

## INTERACTION DE LA THYREOSTIMULINE AVEC SES RECEPTEURS CELLULAIRES: EFFET DE LA PHOSPHOLIPASE C SUR LA FIXATION ET L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE

B. HAYE et Cl. JACQUEMIN

*Laboratoire de Biochimie et Centre de Biologie et de Biochimie du Développement  
Faculté des Sciences B.P. No. 347, 51-Reims, France*

Received 23 July 1971

### 1. Introduction

Le traitement par la phospholipase C de coupes de thyroïde inhibe la stimulation par la thyroestimuline (TSH) de l'oxydation du glucose, de la phospholipogénèse [1–4] et de l'adénylcyclase [5]. Néanmoins le niveau de base de ces activités biologiques est peu ou pas affecté par le traitement. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que le traitement par la phospholipase C inhibait la fixation de la TSH sur ses récepteurs membranaires.

Dans ce travail, notre but est de mieux comprendre l'absence d'action de TSH dans la phospholipogénèse de coupes traitées par la phospholipase C par analyse des phospholipides individuels. En outre nous étudions la répercussion du traitement enzymatique sur la capacité de fixation hormonale des sites membranaires stéréospécifiques par une étude directe avec  $^{125}\text{I}$ -TSH.

### 2. Matériel et méthodes

Les thyroïdes de porc ou de mouton ont été obtenues dans un abattoir, conservées à 0°, coupées avec un rasoir de Stadie-Riggs, lavées dans du NaCl 9‰ et pesées.

Dans les expériences de marquage par  $^{32}\text{P}$ , (CEA, Saclay, France) les coupes ont été incubées selon Pastan et Macchia [1–2]: préincubation (sans  $^{32}\text{P}$ ) à pH 5,15 dans du Krebs-Ringer-Bicarbonate (KRB)

à 37° en présence de phospholipase C (Calbiochem, lot no. 00 1118), lavages et incubation à pH 7,4 (KRB) et 37° pendant trois heures avec du  $^{32}\text{P}$  (5 à 20  $\mu\text{Ci}$ ) et les effecteurs (TSH\* 100 mU/ml, acétylcholine 2  $\mu\text{g/ml}$  et Eserine 230  $\mu\text{g/ml}$ ). Les milieux sont gazés avec un mélange de 96%  $\text{O}_2$ –4%  $\text{CO}_2$ .

Les lipides sont isolés selon les techniques décrites par Morton et Schwartz [6], Kogl et Van Deenen [7] et Scott et al. [8], purifiés selon Folch et al. [9] et des aliquotes sont comptées pour la détermination de la radioactivité dans les phospholipides totaux. Les échantillons sont chromatographiés selon Marinetti [10] sur du papier imprégné de gel de silice en utilisant le solvant diisobutylcétone – acide acétique –  $\text{H}_2\text{O}$  (40:20:3 v/v) pour la détermination de la radioactivité dans les phospholipides individuels.

Dans les expériences utilisant le  $^{14}\text{C}$ -Glycérol (CEA, Saclay, France) les coupes ont été préincubées 1 heure 30 dans du KRB pH 7,4, 37°, avec du  $^{14}\text{C}$ -glycérol (1  $\mu\text{Ci/ml}$  de milieu) selon Scott et al. [11], puis lavées et incubées avec de la phospholipase C (5 ou 25  $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 15 min ou 1 hr à pH 5,15. Les extraits lipidiques sont chromatographiés sur papier imprégné de gel de silice pour la

\* La TSH de mouton utilisée pour les expériences de fixation nous a été fournie gracieusement par le NIH, Bethesda, USA. La TSH de porc nous a été donnée par les Laboratoires Endopancrine.

Tableau 1

Effet de la TSH et de l'acétylcholine sur la phospholipogenèse de coupes de thyroïde de porc traitées ou non par la phospholipase C

	<sup>32</sup> P cpm/mg de tissu frais dans les phospholipides totaux	Distribution du <sup>32</sup> P dans les phospholipides individuels (%)	
		Phosphatidyl inositol	Phosphatidyl choline
Coupes non traitées			
Témoin A	21,9 ± 0,8	29,3 ± 1,5	53,0 ± 1,8
TSH	28,7 ± 1,2 <sup>a</sup>	38,5 ± 1,6 <sup>a</sup>	43,1 ± 1,2 <sup>a</sup>
Acétylcholine	29,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	67,8 ± 2,1 <sup>a</sup>	15,7 ± 2,2 <sup>b</sup>
Coupes traitées par la phospholipase C			
Témoin B	22,8 ± 0,8 <sup>c</sup>	17,9 ± 1,8 <sup>a</sup>	65,5 ± 1,5 <sup>a</sup>
TSH	20,9 ± 1,6 <sup>c,d</sup>	22,1 ± 1,8 <sup>a,d</sup>	60,9 ± 1,7 <sup>a,d</sup>
Acétylcholine	25,2 ± 0,6 <sup>f</sup>	51,7 ± 2,2 <sup>b,e</sup>	26,2 ± 1,9 <sup>b,e</sup>

Expression des résultats: moyenne ± erreur standard de la moyenne.

<sup>a</sup> P < 0,01 par comparaison au témoin A.<sup>b</sup> P < 0,001 par comparaison au témoin A.<sup>c</sup> Non significativement différent du témoin A.<sup>d</sup> Non significativement différent du témoin B.<sup>e</sup> P < 0,001 par comparaison au témoin B.<sup>f</sup> P < 0,05 par comparaison aux témoins A et B.

détermination de la radioactivité dans les phospholipides selon Marinetti [10] et dans les lipides neutres selon Marinetti [12].

Dans les expériences de fixation, la TSH a été marquée selon Nunes et al. [13] avec <sup>125</sup>I (CEA, Saclay, France) et purifiée (Activité spécifique 0,8 µCi/U). Les conditions expérimentales sont celles décrites par Pastan et al. [14]: après la fixation à 1° et trois lavages à 1°, les coupes sont comptées (Jaquemin et Haye [15] puis incubées avec du <sup>32</sup>P à 37°.

### 3. Résultats et discussion

La stimulation par la TSH, de l'incorporation de <sup>32</sup>P dans les phospholipides de coupes de thyroïde est décrite depuis longtemps [6–16]. Certains auteurs ont montré que la stimulation porte spécifiquement sur l'acide phosphatidique et le phosphatidylinositol [8–17]. Dans un travail précédent nous avons montré que cet effet de la TSH n'était pas sous la dépendance de l'adénosine, 3'-5'-monophosphate cyclique [18]. Avec des coupes traitées à la phospholipase C

Pastan et Macchia [1–2] et Burke [3] ont montré que l'incorporation de <sup>32</sup>P dans les phospholipides totaux n'était pas modifiée par le traitement avec de faibles concentrations d'enzyme (5 à 25 µg/ml) mais que par contre la stimulation par la TSH était inhibée. D'autre par l'acétylcholine, qui ne stimule pas l'adénylcyclase [19] et qui a le même effet que la TSH sur le métabolisme phospholipidique thyroïdien [20] continue à provoquer une stimulation globale après traitement par de faibles doses de phospholipase C. Dans ces expériences les phospholipides individuels ne sont pas analysés.

Nos résultats avec des coupes traitées à la phospholipase C (5 µg/ml) (tableau 1) confirment ceux de Pastan et Burke: l'incorporation basale de <sup>32</sup>P dans les phospholipides totaux n'est pas modifiée et l'effet stimulant de la TSH est aboli. Mais nous montrons en plus une modification de la distribution de la radioactivité dans les phospholipides individuels des coupes traitées par la phospholipase C avec un marquage préférentiel de la phosphatidylcholine, et à un degré moindre de la sphingomyéline. La stimulation spécifique par la TSH du métabolisme du phosphatidylinositol est elle aussi, abolie. Sur les

Tableau 2  
Effet du traitement par la phospholipase C de coupes de thyroïde de porc prémarquées avec du  $^{14}\text{C}$ -glycérol.

	Distribution du $^{14}\text{C}$ % de la radioactivité lipidique totale		Distribution du $^{14}\text{C}$ % de la radioactivité phospholipidique totale		Distribution du $^{14}\text{C}$ % de la radioactivité totale des lipides neutres	
	Phospholipides	Lipides neutres	Phosphatidyl inositol	Phosphatidyl choline	Monoglycerides et diglycerides	Triglycerides
Témoin 1,5 hr. Coupes marquées au $^{14}\text{C}$ -glycérol	69,1 $\pm$ 1,2	30,9 $\pm$ 1,0	17,1 $\pm$ 1,1	70,5 $\pm$ 0,9	14,1 $\pm$ 1,0	85,9 $\pm$ 0,8
Coupes prémarquées au $^{14}\text{C}$ -glycérol + 15 min sans phospholi- pase C	70,6 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	29,4 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	17,7 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	67,9 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	13,5 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	86,5 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>
Coupes prémarquées au $^{14}\text{C}$ -glycérol + 15 min avec phospholi- pase C (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).	67,6 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	32,4 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	15,8 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	67,5 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	15,6 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	84,4 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>
Coupes prémarquées au $^{14}\text{C}$ -glycérol + 15 min avec phospholi- pase C (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	64,8 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	35,2 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	19,7 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	64,8 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	23,3 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	76,7 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>
Coupes prémarquées au $^{14}\text{C}$ -glycérol + 1 hr sans phospholi- pase C	71,9 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	28,1 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	18,6 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	64,5 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	22,2 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	77,8 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>
Coupes prémarquées au $^{14}\text{C}$ -glycérol + 1 hr avec phospholi- pase C (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	65,3 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	34,7 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	46,0 $\pm$ 1,4 <sup>c</sup>	26,0 $\pm$ 1,1 <sup>c</sup>	29,1 $\pm$ 1,2 <sup>c</sup>	70,9 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>
Coupes prémarquées au $^{14}\text{C}$ -glycérol + 1 hr avec phospholi- pase C (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	61,1 $\pm$ 1,5 <sup>c</sup>	38,9 $\pm$ 1,4 <sup>c</sup>	51,6 $\pm$ 1,5 <sup>c</sup>	27,2 $\pm$ 1,2 <sup>c</sup>	37,4 $\pm$ 0,9 <sup>c</sup>	62,6 $\pm$ 1,1 <sup>c</sup>

Expression des résultats: moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne.

<sup>a</sup> Non significativement différent du témoin correspondant.

<sup>b</sup>  $P < 0,05$  par comparaison au témoin correspondant.

<sup>c</sup>  $P < 0,01$  par comparaison au témoin correspondant.

mêmes coupes, l'acétylcholine conserve (avec une légère diminution) ses effets typiques sur la stimulation des phospholipides totaux et individuels.

Avec de plus fortes doses de phospholipase C ( $> 25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) nous avons confirmé les travaux de Larsen et Wolff [21] qui ont trouvé une stimulation de l'incorporation dans les phospholipides totaux (200 à 250%). Avec de telles doses nous avons observé la disparition de l'effet de l'acétylcholine.

Pour mieux comprendre l'effet de la phospholipase C, nous avons soumis à son action des coupes marquées au préalable avec du  $^{14}\text{C}$ -glycérol. L'analyse des phospholipides et des lipides neutres après des temps variables et pour des doses différentes démontre que le traitement enzymatique a pour effet principal d'hydrolyser la phosphatidylcholine comme l'ont montré Macchia et al. [4] et de donner des diglycérides (tableau 2). Il semble que ces di-

Tableau 3  
Reconstitution de l'effet biologique sur des coupes de thyroïde de porc traitées par la phospholipase C.

	Incorporation de $^{32}\text{P}$ dans les phospholipides totaux (par rapport au témoin 100%)	Incorporation de $^{32}\text{P}$ dans le phosphatidylinositol (par rapport au témoin 100%)
<i>Témoin A</i> 1 hr à pH 5,15 sans phospholipase C 3 hr à pH 7,4 avec $^{32}\text{P}$ et sans TSH	100 $\pm$ 2	100 $\pm$ 2
<i>Témoin B</i> 1 hr à pH 5,15 sans phospholipase C 3 hr à pH 7,4 avec $^{32}\text{P}$ et avec TSH	120 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	157 $\pm$ 4 <sup>c</sup>
<i>Témoin C</i> 1 hr à pH 5,15 avec phospholipase C 3 hr à pH 7,4 avec $^{32}\text{P}$ et sans TSH	103 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	55 $\pm$ 2 <sup>c</sup>
<i>Témoin D</i> 1 hr à pH 5,15 avec phospholipase C 3 hr à pH 7,4 avec $^{32}\text{P}$ et avec TSH	103 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	42 $\pm$ 4 <sup>c</sup>
<i>Témoin A'</i> 1 hr pH 5,15 sans phospholipase C 3 hr pH 7,4 dans milieu de Campagne et Gruber 3 hr pH 7,4 avec $^{32}\text{P}$ et sans TSH	100 $\pm$ 3	100 $\pm$ 3
<i>Témoin B'</i> 1 hr pH 5,15 sans phospholipase C 3 hr pH 7,4 dans milieu de Campagne et Gruber 3 hr pH 7,4 avec $^{32}\text{P}$ et avec TSH	129 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	182 $\pm$ 5 <sup>c</sup>
<i>Témoin C'</i> 1 hr pH 5,15 avec phospholipase C 3 hr pH 7,4 dans milieu de Campagne et Gruber 3 hr pH 7,4 avec $^{32}\text{P}$ et sans TSH	121 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	105 $\pm$ 2 <sup>a</sup>
<i>Témoin D'</i> 1 hr pH 5,15 avec phospholipase C 3 hr pH 7,4 dans milieu de Campagne et Gruber 3 hr pH 7,4 avec $^{32}\text{P}$ et avec TSH	129 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	127 $\pm$ 1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Non significativement différent du témoin correspondant.

<sup>b</sup>  $P < 0,01$  par comparaison au témoin correspondant.

<sup>c</sup>  $P < 0,001$  par comparaison au témoin correspondant.

glycérides servent de précurseurs pour la biosynthèse de la phosphatidylcholine, ce qui explique son marquage préférentiel par le  $^{32}\text{P}$ . Un phénomène analogue a été décrit par Rossiter dans le cerveau de rat [22]. Cette incorporation spécifique du  $^{32}\text{P}$  dans la phosphatidylcholine des coupes traitées par

la phospholipase C apparaît comme une opération de reconstruction de la matrice phospholipidique. Une suggestion analogue a été formulée par Macchia et al. [4] pour des coupes traitées à la sphingomyélinase et par Schneider pour des coupes soumises à un choc osmotique [23]. Pour vérifier cette hypo-

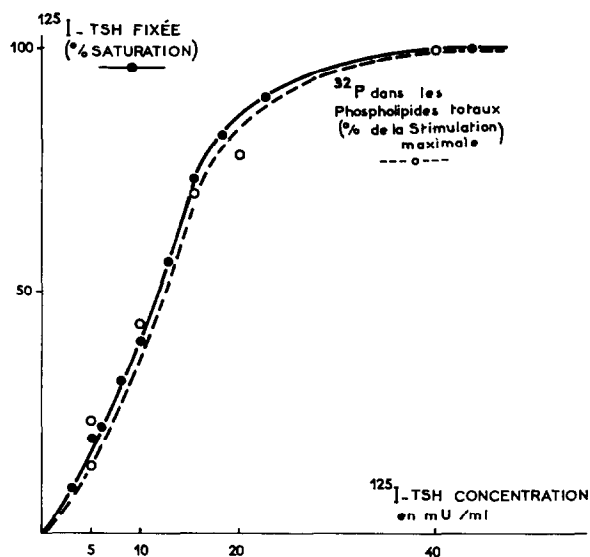


Fig. 1. Comparaison des courbes de fixation de  $^{125}\text{I}$ -TSH et de stimulation de la phospholipogénèse de coupes de thyroïde de porc.

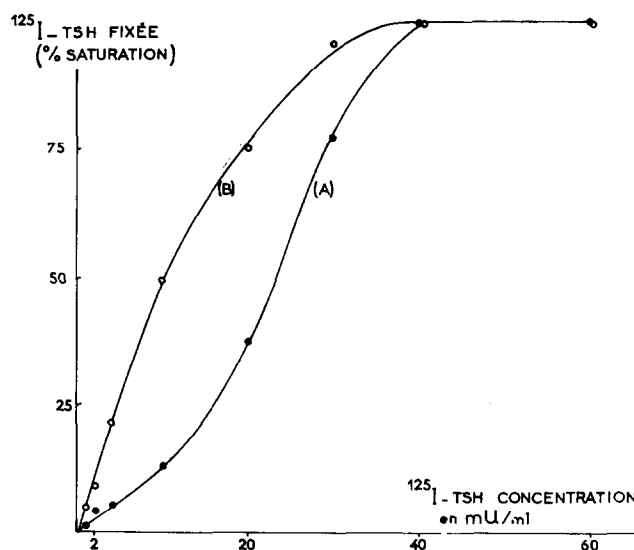


Fig. 2. Fixation de  $^{125}\text{I}$ -TSH en fonction de la concentration dans le milieu sur des coupes de thyroïde de mouton traitées (B) ou non (A) par la phospholipase C.

thèse, nous avons réalisé l'expérience suivante: après une préincubation à pH 5,15 en présence de phospholipase C (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), des coupes sont incubées pendant 3 hr dans du milieu de Campagne et Gruber [24] plusieurs fois renouvelé et finalement incubées avec du  $^{32}\text{P}$  avec ou sans TSH pour tester le taux de récupération de leur sensibilité à l'hormone. On constate que la TSH exerce sur de telles coupes une stimulation globale sur les phospholipides et un effet spécifique sur le phosphatidylinositol.

La récupération n'est pas totale, mais représente environ 27% de la stimulation maximale (tableau 3).

Yamashita et al. [5] ont suggéré que l'inhibition par la phospholipase C de l'effet stimulant de la TSH pouvait être due soit à la destruction du récepteur, soit au découplage entre le complexe hormone-récepteur et les systèmes responsables des effets secondaires.

Pour tester ces hypothèses nous avons étudié des fixations directes de  $^{125}\text{I}$ -TSH sur des coupes de thyroïde.

Des expériences préliminaires [15] nous avaient permis de montrer la spécificité de la fixation en utilisant un sérum anti-TSH. Nous avons de plus vérifié, la concordance entre la courbe de fixation

de  $^{125}\text{I}$ -TSH à  $1^\circ$  et la stimulation globale de l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans les phospholipides consécutives à cette fixation (fig. 1).

Nos résultats sur des coupes traitées ou non à la phospholipase C montrent que l'absence d'effet de la TSH n'est pas due à une inhibition totale de la fixation (fig. 2). La quantité maximale fixée dans le cas des coupes traitées est diminuée de 30% environ. Ceci peut être causé par une perte de poids pendant le traitement enzymatique. Pour conclure définitivement à la préservation de la capacité réceptrice de la membrane il serait nécessaire d'utiliser des cellules isolées et de les compter. Qualitativement les courbes de fixation en fonction de la dose montrent des différences caractéristiques: l'indice de coopérativité passe de 1,5 pour le témoin à 1,2 pour les coupes traitées à la phospholipase C, ce que l'on peut interpréter comme une désensibilisation partielle du système membranaire. Ces résultats nous permettent d'évaluer le rôle de la phosphatidylcholine dans l'action hormonale. Il semble que ces molécules ne participent pas (ou peu) à l'interaction spécifique directe entre l'hormone et son récepteur protéique [25] mais par contre que leur intervention dans la transmission du stimulus est primordiale.

L'intégrité des phospholipides membranaires est nécessaire à l'activation de divers métabolismes par la TSH: même dans le cas de l'adényl-cyclase probablement localisée à la surface interne de la membrane plasmique, le traitement par la phospholipase C provoque le découplage entre la fixation et la stimulation de la cyclase, le niveau de base de cet enzyme n'étant pas affecté [5].

De plus chez certaines espèces (mouton, boeuf) la courbe de fixation ainsi que les courbes de réponse biologique présentent une allure sigmoïde. Il semble que ce caractère soit lui aussi lié à l'intégrité des phospholipides. On peut penser que leur "flexibilité" permet la transmission de proche en proche du changement de conformation des récepteurs protéiques entraînant une fixation et une réponse coopérative.

### Remerciements

Ce travail a été réalisé avec l'aide d'un contrat de la Délégation à la Recherche Scientifique et Technique. (D.G.R.S.T. no. 70-7-2539). Les auteurs remercient Madame Odette Legue pour son assistance technique.

### Références

- [1] V. Macchia et I. Pastan, *J. Biol. Chem.* 242 (1966) 1864.
- [2] I. Pastan et V. Macchia, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 5757.
- [3] G. Burke, *Metabolism* 18 (1969) 720.
- [4] V. Macchia, O. Tamburrini et I. Pastan, *Endocrinology* 86 (1970) 787.
- [5] K. Yamashita, G. Bloom, B. Rainard, U. Zor et J.B. Field, *Metabolism* 19 (1970) 1109.
- [6] M.E. Morton et J.R. Schwartz, *Science* 117 (1953) 103.
- [7] F. Kogl et L.L.M. Van Deenen, *Acta Endocrinol.* 36 (1961) 9.
- [8] T.W. Scott, S.M. Jay et N. Freinkel, *Endocrinology* 79 (1966) 591.
- [9] J. Folch, M. Less et G.H. Sloane Stanley, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497.
- [10] G.V. Marinetti, *J. Lipid. Res.* 3 (1962) 1.
- [11] T.W. Scott, S.C. Mills et N. Freinkel, *Biochem. J.* 109 (1968) 325.
- [12] G.B. Marinetti, J.F. Erblanc et M. Brossard, *Metabolism and Physiological Significance of Lipids*, ed. R.M.C. Dawson et D.N. Rhodes (John Wiley and Sons, London, 1964) p. 71.
- [13] J. Nunez, J. Pommier, M. El Hilali and J. Roche, *J. Labelled Compounds* 1 (1965) 128.
- [14] I. Pastan, J. Roth et V. Macchia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56 (1966) 1802.
- [15] C. Jacquemin et B. Haye, *C.R. Soc. Biol.* 162 (1968) 1064.
- [16] N. Freinkel, *Endocrinology* 61 (1957) 448.
- [17] N. Freinkel, *Biochem. J.* 68 (1958) 327.
- [18] C. Jacquemin et B. Haye, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 52 (1970) 153.
- [19] I. Pastan et V. Macchia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29 (1967) 792.
- [20] M. Altman, H. Oka et J.B. Field, *Biochim. Biophys. Acta* 116 (1966) 586.
- [21] P.R. Larsen and J. Wolff, *Science* 155 (1967) 335.
- [22] R.J. Rossiter, *Metabolism and Physiological Significance of Lipids*, ed. R.M.C. Dawson et D.N. Rhodes (John Wiley and Sons, London, 1964) p. 511.
- [23] P.B. Schneider, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 6281.
- [24] R.N. Campagne et M. Gruber, *Biochim. Biophys. Acta* 58 (1962) 353.
- [25] A.W. Cuthbert, *Pharmacol. Rev.* 19 (1967) 59.