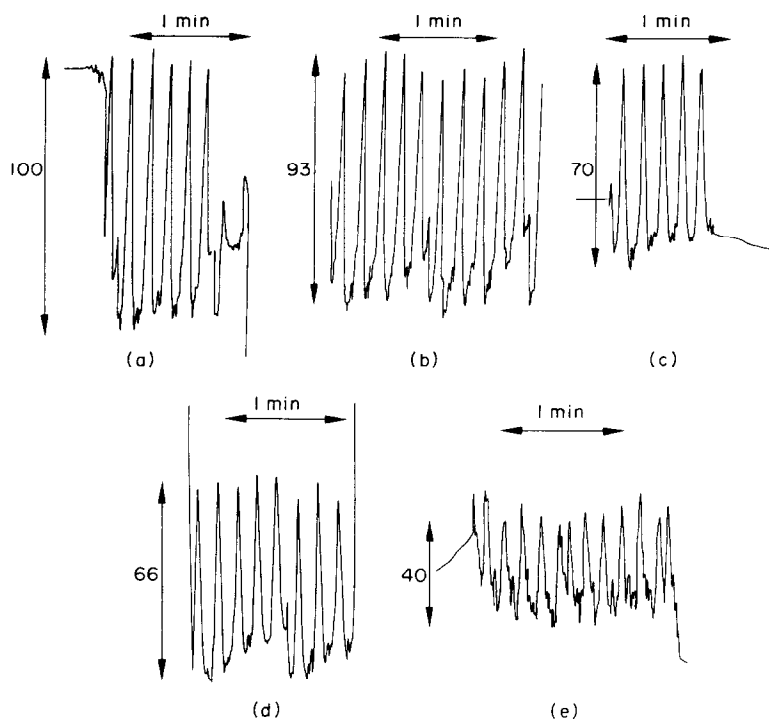


Fig. 7. Spectres RPE de Mn^{2+} . Comparaison de l'amplitude du signal. La valeur 100 correspond au signal de l'ion Mn^{2+} en solution pure. (a) Témoin Mn^{2+} 0,27 mM; (b) Mn^{2+} 0,27 mM, TA_3 1,5 mM; (c) Mn^{2+} 0,27 mM, NADP 1 mM; (d) Mn^{2+} 0,27 mM, TA_3 1,5 mM, ICDH 700 μg protéine $\times ml^{-1}$; (e) Mn^{2+} 0,27 mM, NADP 1 mM, ICDH 700 μg protéine $\times ml^{-1}$, TA_3 1,5 mM.

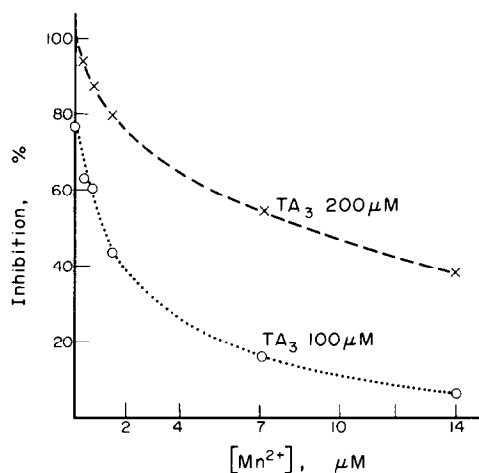


Fig. 8. Effets de l'addition des ions Mn^{2+} sur l'inhibition de l'isocitrate deshydrogénase de coeur de porc par l'acide triiodo-3,5,3'-thyroacétique (TA_3).

ICDH augmente pour des concentrations croissantes en ion Mn^{2+} . L'activité enzymatique en fonction de la quantité du sel de manganèse s'exprime selon une hyperbole restangulaire; elle n'est maximale que pour des concentrations en Mn^{2+} supérieures à $1,2 \times 10^{-5}$ M.

DISCUSSION DES RESULTATS ET CONCLUSIONS

Plusieurs faits ressortent des résultats obtenus au cours de l'expérimentation.

(1) Les essais réalisés en présence d'ADP-ribose confirment que la triiodo-3,5,3' L-thyronine et ses analogues exercent leur influence inhibitrice très différemment d'une enzyme à l'autre.

Pour ce qui concerne GIDH, le caractère compétitif à l'égard de l'ADP-ribose, lequel se fixe au site activateur, confronté au mode non compétitif vis-à-vis de NADP laisse à penser que les dérivés iodés n'interviennent pas au site catalytique mais plutôt au site activateur de cette enzyme oligomérique.

Dans le cas de l'ADH, l'hormone iodée et ses dérivés formique, acétique, propionique entrent également en compétition avec l'ADP-ribose mais comme le nucléotide, ils sont compétitifs de NAD. Il apparaît ainsi que l'iodothyronine et ses analogues influencent la protéine enzymatique au niveau du site de fixation de la structure ADP-ribose du cosubstrat.

L'interaction que l'ADP-ribose présente avec l'isocitrate deshydrogénase de coeur de Porc est moins bien connue que celle avec la L-glutamate deshydrogénase; néanmoins l'influence favorisante de l'ADP-ribose sur l'inhibition créée par des substances iodées dont l'une (TP_3) est compétitive de NADP et les autres non, semble indiquer que les inhibiteurs iodés n'interviennent pas uniquement au site de fixation de NADP. Du reste, le caractère de compétitivité de ces dérivés halogénés avec le substrat au cours de l'activité de l'ICDH ne serait pas en faveur de cette exclusivité.

(2) La triiodo-3,5,3' L-thyronine et ses analogues formique et acétique modifient le spectre de fluorescence des complexes 'enzyme-NADH', et tendent à le ramener à celui du coenzyme non lié: on en déduit que ces substances agissent sur l'enzyme en empêchant

la liaison entre la protéine enzymatique et le coenzyme réduit, interprétation du reste adoptée par McCarthy et Lovenberg [19] pour ce qui concerne l'influence de l'hormone iodée et de son dérivé acétique sur l'alcool deshydrogénase de foie. Toutefois, les résultats obtenus avec le dérivé propionique conduisent à préciser cette conception. En effet, le comportement de ce dérivé est très différent de celui des autres analogues structuraux puisqu'il varie suivant la nature de la protéine enzymatique présente: exaltation de la fluorescence du complexe "enzyme-coenzyme réduit" en présence de GIDH mais diminution de la fluorescence en présence d'ICDH ou d'ADH. Ceci est d'autant plus remarquable que ces divers produits iodés, dont l'analogie de structure est très grande, présentent des effets inhibiteurs assez voisins sur chacune des enzymes étudiées. De surcroît, on constate un parallélisme entre l'intensité de l'inhibition enzymatique et l'effet sur la fluorescence du cosubstrat réduit dans le cas de l'ADH mais non pas dans le cas de GIDH ou de l'ICDH.

On peut donc penser que l'inhibition de l'ADH d'une part et de GIDH et ICDH de l'autre, s'effectue selon des modalités différentes. Au cours de l'inhibition de l'ADH, tous les composés testés entrent en compétition avec le coenzyme et l'on observe un effet spécialement intense de ces substances sur la fluorescence de NADH en présence de la protéine enzymatique; ce qui traduit un effet de 'déplacement' très marqué vis-à-vis de la combinaison enzyme-coenzyme, effet qui peut expliquer l'inhibition. En présence d'ICDH ou de GIDH, le même type d'interférence se produit, mais il est moins important et ne jouerait pas un rôle déterminant dans l'inhibition enzymatique au cours de laquelle l'hormone iodée et ses analogues ne sont pas compétitifs du coenzyme. L'inhibition de la GIDH par l'acide triiodo-3,5,3' thyropropionique constitue à cet égard une exception, puisque dans ce cas l'inhibiteur et le coenzyme sont compétitifs, et le fait qu'au surplus l'effet de liaison enzyme-coenzyme se trouve exalté par le dérivé propionique, permet d'émettre l'hypothèse de la formation d'un complexe ternaire GIDH-NADH-TP₃ dont la stabilité pourrait bloquer l'activité de l'enzyme.

(3) En solution pure l'acide triiodo-3,5,3' thyroacétique ne provoque aucune modification d'amplitude des raies caractéristiques du spectre RPE de l'ion Mn²⁺. L'addition d'ICDH à une solution MnCl₂ provoque une très faible diminution de l'intensité du signal tandis qu'une baisse plus importante se manifeste lorsque le cation est mis en présence de NADP. Il apparaît ainsi que Mn²⁺ se lie faiblement à la protéine enzymatique et un peu plus nettement au coenzyme alors que l'inhibiteur iodé n'intervient pas directement. Cependant la présence du produit iodé, si elle n'influe pas sur la liaison Mn²⁺-NADP, accentue sensiblement l'effet de liaison du cation activateur à l'enzyme. La diminution relative de l'amplitude du signal RPE est spécialement forte lorsqu'il est ajouté dans le milieu renfermant simultanément l'enzyme et NADP en plus de Mn²⁺ (Fig. 7). On relève parallèlement qu'en présence de concentrations croissantes de sel de manganèse ajouté au milieu d'incubation, l'in-

fluence inhibitrice du dérivé acétique est progressivement diminuée (Fig. 8).

L'ensemble de ces données suggèrent que l'acide triiodo-3,5,3' thyroacétique ne se combine pas directement avec Mn²⁺, activateur de l'enzyme, mais réagit plutôt en modifiant la liaison entre la protéine enzymatique, son effecteur métallique et son coenzyme, ce qui du reste s'accorde avec les modalités de l'inhibition de l'ICDH par ce même produit iodé.

BIBLIOGRAPHIE

1. J. Wolff et E. C. Wolff, *Biochim. biophys. Acta*, **26**, 387 (1957).
2. J. Wolff, *J. biol. Chem.* **237**, 230 (1962).
3. J. Wolff, *J. biol. Chem.* **237**, 236 (1962).
4. H. A. Lardy, *Brookhaven Symposia in Biol.* **7**, 90 (1955).
5. F. L. Hoch, *Physiol. Rev.* **42**, 630 (1962).
6. V. Wartburg, J. P. Bethune et B. L. Vallee, *Biochemistry* **3**, 1775 (1964).
7. E. C. Wolff et E. G. Ball, *J. biol. Chem.* **224**, 1083 (1957).
8. H. Goudonnet, *C.R. Soc. Biol.* **163**, 56 (1969).
9. H. Goudonnet et R. Truchot, *C.R. Soc. Biol.* **164**, 1970 (1970).
10. R. Truchot, H. Goudonnet et R. Michel, *C.R. Soc. Biol.* **167**, 662 (1973).
11. R. Michel, J. Klepping, H. Tron-Loisel et R. Truchot, *C.R. Acad. Sci., Paris* **251**, 3094 (1960).
12. K. Frieden, in *The Enzymes* (Eds. P. D. Boyer, H. Lardy et K. Myrbäck), p. 3. Academic Press, New York (1963).
13. H. Sund et H. Theorell, in *The Enzymes* (Eds. P. D. Boyer, H. Lardy et K. Myrbäck), p. 25. Academic Press, New York (1963).
14. G. W. E. Plaut, in *The Enzymes* (Eds. P. D. Boyer, H. Lardy et K. Myrbäck), p. 105. Academic Press, New York (1963).
15. C. Frieden, *J. biol. Chem.* **234**, 809 (1959).
16. C. Frieden, *Biochim. biophys. Acta* **42**, 428 (1961).
17. H. Theorell, A. Ehrenberg et C. Dezaletski, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **27**, 309 (1967).
18. M. J. Gilleland et J. D. Shore, *J. biol. Chem.* **244**, 5357 (1969).
19. K. Mc. Carthy et W. Lovenberg, *J. biol. Chem.* **244**, 3760 (1969).
20. F. Racker, *J. biol. Chem.* **184**, 313 (1950).
21. T. Yonetani et H. Theorell, *Archs. Biochem. Biophys.* **106**, 243 (1964).
22. E. Bernt et H. U. Bergmeyer, in *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. M. U. Bergmeyer), p. 384. Academic Press, New York (1955).
23. S. Ochoa, in *The Enzymes* (Eds. Sumner et K. Myrbäck), p. 929. Academic Press, New York (1951).
24. H. Theorell et J. S. Mc. Kinley, Mc Kee, *Acta. Chem. Scand.* **15**, 1797 (1961).
25. R. F. Steiner, J. Roth et J. Robbins, *J. biol. Chem.* **241**, 560 (1966).
26. G. H. Reed et M. Cohn, *J. biol. Chem.* **245**, 662 (1970).
27. A. S. Mildvan et M. C. Scrutton, *Biochemistry* **6**, 2978 (1967).
28. A. S. Mildvan, T. S. Leigh et M. Cohn, *Biochemistry* **6**, 1805 (1967).
29. M. Cohn, in *Magnetic Resonance in Biological Systems* (Eds. A. Ehrenberg, B. G. Malmström et T. Vanngard), p. 101. Pergamon Press, New York (1967).
30. D. J. E. Ingram, in *Biological and Biochemical Application of Electron Spin Resonance* (Ed. A. Hilger), p. 19. London (1969).

Résumé—Les acides triiodo-3,5,3' thyroformique (TF₃), triiodo-3,5,3' thyroacétique (TA₃) et triiodo-3,5,3' thyropropionique (TP₃) analogues structuraux de la triiodo-3,5,3' L-thyronine (L-T₃), inhibent la glutamate deshydrogénase de foie de boeuf (GIDH), l'alcool deshydrogénase de foie de cheval et de levure (ADH) et l'isocitrate deshydrogénase de coeur de porc (ICDH), enzymes à effecteurs cationiques, selon des modalités différentes. En présence de GIDH, les trois dérivés iodés se révèlent compétitifs de l'ADP-ribose, activateur de l'enzyme, mais non compétitifs du cosubstrat NADP. Avec l'ADH, ils sont compétitifs d'une part du coenzyme NAD et d'autre part de l'ADP-ribose, lequel est lui-même compétitif de NAD. Ceci témoigne d'une modification de la fixation du coenzyme par l'intermédiaire de sa structure adénylique à la protéine enzymatique. L'exaltation de la fluorescence de NADH observée en présence d'ADH et GIDH, ou de NADPH en présence d'ICDH, résultant de la liaison du cosubstrat à l'enzyme par sa fraction nicotinamide, tend à disparaître après addition de TF₃, TA₃ ou TP₃. L'influence de TP₃ sur le complexe GIDH-NADH constitue une exception puisque la fluorescence est dans ce cas augmentée en présence du dérivé iodé. L'étude du spectre RPE de Mn²⁺ en présence d'ICDH et de divers effecteurs de la réaction enzymatique montre que TA₃ ne chélate pas l'ion Mn²⁺ en solution pure, mais modifie la liaison de celui-ci à la protéine enzymatique en présence de NADP.