

Biochimie générale et comparée

M. Jean ROCHE,

membre de l'Institut (Académie des Sciences), professeur

L'enseignement a été donné dans une série de séminaires, suivis de discussions dirigées par le professeur.

Les exposés ont porté principalement sur des domaines reliés à des recherches en cours au Collège de France, tant à Paris qu'au laboratoire de Biologie marine de Concarneau, recherches poursuivies par trois équipes autonomes de travailleurs placées respectivement sous la direction de MM. NGUYEN VAN THOAI, directeur scientifique au C.N.R.S., J. NUNEZ, directeur scientifique au C.N.R.S., et R. MICHEL, professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris. La liste de ces vingt exposés est la suivante :

M. A. FATTOUM, *Caractère essentiel du résidu tyrosine dans l'arginine phosphotransférase ;*

M. R. KASSAB, *Localisation tridimensionnelle des sites actifs enzymatiques au moyen des réactifs difonctionnels ;*

M^{me} A. OLÖMUCKI, *Acquisitions récentes sur l'octopine déshydrogénase ;*

M. Cl. ROUSTAN, *Interaction des substrats avec les phosphagène phosphotransférases chimiquement modifiées ;*

M^{me} F. THOMÉ, *Mode de fixation du coenzyme et des substrats sur les aminoacide oxydases ;*

M. J. BERTHOU (Laboratoire de Cristallographie du C.N.R.S., Bellevue), *Etude cristallographique de la préalbumine ;*

M. D. HAYES (Institut de Biologie physico-chimique), *Structure et fonctions des ribosomes bactériens ;*

M^{11e} F. LANDON, *Application de l'ultracentrifugation analytique à l'étude des protéines dissociées ;*

M. M. OLOMUCKI, *Etude des centres actifs à l'aide de réactifs des protéines ; rôle du microenvironnement ;*

M^{11e} L.A. PRADEL, *Etude des changements conformationnels des protéines par la méthode d'échanges d'hydrogène ;*

M. Y. LE GAL, *Cultures synchrones d'algues unicellulaires ;*

M^{me} Cl. CORREZE, *Action des hormones au niveau de la traduction ;*

M. J. MAUCHAMP, *Coordination entre la synthèse de protéines spécifiques et l'organisation du reticulum endoplasmique ;*

M. P. PINELL, *Etude sur les transférases des systèmes de synthèse protéique chez les mammifères ;*

M^{me} L. RAPPAPORT, *Régulation de la synthèse protéique dans la glande thyroïde (première partie) ;*

M^{me} L. RAPPAPORT, *Régulation de la synthèse protéique dans la glande thyroïde (deuxième partie) ;*

M. J. BOUHNİK, *Action des hormones thyroïdiennes et de l'adrénaline chez la souris Dwarf DW++ ;*

M. M. BAUDRY, *Action des hormones thyroïdiennes sur la synthèse des constituants protéiques mitochondriaux ;*

M^{11e} M. LUCAS, *Action des découplants sur la perméabilité des membranes mitochondriales ;*

M. R. MICHEL, *Action des hormones thyroïdiennes sur les mitochondries isolées des corticosurrénales.*

RECHERCHE

I. - Enzymologie

Le groupe de recherche dirigé par M. NGUYEN VAN THOAI, directeur scientifique au C.N.R.S., comprend : M^{me} Y. ROBIN, directeur-adjoint à l'E.P.H.E., M^{11e} L.-A. PRADEL, maître de recherche au C.N.R.S., MM. DANG BA PHO et R. KASSAB, M^{11e} G. LACOMBE, M^{me} A. OLOMUCKI, MM. NGUYEN VAN THIEM et M^{me} F. THOMÉ-BEAU, chargés de recherche au C.N.R.S., M^{mes} A. BREVET, Cl. HUC et Ch. ORIOL, M. Cl. ROUSTAN et M^{me} E. DER TERROSSIAN, attachés de recherche au C.N.R.S., M. A. FATTOUM, M^{11es} C. KLOTZ et F. LANDON, chercheurs libres, M^{11es} G. DESVAGES et F. REGNOUF, ingénieurs au C.N.R.S., M^{me} Ch. DUBORD, M^{11es} J. FEINBERG, A. GUILLOU et Y. GUILLOU, M^{mes} V.

LE COMTE et F. LEFÉBURE, techniciennes au C.N.R.S., M. M. OLOMUCKI, sous-directeur de laboratoire au Collège de France, M. J. ДИОРОН, chercheur libre.

Les orientations des recherches sur les sept enzymes identifiés et isolés à l'état homogène dans le groupe dirigé par M. NGUYEN VAN THOAI ont été précisées durant l'année écoulée. Il s'agit : 1°) d'étudier le mécanisme d'action de ces enzymes par la détermination du rôle des résidus d'acide aminé qui les constituent et de la topographie de leurs centres catalytiques ; 2°) d'établir les similitudes et les différences entre ces enzymes, dont la fonction catalytique peut être totalement dissemblable (transphosphorylation et oxydoréduction), mais dont la spécificité de substrat est identique ou analogue (par exemple arginine phosphokinase et arginine oxygénase décarboxylante) ; 3°) de rechercher les variétés moléculaires d'enzymes du même type et dont le degré de polymérisation est différent, et de déterminer les facteurs physico-chimiques qui provoquent leurs changements conformationnels. Cette étude est susceptible de faire ressortir la convergence ou la divergence de conformation qui permet le maintien d'une fonction catalytique donnée tout en expliquant la spécificité de substrat.

1. — *Arginine oxygénase décarboxylante et octopine déshydrogénase*

A. *Complexes binaire et ternaire*

L'étude en spectrophotométrie différentielle de l'octopine déshydrogénase montre que le coenzyme NAD^+ ou NADH se fixe sur la protéine enzymatique à la fois par l'adénine et par le cycle pyridinique. La formation du complexe ternaire protéine-coenzyme-substrat est une réaction ordonnée. Une étude semblable va être entreprise sur l'arginine oxygénase afin d'établir si celle-ci présente également une perturbation de résidus tryptophanyl, analogue à celle observée avec le premier enzyme, lors de la fixation de substrats guanidiques (DANG BA PHO, A. OLOMUCKI et Cl. HUC).

B. *Résidus d'acide aminés essentiels*

1° Octopine déshydrogénase. L'emploi du pyrocarbonate d'éthyle et de l'amino-H-tétrazole montre que l'enzyme renferme des résidus histidinyl essentiels à son activité. Ces résidus sont proches des restes cystéinyl également indispensables à son activité. L'étude doit se poursuivre par le marquage des résidus histidinyl et cystéinyl essentiels, et par l'isolement des peptides qui les entourent, ainsi que par la mise en évidence de leur rôle dans la fixation des substrats ou dans la catalyse (A. OLOMUCKI, DANG BA PHO et Cl. HUC).

2° Arginine oxygénase et aminoacide oxydases. L'arginine oxygénase purifiée est inhibée par le pyrocarbonate d'éthyle et l'étude spectrophotométrique révèle l'apparition de la bande caractéristique du N-éthoxycarboximidazole centrée à 242 nm. L'enzyme qui contient 2 moles de FAD par mole d'enzyme renferme 2 résidus histidinyl essentiels, ce qui suggère la présence de deux sites de réaction.

Le comportement de la L-arginine oxygénase vis-à-vis du pyrocarbonate d'éthyle est analogue à celui de la D-aminoacide oxydase. Les deux enzymes sont protégés contre l'effet inhibiteur de ce réactif par leurs substrats respectifs ; au contraire, la L-aminoacide oxydase n'est pas protégée par la L-leucine contre l'inhibition par le pyrocarbonate d'éthyle (F. THOMÉ-BEAU, LÊ THI LAN et A. OLOMUCKI).

2. — *Phosphagène phosphotransférases*

A. *Topographie du centre catalytique de l'arginine kinase et schéma de réaction*

L'emploi d'inhibiteurs spécifiques et l'étude en spectrophotométrie différentielle des interactions des substrats ou de leurs analogues avec l'enzyme natif et les enzymes chimiquement modifiés permet de décrire le centre catalytique de l'arginine kinase de P.M. $\simeq 40.000$ comme formé actuellement de 5 sous-sites : 1) Le sous-site constitué par le ϵ -NH₂-lysyl qui sert à protoner le noyau adénine de l'ATP. La présence simultanée du groupe 6-aminé, de l'azote 1-N du noyau purique et des groupes phosphoryle γ et β est indispensable à la formation des complexes actifs enzyme-nucléotides. 2) Le second sous-site représenté par le résidu cystéinyl dont le groupe -SH sert à fixer la L-arginine par le groupe α -NH₂ de cet acide aminé. Ce groupe -SH doit être très proche du résidu tyrosyl du 3° sous-site. 3) Ce dernier résidu **est indispensable au maintien** de la conformation moléculaire active. 4) Une région hydrophobe servant à fixer la chaîne carbonée de l'arginine. L'isoleucine, mais non la leucine, donne avec l'enzyme le même spectre différentiel que l'arginine. 5) Un sous-site constitué par un résidu histidinyl qui doit servir à l'attaque nucléophile du phosphore terminal de l'ATP. L'enzyme dont le résidu histidinyl essentiel est bloqué continue à fixer les deux substrats nucléotidique et guanidique, mais est inactif et ne permet plus les échanges isotopiques $ATP + ADP-C^{14} \rightleftharpoons ADP + ATP-C^{14}$ (Cl. ROUSTAN, L.A. PRADEL, R. KASSAB et A. FATTOUM).

B. *Mécanisme de réaction*

L'étude d'échanges isotopiques démontre que le mécanisme de réaction de l'arginine kinase de P.M. $\simeq 40.000$ est mixte. Le mécanisme « ping-pong »

avec formation d'un enzyme phosphorylé transitoire existe, comme le montre l'échange $ATP + ADP-C^{14} \rightleftharpoons ADP + ATP-C^{14}$, mais il est beaucoup plus lent que le mécanisme séquentiel, qui prédomine nettement. Pour tous les autres enzymes étudiés : créatine-, taurocyamine-, lombricine kinases, seul le mécanisme séquentiel a été mis en évidence.

Les résultats obtenus en échanges isotopiques concordent entièrement avec l'étude cinétique faite selon Cleland (Cl. ROUSTAN et L.A. PRADEL).

Ces recherches complètent celles poursuivies précédemment avec l'arginine kinase dimérique de P.M. \simeq 80.000 ; elles seront complétées par des travaux en cours sur l'enzyme tétramérique de P.M. \simeq 160.000 (C. KLOTZ et Y. ROBIN).

C. Structure covalente

1° Peptides à -SH essentiel. La détermination de la structure séquentielle du peptide entourant le résidu cystéinyl essentiel de l'arginine kinase de homard ayant été réalisée, celle du peptide correspondant de la lombricine kinase est en voie d'achèvement. La comparaison des deux peptides montre que leur partie carboxyle terminale présente une constance remarquable, que n'altère que la délétion d'un seul résidu d'acide aminé ou le remplacement d'un seul aminoacide par un autre, ce qui est équivalent à la mutation d'une seule base. La partie N-terminale du peptide de la lombricine kinase se rapproche beaucoup de celle du peptide de la créatine kinase, mais diffère de celle du peptide de l'arginine kinase (E. DER TERROSSIAN, L. A. PRADEL et R. KASSAB).

Un travail parallèle se développe avec la taurocyamine kinase (L.A. PRADEL et A. BREVET).

2° Structure primaire de l'arginine kinase. L'étude de la structure covalente de l'enzyme de homard a comporté l'isolement de 6 à 7 peptides obtenus après traitement de la kinase au bromure de cyanogène. Ce travail est rendu indispensable par les études cristallographiques au spectre de rayons X entreprises sur nos cristaux d'arginine kinase, depuis plusieurs mois, par M. BERTHOU (A. FATTOUM, F. REGNOUF, L.A. PRADEL et R. KASSAB).

D. Conformation moléculaire et polymérisation

1° Variations conformationnelles de l'arginine kinase. L'enzyme de homard peut être réversiblement dénaturé en alcalinisant le milieu jusqu'à pH 12. Les déterminations des différents paramètres de dispersion optique rotatoire, de la viscosité et des constantes de sédimentation montrent que la structure secondaire est plus sensible aux variations électrostatiques que la

structure tertiaire. Une grande partie des α -hélices semble être à la périphérie de la molécule. C'est dans cette région que se situent 4 résidus tyrosyl (sur 11 que possède l'enzyme), mis en évidence par la méthode de perturbation à l'éthylène glycol (M.F. LANDON et C. ORIOL).

2° Polymérisation des phosphagène kinases. L'étude en ultracentrifugation analytique par la méthode d'Yphantis (1960) des phosphagène kinases traitées au chlorhydrate de guanidine montre que les enzymes de P.M. \simeq 40.000 sont des monomères et ceux de P.M. \simeq 80.000 sont des dimères. Ces travaux confirment les résultats partiels obtenus antérieurement par l'examen des cartes peptidiques des hydrolysats trypsiques de ces enzymes, par le tamisage moléculaire sur Sephadex des enzymes traités à l'urée ou par la détermination des groupes carboxyle terminaux (C. ORIOL et M.F. LANDØN).

L'arginine kinase de P.M. 80.000 de saponcle a été obtenue également à l'état cristallisé et son étude cristallographique au moyen de la spectrographie aux rayons X permettra de comparer la symétrie de la molécule dimérique avec la conformation de l'enzyme monomère (G. LACOMBE et NGUYEN VAN THIEM).

II. — Réactifs des protéines

L'équipe d'organiciens dirigée par M. M. OLOMUCKI, sous-directeur du laboratoire, et comprenant MM. J. DIOPOH et P. HÉBRARD, chercheurs libres, et J.Y. LE GALL, technicien, a poursuivi des travaux liés principalement aux recherches du groupe d'enzymologie. Une partie de ces études concerne la mise au point de nouveaux réactifs des protéines, destinés à ponter deux résidus d'aminoacides voisins au niveau du centre actif des enzymes. La réactivité d'une série de composés préparés au laboratoire a été testée par trois méthodes : a) réactions modèles avec différents acides aminés, suivies de l'isolement et de l'étude de la structure des produits formés, b) réactions avec des protéines de structure connue et c) réactions avec des protéines enzymatiques étudiées au laboratoire.

Des recherches sur de nouvelles méthodes générales d'obtention des maléimides N-substituées, réactifs des groupements -SH, ont été poursuivies. On examine les possibilités de préparer ces composés soit à partir des dérivés métalliques de la maléimide, soit à partir de l'acide malique.

Plusieurs N ω -halogénoacétyl-ornithines, composés de structure apparentée à celle de l'arginine, ont été synthétisées en vue d'une étude des sites de fixation de l'arginine sur différents enzymes agissant sur cet acide aminé.

Des techniques de semi-microsynthèse ont été introduites. Les réactifs des protéines obtenus ont pu ainsi être préparés sous forme radioactive. La préparation de divers dérivés de l'arginine fixés sur un polymère insoluble a été entreprise dans le but d'introduire la technique de la chromatographie d'affinité dans les processus d'isolement des enzymes de l'arginine. Les recherches sur l'utilisation de la guanidine pour la synthèse d'amines primaires ont été complétées et achevées.

III. — *Hormones thyroïdiennes et régulation de leur biosynthèse*

Les travaux ont été poursuivis par l'équipe de recherche N° 18 du C.N.R.S., dirigée par M. J. NUNEZ, directeur scientifique, et dont la composition est la suivante : M. J. MAUCHAMP et M^{mes} M. PAVLOVIC-HOURNAC et R. LAHALLE, chargées de recherche ; M. J. POMMIER, ingénieur ; M^{mes} L. RAPPAPORT et Cl. CORRÈZE, attachées de recherche ; M^{me} A. FELLOUS, assistante ; M. J.F. LETERRIER, stagiaire de recherche ; M. P. PINELL, boursier ; M^{lle} M.F. CARLIER, étudiante 3^e cycle ; M^{me} F. SAVOIE, chercheur libre ; M^{me} S. DE PRAILAUNÉ, ingénieur ; M^{lles} J. OSTY et F. CHANTOÛX, techniciennes.

Pendant l'année 1969-1970, l'équipe a été organisée en trois groupes :

1) Etude de l'iodation péroxydasique des protéines et sa régulation, dirigé par MM. NUNEZ et POMMIER et comprenant : M. L. SOKOLOFF (chef de service au N.I.H., Bethesda, U.S.A., en séjour d'un an), M^{me} SAVOIE, M^{me} DE PRAILAUNÉ et M^{lle} CARLIER.

2) Action de la TSH sur la synthèse et l'iodation de la thyroglobuline, dirigé par M^{me} PAVLOVIC-HOURNAC et comprenant M^{me} RAPPAPORT et M. LETERRIER.

3) Activité *in vitro* des ribosomes et des facteurs solubles de foie d'animaux thyroéoprives, dirigé par M^{me} LAHALLE et comprenant M^{me} CORRÈZE, M^{me} FELLOUS et M. PINELL.

1. - *Thèmes de recherche*

Les études sur le mode d'action hormonale ont porté, au cours de l'année écoulée, sur deux modèles principaux :

- 1) activation des enzymes,
- 2) néosynthèse des enzymes.

En ce qui concerne le premier type d'action, la liste des hormones qui agissent par l'intermédiaire du second messenger, le 3'5'-c-AMP, continue à

s'allonger. En particulier, il semble désormais prouvé que toute une série d'effets de la TSH, l'iodation de la thyroglobuline en particulier, sont mimétisés par le nucléotide cyclique. Toutefois, aucun effort sérieux n'a été entrepris pour étudier l'interaction entre le c-AMP et tel ou tel enzyme susceptible d'être sa cible moléculaire. C'est dans cette direction que nous avons choisi d'orienter les recherches d'un premier groupe de l'équipe.

L'action hormonale sur la synthèse des protéines est étudiée d'une manière qui nous semble plus pertinente que lors des années passées. Divers groupes s'attachent, en effet, à mettre en évidence une sélectivité dans l'action hormonale, qui implique en première analyse une sélection de l'information génétique. Cette sélection pourrait en principe correspondre à une action directe ou non de l'hormone sur la transcription de portions restreintes du génôme. Une autre possibilité semble cependant exister chez les organismes pluricellulaires, mise en évidence dans plusieurs systèmes différents (recherches des groupes de Tomkins, Kenney, Moscona, etc.) : elle correspond à la régulation cytoplasmique par l'hormone du processus de traduction. C'est à ce type d'action que se rattachent les recherches entreprises par le deuxième groupe de l'équipe, qui étudie la régulation de la synthèse protéique dans la glande thyroïde.

Enfin, le troisième domaine qui nous semble permettre des recherches précises sur des systèmes définis est celui qui correspond à l'étude de l'activation par des hormones (telles que l'insuline (Wool) et la thyroxine) de la capacité de synthèse des systèmes polysomiques. C'est à l'étude de ce type d'action que se consacre le troisième groupe de l'équipe.

Il est évident que chacun de ces trois sujets de recherches serait un domaine suffisant pour une équipe telle que la nôtre. Cependant, il nous semble préférable pour le moment de ne pas engager l'équipe dans une direction unique qui risque de se révéler stérile, comme cela a été le cas dans ce domaine et à plusieurs reprises dans les quelques années passées.

2. - Evolution et résultats

A. Iodation péroxydasique des protéines.

a) Mécanisme d'action de la péroxydase de raifort.

Ont été étudiés :

1° la cinétique de formation de I_2 quand I^- est le seul substrat ; elle est du second ordre, ce qui confirme l'existence de deux sites sur l'enzyme ;

2° la cinétique d'oxydation de divers substrats phénoliques. Certains mono- ou diphénoles donnent une réaction du premier ordre, d'autres d'ordre

compris entre 1 et 2. L'ordre de la réaction n'obéit donc pas aux prédictions de Yamazaki, Masson et coll. puisqu'il ne dépend pas du nombre d'électrons susceptibles d'être cédés par les divers substrats. Le pH optimum d'oxydation de ces substrats est supérieur à la neutralité (7 à 8,5).

Pour l'iodation de protéines (son pH optimum est de 6), les relations V/S sont sigmoïdes. Or l'enzyme est monomérique. La forme sigmoïde dépend des caractéristiques de la réaction, qui se fait au « hazard avec une voie privilégiée ». Le traitement à l'ordinateur des données expérimentales permet d'obtenir des constantes cinétiques compatibles avec l'équation théorique d'un tel mécanisme.

Conclusion :

La vitesse de l'iodation enzymatique des protéines dépend des concentrations relatives, iodure-protéine, tous deux substrats de la réaction. Cette conclusion et les données relatives à la formation de I_2 et d'autres substrats phénoliques, l'effet de pH sur la spécificité vis-à-vis du substrat fournissent des renseignements sur le mécanisme d'action des peroxydases et orientent la réflexion sur le fonctionnement de l'enzyme thyroïdien. Il est, en particulier, intéressant de rappeler qu'en surcharge iodée, la thyroïde est bloquée. Il se trouve que l'iodation des protéines par la peroxydase de raifort est bloquée par excès d'iodure : le produit principal de la réaction est alors I_2 ; nous avons donc établi un bon modèle moléculaire d'un processus régulateur physiologique thyroïdien.

b) *Enzyme thyroïdien.*

L'enzyme est particulière. Son extraction et sa purification posent des problèmes difficiles. Par trypsinisation, on libère une petite quantité d'enzyme. Un traitement à la digitonine suivant la trypsinisation permet de solubiliser une fraction de $PM = 50.000$ (Enzyme I). Sa purification est obtenue par chromatographie sur Sépharose ; on sépare ainsi deux pics d'activité qui n'ont pas la même stabilité ni la même taille (Enzyme I-A et I-B) et qui sont tous deux des hémoprotéines. Par un deuxième passage sur Sépharose puis sur DEAE-Sephadex, précipitations fractionnées par $SO_4(NH_4)_2$, on atteint une purification de 800 fois pour l'enzyme I-B.

Un traitement par la digitonine du culot après la première extraction permet d'obtenir une autre fraction de $PM = 200.000$, qui est aussi une hémoprotéine (Enzyme II).

Les caractéristiques cinétiques, la spécificité vis-à-vis de divers substrats des diverses préparations I-A, I-B et II semblent différentes. Nous nous proposons maintenant :

- 1° de poursuivre leur purification ;
- 2° d'aborder l'étude de leur mécanisme d'action ;
- 3° d'étudier si l'action du c-AMP se localise à leur niveau ; des résultats préliminaires positifs ont été obtenus à cet égard.

B. Régulation de la synthèse protéique dans la glande thyroïde

La régulation de la synthèse protéique a été étudiée dans des glandes thyroïdes de rat normal et hypophysectomisé. Nous avons précédemment montré qu'en absence de TSH, la synthèse de thyroglobuline est diminuée des deux tiers. Ce résultat a été précisé notamment en utilisant la méthode de précipitation par l'anticorps spécifique. On confirme ainsi que l'effet activateur par l'hormone hypophysaire correspond bien à une action sur la synthèse de la thyroglobuline et qu'il est sélectif puisque cette protéine est la seule dont la formation dépende notablement de la TSH.

Dans une autre série d'expériences, l'effet *in vitro* de l'actinomycine D a été étudié. On constate :

a) que la synthèse de la thyroglobuline n'est pas affectée sensiblement par l'antibiotique même après 18 heures d'incubation ou de préincubation, et cela aussi bien dans des glandes normales que dans celles provenant d'animaux hormonoprives. La diminution de la synthèse de la thyroglobuline consécutive à l'absence de TSH n'est donc pas due à une moindre stabilité du m-ARN spécifique.

b) L'actinomycine exerce un effet paradoxal sur la synthèse de la fraction des protéines particulières ; après 2 h d'incubation, l'antibiotique active la synthèse de 200 %. Cet effet n'est observé que dans les glandes normales. Lorsque l'hormone est absente, l'effet de « superinduction », selon la terminologie de Tomkins, est absent. Divers arguments nous permettent de spéculer sur l'existence probable dans la glande thyroïde d'un mécanisme cytoplasmique, hormono-dépendant, qui assure la régulation de la traduction. Ce système, analogue à celui décrit par Moscona, serait constitué par un inhibiteur et un activateur de stabilité différente.

c) La synthèse des protéines solubles autres que la thyroglobuline est inhibée par l'actinomycine dans les glandes normales et non dans celles hormonoprives.

En conclusion :

Ces divers résultats suggèrent que la cellule thyroïdienne contient plusieurs mécanismes, hormono-dépendants, de régulation de la synthèse protéique, certains susceptibles de prendre place au niveau de la transcription, d'autres de la traduction.

D'une manière plus générale, il existe très peu d'exemples où l'on ait prouvé sans ambiguïté une action hormonale sélective sur la synthèse d'une protéine spécifique (spécificité du transport des corticostéroïdes dans le cas de la tyrosine transaminase et de la tryptophane pyrrolase du foie ; spécificité du transport de la progestérone par l'avidine dans l'oviducte).

D'autre part, outre la TSH, diverses hormones exercent des effets dits « trophiques » (morphogénétiques) : l'ACTH, la LH, la TSH. Or comme la TSH, l'ACTH et la LH exercent aussi des effets dits « phasiques » (rapides, activateurs) mimétisés dans ces trois cas par le c-AMP. Or, à notre connaissance, la première description d'un effet trophique en termes autres que morphologiques ou physiologiques est celle rapportée dans ce travail. L'action hormonale « génotropique » et sélective pourrait donc être tardive et secondaire à une action « enzymotropique » phasique et modulatrice.

C. Etude de l'activité en système acellulaire des ribosomes et du pH 5 enzyme provenant de rats thyroéoprives

Nous avons précédemment montré que l'absence d'hormones thyroïdiennes entraîne deux défauts : l'une qui intéresse le monosome, l'autre le pH 5 enzyme. Au cours de cette année, ont été effectués divers essais ayant pour but de mieux définir la nature des altérations et de localiser l'étape ou les étapes de la synthèse protéique qui sont défectueuses. C'est ainsi qu'il apparaît que le défaut du ribosome est dû à celui du pH 5 enzyme : des ribosomes normaux réincubés en présence de pH 5 enzyme anormal deviennent défectueux ; les deux défauts ne sont pas additifs, ce qui est logique si le facteur est unique. La conclusion est qu'il semble exister un inhibiteur soluble qui se fixe au ribosome et réduit sa capacité de former des liaisons peptidiques.

IV. - Mécanisme d'action mitochondrial des hormones thyroïdiennes

Le groupe de recherche dirigé par M. R. MICHEL, professeur d'Endocrinologie à la Faculté de Pharmacie, comprend : M^{me} O. MICHEL, maître-assistant au Collège de France, MM. J. BOUHNİK et J.P. ACCARY, et M^{lle} M. LUCAS, attachés de recherche à l'I.N.S.E.R.M., M. M. BAUDRY, M^{lle} C. DOMANGE, M. J.L. JUNIEN, M^{lle} V. MARTIN et D. MALET, M^{me} J. MELLET, M. J. PAIRAULT, M^{lle} B. RAOUL, M. J. TINÉ, chercheurs libres, M^{mes} E. MARQUE et M.J. ROMAN, techniciennes au C.N.R.S.

Action et métabolisme des hormones thyroïdiennes

Les recherches sur les effets des produits thyroïdiens sur les mitochondries isolées ont été poursuivies en se plaçant dans des conditions plus pro-

ches du fonctionnement cellulaire. Les travaux réalisés jusqu'ici ont été conduits dans des conditions expérimentales où les substrats, l'ADP et les hormones se trouvent en large excès ; on a entrepris des recherches en perfusant régulièrement l'ADP et l'effecteur. Dans ces conditions, les produits iodés possèdent une activité découplante prépondérante que traduit l'abaissement du pH sans modification décelable de la vitesse respiratoire des mitochondries.

On a étudié la vitesse de pénétration et le métabolisme des hormones thyroïdiennes lors de leur action sur les oxydophosphorylations. On a trouvé qu'il n'existe aucune relation entre les effets des iodothyronines et leur fixation par les mitochondries puisque la captation est indépendante de la température, de la nature des substrats oxydables et de l'état thermodynamique mitochondrial. De plus, les analyses radiochromatographiques n'ont pas permis de mettre en évidence les changements structuraux des phénols iodés ; ils agiraient donc sur les phosphorylations en tant qu'entités moléculaires.

Les recherches sur les mécanismes mitochondriaux ont été complétées par l'utilisation de divers effecteurs. Dans ce but, la synthèse de nouveaux dérivés guanidylés a été réalisée. Parmi ces composés, la 3,5-diiodo-4-hydroxyphényl-éthyl-guanidine est un inhibiteur puissant de la respiration avec des mitochondries fortement couplées. Diverses amidines alkylurées freinent également la vitesse d'oxydation des substrats respiratoires.

Action des hormones thyroïdiennes sur les mitochondries de la corticosurrénale

Les hormones thyroïdiennes influencent le fonctionnement de la chaîne normale respiratoire des mitochondries isolées de la corticosurrénale : elles stimulent la vitesse d'oxydation du succinate ou du malate lorsque les particules sont placées dans l'état 4, mais l'inhibent dans l'état 3. Ces effets sont semblables à ceux observés avec des mitochondries d'autres organes ; mais, alors que la L-thyroxine et le Ca^{++} provoquent le gonflement des mitochondries cardiaques de bœuf, ces produits ne modifient pas la morphologie des mitochondries de la corticosurrénale.

Les iodothyronines affectent la chaîne des transporteurs contenant le cytochrome P 450, elles ralentissent la vitesse de la consommation d'oxygène quand le milieu renferme de la désoxycorticostérone et diminuent simultanément la synthèse de la corticostérone. L'inhibition est de nature non compétitive avec l'ADP, mais compétitive avec la désoxycorticostérone. Les mesures de l'activité de l'enzyme malique, solubilisé après son isolement à partir des mitochondries de corticosurrénales bovines, montrent que pour des concentrations élevées de malate l'inhibition due à la 3,5,3'-L-triiodothyronine est de nature compétitive. L'action des hormones thyroïdiennes sur la synthèse

de corticostérone en présence de mitochondries isolées peut donc s'expliquer par une inhibition intervenant soit sur les transhydrogénases, soit surtout par leur intervention sur l'enzyme malique mitochondrial.

Activité respiratoire et biosynthèse mitochondriales chez des rats normaux et hypothyroïdiens

Les recherches effectuées sur l'action des iodothyronines sur les mitochondries isolées ont montré qu'elles affectaient de façon complexe les mécanismes des oxydophosphorylations. Mais, au cours de ces travaux, les phénols iodés ont été utilisés davantage comme réactifs qu'en tant qu'hormones. Cependant, on a observé que l'état thyroïdien retentissait sur les fonctions des particules d'origine hépatique. On a confirmé que les mitochondries isolées qui proviennent d'animaux hypothyroïdiens respirent plus faiblement que celles des animaux normaux. Mais, alors que le contrôle respiratoire reste sensiblement le même en présence de succinate quel que soit l'état thyroïdien, il est statistiquement plus élevé chez les hypothyroïdiens que chez les normaux, en présence de β -hydroxybutyrate comme substrat. Ces résultats mettent en évidence les propriétés physiologiques découplantes des hormones thyroïdiennes. L'interférence des iodothyronines se manifeste également sur la biosynthèse des protéines mitochondriales, lesquelles ont une vitesse de renouvellement nettement plus faible chez les sujets hypothyroïdiens que chez les normaux. Ces faits permettent de supposer que la baisse du métabolisme basal du rat hypothyroïdien résulterait d'un ralentissement dans le renouvellement de la mitochondrie elle-même, mais que l'effet découplant des hormones s'exercerait sur les particules quel que soit l'état thyroïdien.

NOMINATIONS, MISSIONS, CONFÉRENCES

M. Jean ROCHE a été nommé Délégué général du Ministre de l'Education nationale aux Relations universitaires internationales. Il a présidé une Table ronde sur les Aspects biochimiques de la Thérapeutique des Cancers à l'Université de Pavie (10-12 avril 1970), donné une conférence à un Symposium international sur l'Avenir des Sciences biologiques à Barcelone (29-30 mai 1970) et à une Table ronde du C.I.O.M.S. à Genève, dans le cadre de l'Organisation mondiale de la Santé (12-14 décembre 1969). Il a été nommé Membre étranger de l'Académie royale des Sciences de Suède et de l'Académie des Sciences et Lettres du Danemark, et Membre d'honneur de l'Académie des Sciences de Bulgarie, et Docteur honoris causa de l'Université de Bradford (Angleterre). Il a assumé la vice-présidence du VI^e Congrès international sur le Corps thyroïde à Vienne (22-26 juin 1970).

M^{lle} M.F. LANDON a participé au Study Group de Techniques de Biophysique à Groningen, Hollande (mai 1969).

M^{me} E. DER TERROSSIAN a participé au Colloque sur les Sequanators à Munich (avril 1969).

M. NGUYEN VAN THOAI, M^{mes} Y. ROBIN et A. OLOMUCKI, et M^{lle} L.A. PRADEL ont présenté des communications à la Réunion de Biochimie marine à Monaco et à Nice (décembre 1969).

M. R. MICHEL a été élu Membre résident à l'Académie de Pharmacie. Il a été rapporteur à la Réunion des Endocrinologues de langue française (Paris, septembre 1969). Il a participé au Meeting of the Biochemical Society : « Pharmacological Biochemistry Group Colloquium on Cytochrome P 450 » (Cardiff, septembre 1969).

PUBLICATIONS

E. DER TERROSSIAN, L.A. PRADEL, R. KASSAB et N.V. THOAI, *Comparative structural studies of the active site of ATP : guanidine phosphotransferases. The essential cysteine tryptic peptide of arginine kinase from Homarus vulgaris muscle (European J. Biochem., t. 11, 1969, p. 482).*

R. KASSAB, A. FATTOUM et L.A. PRADEL, *A functional tyrosyl residue in arginine kinase, studied by nitration with tetranitromethane (European J. Biochem., t. 12, 1970, p. 264).*

D. B. PHO, A. OLOMUCKI, Cl. HUC et N. V. THOAI, *Spectrophotometric studies of binary and ternary complexes of octopine dehydrogenase (Biochim. Biophys. Acta, t. 206, 1970, p. 46).*

F. REGNOUF, L.A. PRADEL, R. KASSAB et N.V. THOAI, *Structure carboxyl-terminale des ATP : L-arginine phosphotransférases de poids moléculaire 43.000 (Homarus vulgaris) et 86.000 (Sipunculus nudus) (Biochim. Biophys. Acta, t. 194, 1969, p. 540).*

P. HÉBRARD et M. OLOMUCKI, *Synthèse d'amines primaires à partir des halogénures correspondants à l'aide de la guanidine (Bull. Soc. Chim., 1970, p. 1938).*

M. OLOMUCKI et P. HÉBRARD, *Procédé pour l'obtention d'amines primaires (Brevet ANVAR, 1969, N° 1.579.561).*

C. CORRÈZE et J. NUNEZ, *Rôle des hormones thyroïdiennes dans l'activité du pH 5 enzyme en système acellulaire (Bull. Soc. Chim. Biol., t. 51, 1969, p. 909).*

J. NUNEZ, *Régulation de l'hormonogénèse thyroïdienne* (Comptes rendus des Journées de la Pitié, 1970, sous presse).

M. PAVLOVIC-HOURNAC, L. RAPPAPORT et J. NUNEZ, *Regulation of protein synthesis in the thyroid gland* (J. Europ. Biochem., sous presse).

A. TIXIER-VIDAL, R. PICART, L. RAPPAPORT et J. NUNEZ, *Ultrastructure et autoradiographie de cellules thyroïdiennes isolées incubées en présence de ¹²⁵I* (J. Ultrastr. Res., t. 28, 1969, p. 78).

J. BOUHNIC et O. MICHEL, *Effet du cortisol et de la 3,5,3'-L-triiodothyro-mine sur l'ARN-polymérase hépatique du rat thyroïdectomisé et surrénalec-tomisé* (Compt. Rend. Soc. Biol., t. 163, 1969, p. 1336).

R. MICHEL, J. BOUHNIC et O. MICHEL, *Effet des hormones thyroïdiennes sur la synthèse de la corticostérolone par les mitochondries corticosurréna-liennes* (Compt. Rend. Acad. Sc., t. 269, 1969, p. 244).

R. MICHEL, J. BOUHNIC et O. MICHEL, *Effects of thyroid hormones on oxidative phosphorylation and on 11 β - hydroxylation of oxadrenal cortex mitochondria* (Biochem. J., t. 115, 1969, p. 46P).

R. MICHEL, *Action des hormones thyroïdiennes sur les mécanismes d'oxy-dophosphorylation des mitochondries isolées* (Congrès des Endocrinologistes de Langue française, Annales d'Endocrinologie, 1969, p. 59).

R. MICHEL, *Aspects actuels de la biochimie thyroïdienne* (dans *La Thy-roïde*, L'Expansion scientifique française, Paris, 1969, p. 89).

R. MICHEL, *Hormones thyroïdiennes: Physiologie* (dans *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Glandes Endocrines: Glande Thyroïde*. Paris, 1970, p. 1).

R. MICHEL et M. BAUDRY, *Recherches sur les mécanismes des oxydations phosphorylantes et sur la biosynthèse des mitochondries hépatiques de rats normaux et hypothyroïdiens* (Compt. Rend. Soc. Biol., t. 163, 1969, p. 1328).

R. MICHEL et V. MARTIN, *Action de diverses amidino-alkylurées sur les oxydophosphorylations des mitochondries hépatiques de rat* (Compt. Rend. Soc. Biol., t. 163, 1969, p. 1332).

R. MICHEL, R. TRUCHOT et V. MARTIN, *Influence sur les oxydophospho-rylations des guanidines et biguanides dérivés de la 2-phényléthylamine, tyra-mine et 3,5-diiodotyramine* (Compt. Rend. Soc. Biol., t. 163, 1969, p. 1524).