

Corrélations entre les effets des hormones thyroïdiennes sur les mitochondries hépatiques, leur fixation et leur métabolisme

Les hormones thyroïdiennes provoquent un gonflement rapide des suspensions mitochondriales, alors que l'addition d'ATP inverse ce phénomène¹. Nous nous sommes demandé, d'une part, si l'ATP chassait les iodothyronines des mitochondries qui les avaient antérieurement fixées, en sorte que le départ d'eau pourrait être rapporté à leur fuite, et, d'autre part, si les transformations morphologiques subies par les particules allaient de pair avec des modifications métaboliques des hormones.

Les mitochondries ont été préparées selon la méthode de SCHNEIDER² modifiée. Les rats ♂ (150–180 g) sont sacrifiés par décapitation rapide, les foies de 2 animaux (15 g environ) sont immédiatement prélevés, dilacérés et lavés à plusieurs reprises avec du saccharose 0.25 *M*. On procède ensuite à l'homogénéisation au moyen d'un appareil de Potter à piston lache en Teflon, fixé à un moteur tournant à 700 rev./min. Le tissu hépatique est traité par portions successives d'environ 3 g, la durée de chaque opération n'excédant pas 15 sec. Les homogénats une fois réunis, on complète à 120 ml avec du saccharose 0.25 *M*. On centrifuge à $800 \times g$ pendant 10 min; le surnageant séparé est ensuite centrifugé à $21000 \times g$ maximum pendant 12 min. Le surnageant est séparé en conservant 1 cm de liquide au-dessus du culot et en éliminant les lipides avec précaution. Le culot est remis en suspension dans 90 ml de saccharose 0.25 *M* et soumis à une centrifugation analogue à la précédente et l'on opère ensuite un autre lavage. Les mitochondries sont mises en suspension au moyen de saccharose 0.25 *M* jusqu'à un volume de 15 ml. Toutes les manipulations sont conduites à une température inférieure à 2°.

T_3 marquée en 3' par ^{131}I et T_4 marquée en 3',5' (activité spécifique minima, 20 $\mu C/\mu g$) ont été préparées soit par la même technique³, soit, pour certains échantillons d'activité spécifique faible, par une méthode dérivée de celle d'HARRINGTON⁴, en utilisant 12 mg de T_2 et 5 mC ^{131}I ajoutés à une solution d'iode N renfermant 1.5 *M* KI pour un atome g I. Les hormones marquées sont dissoutes dans NaOH 0.01 *N*, en présence de quantités d'entraîneur suffisantes pour obtenir des concentrations finales de 10^{-5} *M* à 10^{-7} *M*.

On mesure les variations de volume des mitochondries par la turbidité des suspensions (spectrophotomètre Beckman DU à une longueur d'onde de 5200 Å) dans les conditions adoptées par LEHNINGER¹. Après certaines déterminations, une prise d'essai est effectuée en vue d'analyses électrophorétiques et chromatographiques. Parallèlement, des essais identiques sont préparés, puis centrifugés à $80000 \times g$ maximum pendant 10 min à 20°. La radioactivité des culots est mesurée directement dans les tubes au scintillateur γ cristal creux. Les résultats obtenus sont résumés dans une figure et deux tableaux.

Les mitochondries fixent rapidement et intensément les hormones. La quantité retenue n'est pas proportionnelle à leur concentration et l'addition d'ATP n'entraîne pas de perte de radioactivité, tout au moins dans les conditions expérimentales indiquées dans le Tableau I, ce qui permet d'exclure que la contraction sous l'effet de l'ATP, après gonflement par T_4 ou T_3 , soit liée au départ de celles-ci.

La Fig. 1 rend compte des phénomènes de gonflement et de contraction. Aucune

* Abréviations: T_3 , 3,5,3'-triiodo-L-thyronine; T_4 , L-thyroxine; T_2 , 3,5-diiodo-L-thyronine.

TABLEAU I

FIXATION DE T_4 ET DE T_3 PAR LES MITOCHONDRIES SANS OU AVEC ADDITION D'ATP

Hormone	Concentration	Addition	Radioactivité du culot* en % à divers temps			
			0 min	10 min	20 min	32 min
T_4	$2 \cdot 10^{-5}$		68.5	70.0	71.7	
T_4	$2 \cdot 10^{-5}$	ATP $5 \cdot 10^{-3}$ M à 10 min			72.2	
T_4	$1 \cdot 10^{-7}$				55.4	
T_4	$1 \cdot 10^{-7}$	ATP $5 \cdot 10^{-3}$ M à 10 min			54.8	
T_3	$2 \cdot 10^{-7}$					82.0
T_3	$2 \cdot 10^{-7}$	ATP $5 \cdot 10^{-3}$ M à 10 min				79.6

* Culot obtenu après centrifugation d'une suspension de 0.2 ml de mitochondries dans 10 ml Tris 0.02 M-KCl 0.125 M, contenant 0.1 ml T_4 ou T_3 . Température 20°.

TABLEAU II

QUANTITÉS D' ^{131}I DÉTERMINÉES APRÈS RADIOÉLECTROPHORÈSE

Hormone	Concentration	Addition	I^- à divers temps* (%)		
			0 min	20 min	40 min
T_3	10^{-7} M		8.6	8.8	5.6
T_3	10^{-7} M	ATP $4 \cdot 10^{-3}$ M à 12 min		6.9	6.8

* Les prises d'essais, pour électrophorèse en tampon $(NH_4)_2CO_3$ 0.05 M- CH_3COOH 0.05 M (pH 8.2; 2 h; 200 V), proviennent d'une suspension de 0.1 ml de mitochondries dans 5 ml Tris 0.02 M-KCl 0.125 M contenant 0.1 ml T_3 .

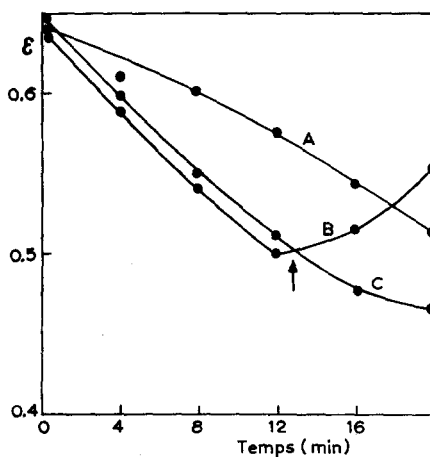


Fig. 1. Variations de l'extinction ϵ mesurée à 5200 Å, en fonction du temps en minutes. Les mesures sont effectuées dans les tubes contenant 5 ml Tris 0.02 M-KCl 0.125 M et 0.1 ml T_3 , en présence de 0.1 ml de la suspension de mitochondries. L'ATP est ajoutée à la 12ème min. A, essai témoin; B, essai avec 10^{-7} M T_3 + ATP; C, essai avec 10^{-7} M T_3 .

désiodation ne se manifeste au cours de leur évolution. Les analyses chromatographiques des milieux traités par T_3 ou T_4 à diverses concentrations confirment les résultats des électrophorèses donnés à titre d'exemple. Aucune substance inconnue renfermant

plus de 1 % de la radioactivité totale n'apparaît sur les autochromatogrammes, où les iodothyronines et les iodures sont seuls présents. Il n'a pas été possible de mettre en évidence des métabolites de T_3 ou de T_4 dans diverses conditions de température ou de milieu (α -cétoglutarate, phosphate de pyridoxal), conditions dans lesquelles l'effet des hormones sur le gonflement des mitochondries se manifeste. Enfin, il convient de signaler que les protéines mitochondriales migrent à 2 cm de l'origine des chromatogrammes, la migration de T_3 ou T_4 n'étant pas modifiée par leur présence, ce qui montre que les hormones fixées aux mitochondries ne le sont pas par liaison chimique. Les hormones semblent donc exercer leurs effets sur les mitochondries sans subir aucune transformation préalable, à la réserve d'une transformation réversible près.

*Laboratoire de Biochimie générale et comparée,
Collège de France, Paris (France)*

JEAN ROCHE
JOSEPH E. RALL
RAYMOND MICHEL
ODETTE MICHEL
STELIO VARRONE

¹ A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 2187.

² W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 259.

³ J. ROCHE, R. MICHEL, P. JOUAN ET W. WOLF, *Bull. soc. chim. biol.*, 37 (1955) 819.

⁴ C. R. HARRINGTON ET G. BARGER, *Biochem. J.*, 21 (1927) 169.

Reçu le 14 novembre, 1961

Biochim. Biophys. Acta, 56 (1962) 188-190

Some observations on insulin-receptor interaction

Previously, evidence was published to indicate the nature of the bonding of vasopressin at its receptor site in the kidney¹. A mechanism of action for membrane permeability was proposed for the antidiuretic hormone² (vasopressin), based on a thiol-disulfide exchange reaction involving the vasopressin disulfide bond and a receptor thiol group. Studies on the action of vasopressin on the toad bladder^{3,4} have also indicated a similar mechanism, giving further support to the hypothesis suggested. Since there are similarities in insulin, vasopressin and oxytocin, namely, each possessing a pentapeptide ring of 20 atoms with an intradisulfide bridge, we have been exploring, along with vasopressin studies, the possibility that the membrane-permeability action of insulin could also be explained by such an exchange reaction. We now have evidence to support this hypothesis. This study extends the early investigations of STADIE *et al.*^{5,6} on the binding of iodoinsulin to muscle tissue and the membrane-permeability studies of LEVINE AND GOLDSTEIN⁷.

In the experiments epididymal fat pads of Sprague-Dawley rats were removed as described by BALL *et al.*⁸. Diaphragms were carefully removed, washed in saline, blotted and cut in half. Both fat pads and hemidiaphragms were placed in flasks containing Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4), glucose and [¹²⁵I]insulin (biologically active), then gassed with a mixture of 95 % O₂ and 5 % CO₂ and incubated in a water bath at 37° for 20 min. Immediately after the incubation period the buffer solution was poured off and the tissue in a small amount of saline was heated for several minutes to inactivate enzymes. The tissues were then thoroughly washed with