

La voie d'action mitochondriale directe de la triiodothyronine : mythe ou réalité ?

Chantal Wrutniak
Gérard Cabello

La caractérisation des récepteurs nucléaires de la triiodothyronine (T3) en 1986, a fourni de précieux outils moléculaires pour l'étude de l'action génomique de cette hormone. Tout naturellement, la quasi-totalité des travaux concernant les mécanismes d'action de la T3 se sont focalisés sur cette action nucléaire. Néanmoins, plusieurs modes d'action intracellulaires de la triiodothyronine ont été proposés et font toujours l'objet d'une intense controverse. La voie d'action nucléaire de la T3 est-elle exclusive ? existe-t-il des voies d'action membranaire et mitochondriale de la T3 ? Nos données nouvelles, associées à une analyse objective des divers résultats expérimentaux permettent aujourd'hui d'apporter un éclairage nouveau sur la réalité de la voie d'action mitochondriale de la triiodothyronine.

La connaissance des mécanismes d'action de la triiodothyronine s'est initialement heurtée à la multiplicité des sites de liaison de cette hormone dans la cellule. En effet, parallèlement aux sites de liaison nucléaires de la T3, des sites de liaison membranaires, cytosoliques et mitochondriaux étaient mis en évidence. A l'heure actuelle, les récepteurs nucléaires de la T3 sont caractérisés, et l'étude précise de leurs mécanismes d'action au niveau moléculaire fait l'objet de très nombreux travaux. Par ailleurs, certains résultats expérimentaux suggèrent l'existence simultanée de voies d'action membranaire et mitochondriale de la T3. Dans cet article, nous passerons brièvement en

revue les connaissances concernant les récepteurs nucléaires de la triiodothyronine, l'hypothèse de la voie d'action membranaire, et nous insisterons tout particulièrement sur la voie mitochondriale qui a, sans aucun doute, fait l'objet de la controverse la plus intense.

Activité transcriptionnelle de la T3

En montrant que la T3 stimulait l'activité des ARN-polymérases I et II, les travaux de Tata *et al.* [1] apportaient les premières indications en faveur d'une voie d'action nucléaire de cette hormone. Par la suite, diverses équipes mettaient en évidence la présence de protéines nucléaires qui

ADRESSE

C. Wrutniak : chargée de recherche à l'Inra. G. Cabello : directeur de recherche à l'Inra. Inra, Laboratoire de différenciation cellulaire et croissance, Unité d'endocrinologie cellulaire, 2, place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

RÉFÉRENCES

1. Tata JR, Ernster L, Lindberg O, Arrhenius E, Pedersen S, Hedman R. The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem J* 1963; 86: 408-28.
2. Casanova J, Horowitz ZD, Copp RP, McIntyre WR, Pascual A, Samuels HH. Photoaffinity labelling of thyroid hormone nuclear receptors: influence of *n*-butyrate and analysis of the half-lives of the 47,000 and 57,000 molecular weight receptor forms. *J Biol Chem* 1984; 259: 12084-91.
3. Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM. The *c-erbA* gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 1986; 324: 641-6.
4. Sap J, Munoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H, Vennström B. The *c-ErbA* protein is a high affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 1986; 324: 242-4.
5. Yen PM, Darling DS, Carter RL, Forgione M, Umeda PK, Chin WW. Triiodothyronine (T3) decreases binding to DNA by T3-receptor homodimers but not receptor-auxiliary protein heterodimers. *J Biol Chem* 1992; 267: 3565-8.
6. Andersson ML, Nordström K, Demczuk S, Harbers M, Vennström B. Thyroid hormone alters the DNA binding properties of chicken thyroid hormone receptors α and β . *Nucl Acids Res* 1992; 20: 4803-10.
7. Forman BM, Samuels HH. Interaction among a subfamily of nuclear receptors: the regulatory zipper model. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 1293-301.
8. Lavau C, Jansen J, Weis K, Lamond A, Dejean A. Leucémie aiguë promyélocytaire et acide rétinoïque: le paradoxe. *médecine/sciences* 1994; 10: 817-24.
9. Bogazzi F, Hudson LD, Nikodem VM. A novel heterodimerization partner for thyroid hormone receptor. Peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 11683-6.
10. Desbois C, Aubert D, Legrand C, Pain B, Samarut J. A novel mechanism of action for *v-ErbA*: abrogation of the inactivation of the transcription factor AP-1 by retinoic and thyroid hormone receptors. *Cell* 1991; 67: 731-40.

fixaient la T3 avec une constante d'affinité de 10^9 M^{-1} . En outre, l'utilisation d'une technique de marquage par photoaffinité démontrait l'existence probable de plusieurs récepteurs [2]. Néanmoins, en l'absence de techniques qui permettraient d'atteindre un degré de purification suffisant, le séquençage des récepteurs natifs de la T3 n'a toujours pas été réalisé.

Curieusement, c'est à partir de l'identification de l'oncogène *v-erbA* présent dans le génome du virus de l'érythroblastose aviaire (AEV) que la caractérisation des récepteurs nucléaires de

la T3 a été réalisée (*m/s n° 3, vol. 3, p. 72*). Ainsi, en 1986, deux équipes démontraient simultanément que les produits de deux gènes *c-erbA*, homologues cellulaires de l'oncogène *v-erbA*, étaient des protéines à localisation nucléaire qui liaient la T3 avec la même affinité que les récepteurs natifs de cette hormone [3, 4]. Les travaux ultérieurs ont établi que le gène *c-erbA β* engendre, par épissage alternatif, deux messagers *c-erbA β 1* et *c-erbA β 2*, dont les produits diffèrent uniquement par leur extrémité NH2-terminale (*figure 1*). *C-erbA β 1* est exprimé de manière ubiquitaire alors

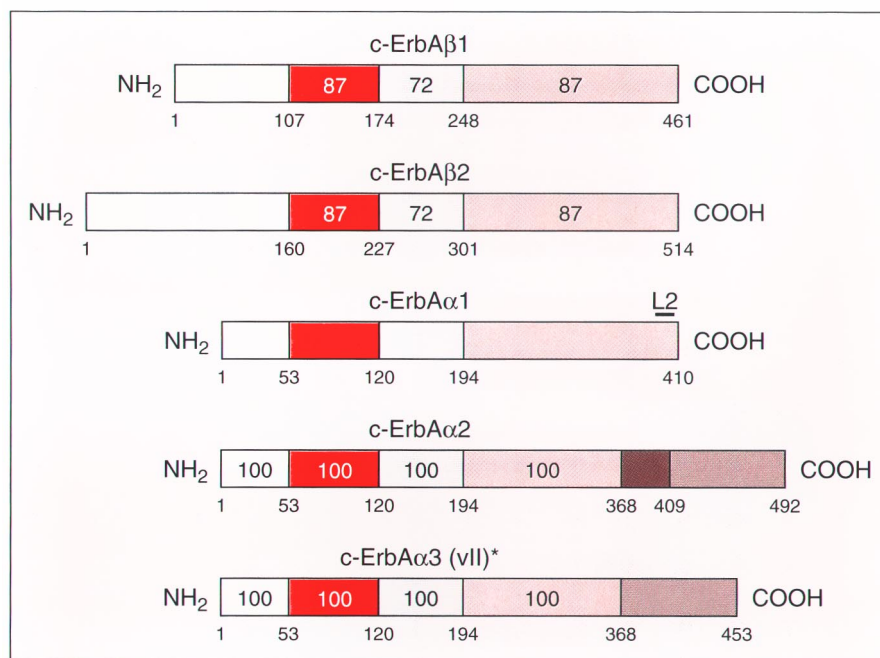


Figure 1. Comparaison des différentes protéines c-ErbA. Deux gènes différents ont été identifiés. Le gène *c-erbA β* produit deux messagers codant pour les récepteurs *c-ErbA β 1* et *c-ErbA β 2*. Le gène *c-erbA α* produit, chez certaines espèces, trois messagers codant pour le récepteur *c-ErbA α 1*, ainsi que pour les protéines *c-ErbA α 2* et *c-ErbA α 3* qui ne fixent pas la T3, en raison de l'absence d'une séquence d'acides aminés L2 importante pour la liaison hormonale. Les numéros des acides aminés figurent à la limite de chaque domaine fonctionnel. Les chiffres figurant à l'intérieur de chaque domaine fonctionnel représentent le pourcentage d'identité entre chaque domaine et le domaine correspondant de *c-ErbA α 1*. En absence de valeur, le pourcentage d'identité est inférieur à 15%. Le rectangle blanc représente le domaine NH2 terminal, qui comprend notamment un domaine de transactivation indépendante du ligand. Rectangle rouge: domaine de liaison à l'ADN. Rectangle gris: domaine charnière, comprenant notamment le signal de localisation nucléaire. Rectangle rose: domaine multifonctionnel, comprenant notamment les domaines de dimérisation et de liaison de la T3. Les séquences 409-492 (α 2) et 368-453 (α 3) sont identiques. *vII: variant II.

Tableau I
 QUELQUES EXEMPLES D'ÉLÉMENTS DE RÉPONSE A LA T3 (T3RE)
 IDENTIFIÉS SUR LES GÈNES CIBLES DE CETTE HORMONE

T3RE palindromique:	bGH	GGGACATGACCC
Répétition directe (DR4):	rαMHC rME	AGGTGAcaggAGGACA GGGTTAggggAGGACA
Palindromes inversés (IP)		
IP-6:	cLys F2 mMBP	TGACCCcagctgAGGTCA GGACCTcggctgAGAACA
IP-5:	hT3R β1	TGTCCTccttaAGGGCA
T3RE complexe:	rGH	AGGTAAgatcaGGACGTGACCG

Abréviations: bGH: GH bovine; rME: enzyme malique de Rat; cLys F2: gène du lysozyme de Poulet; mMBP: protéine basique de la myéline de souris; hT3Rβ1: c-ErbAβ1 humain; rGH: GH de Rat; DR4: répétitions directes espacées de 4 bases; IP6, IP5: palindromes inversés espacés de 6, de 5 bases.

RÉFÉRENCES

- Zhang XK, Wills KN, Husmann N, Hermann T, Pfahl M. Novel pathway for thyroid hormone receptor action through interaction with *jun* and *fos* oncogene activities. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 6016-25.
- Segal J. *In vivo* effect of 3,5,3'-triiodothyronine on calcium uptake in several tissues in the rat: evidence for a physiological role of calcium as the first messenger for the prompt action of thyroid hormone at the level of the plasma membrane. *Endocrinology* 1990; 126: 17-24.
- Sterling K, Brenner MA, Sakurada T. Rapid effect of triiodothyronine on the mitochondrial pathway in rat liver *in vivo*. *Science* 1980; 210: 340-3.
- Sterling K, Milch PO, Brenner MA, Lazarus JH. Thyroid hormone action: the mitochondrial pathway. *Science* 1977; 197: 996-9.
- Sterling K, Brenner MA. Thyroid hormone action: effect of triiodothyronine on mitochondrial adenine nucleotide translocase *in vivo* and *in vitro*. *Metabolism* 1995; 44: 193-9.
- Brown GC. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem J* 1992; 284: 1-13.
- Hafner RP, Nobes CD, McGown AD, Brand MD. Altered relationship between protonmotive force and respiration rate in non-phosphorylating liver mitochondria isolated from rats of different thyroid hormone status. *Eur J Biochem* 1988; 178: 511-8.
- Harper ME, Ballantyne JS, Leach M, Brand MD. Effects of thyroid hormones on oxidative phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 785-92.
- Gregory RB, Berry MN. The administration of triiodothyronine to rats results in a lowering of the mitochondrial membrane potential in isolated hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1133: 89-94.
- Horrum MA, Tobin RB, Ecklund RE. The early triiodothyronine-induced changes in stage IV respiration is not regulated by the proton permeability of the mitochondrial inner membrane. *Biochem Intern* 1992; 28: 813-21.

m/s n° 4, vol. 12, avril 96

que *c-erbAβ2* est essentiellement exprimé dans l'hypophyse. Le gène *c-erbAα* produit par épissage alternatif trois messagers dont les produits diffèrent par leur extrémité C-terminale (figure 1). Les formes α2, identifiée chez le Rat, la Souris ou l'Homme, et α3 (Rat, Souris) ne fixent pas la T3, en raison de l'absence d'une séquence d'acides aminés carboxyterminale indispensable à la liaison de l'hormone. On considère actuellement que la forme α2 pourrait être un antagoniste des récepteurs *c-ErbAα1* et β. En effet, elle se fixe sur les mêmes séquences nucléotidiques que celles reconnues par les récepteurs de la T3, avec toutefois une affinité moindre. D'autre part, elle n'a pas d'activité transcriptionnelle constitutive (*m/s n° 3, vol. 10, p. 357*).

Les récepteurs *c-ErbA* sont des facteurs de transcription activés par la T3, qui se fixent sous forme dimérique aux éléments de réponse spécifiques (T3RE) situés en amont des gènes cibles de la T3. En absence de ligand, ils répriment généralement la transcription. En présence de T3, après changement de conformation, ils activent fortement la transcription. Cependant, sur certains T3RE, *c-ErbA* activé par son ligand agit comme répresseur transcriptionnel. De tels éléments de réponse (T3RE négatifs) ont notamment été identifiés sur les gènes des sous-unités α et β de la TSH. Les T3RE sont des éléments spécifiques, composés de deux héli-sites (un pour chaque partenaire du complexe dimérique) dont la

séquence varie autour du motif consensus AGGTCA. Trois types de T3RE sont actuellement identifiés (Tableau I): les séquences palindromiques (AGGTCA TGACCT), les répétitions directes (AGGTCA nnnn AGGTCA où n représente un nucléotide quelconque) et les palindromes inversés (TGACCT nnnnnn AGGTCA). Des T3RE plus complexes, composés de séquences multiples ont également été identifiés, notamment sur le gène de l'hormone de croissance, GH.

Les récepteurs nucléaires de la T3 se lient généralement à l'ADN sous forme d'homodimères et d'hétérodimères. L'activité transcriptionnelle de l'homodimère est actuellement controversée, puisque certains travaux indiquent que la liaison à l'ADN de ce complexe est inhibée par la T3 [5, 6]. Les partenaires d'hétérodimerisation de *c-ErbA* appartiennent au groupe II de la superfamille des récepteurs nucléaires [7]: les récepteurs de l'acide rétinolique, de l'acide 9-*cis*-rétinolique (RXR, qui semblent constituer les partenaires majeurs), de la vitamine D3, et le récepteur PPAR* [8]. La formation d'hétérodimères avec un récepteur orphelin (COUP-TF) a également été proposée. Sans rentrer dans les détails, la formation de ces hétérodimères module l'activité transcriptionnelle de la T3 sur ses différents gènes cibles et

* Des travaux récents suggèrent que ce récepteur fixe un métabolite des prostaglandines.

RÉFÉRENCES

21. Brand MD, Steverding D, Kadenbach B, Stevenson PM, Hafner RP. The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones. *Eur J Biochem* 1992; 206: 775-81.
22. Paradies G, Ruggiero FM. Stimulation of phosphate transport in rat-liver mitochondria by thyroid hormones. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1019: 133-6.
23. Paradies G, Ruggiero FM. Decreased activity of pyruvate translocator and changes in the lipid composition in heart mitochondria from hypothyroid rats. *Arch Biochem Biophys* 1989; 269: 595-602.
24. Gross NJ. Control of mitochondrial turnover under the influence of thyroid hormone. *J Cell Biol* 1971; 48: 29-40.
25. Gadaleta MN, Barletta A, Galdarazzo M, De Leo T, Saccone C. Triiodothyronine action on RNA synthesis in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* 1972; 30: 376-81.
26. Mutvei A, Kuzela S, Nelson BD. Control of mitochondrial transcription by thyroid hormone. *Eur J Biochem* 1989; 180: 235-40.
27. Gartska HL, Fäcke M, Escibano JR, Wiesner RJ. Stoichiometry of mitochondrial transcripts and regulation of gene expression by mitochondrial transcription factor A. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 619-26.
28. Fisher RP, Clayton DA. Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 3496-509.
29. Martino G, Covello C, De Giovanni R, Filipelli R, Pitrelli G. Direct *in vitro* action of thyroid hormones on mitochondrial RNA-polymerase. *Molec Biol Rep* 1986; 11: 205-11.
30. Izquierdo JM, Cuezva JM. Thyroid hormones promote transcriptional activation of the nuclear gene coding for mitochondrial β -F1-ATPase in rat liver. *FEBS Lett* 1993; 323: 109-12.

peut, dans certains cas, modifier la nature des gènes activés par cette hormone [9].

Par ailleurs, en dehors de leur activité transcriptionnelle directe, les récepteurs de la T3 c-ErbA activés par leur ligand partagent avec d'autres récepteurs la propriété de réprimer l'activité AP-1 [10, 11]. Comme le maintien d'une activité AP-1 élevée inhibe la différenciation de différents types cellulaires, une telle activité des récepteurs de la T3 est probablement impliquée dans la régulation de la différenciation cellulaire par cette hormone.

Existe-t-il une voie d'action membranaire de la triiodothyronine ?

De nombreux travaux réalisés sur organe isolé-perfusé ou sur cultures cellulaires, ont mis en évidence une stimulation du captage d'acides aminés neutres, d'AIB (acide α amino-isobutyrique) ou de 2-désoxyglucose par la T3. Cet effet très rapide (temps de latence inférieur à 2 minutes) est insensible aux inhibiteurs de la synthèse protéique, ce qui exclut l'implication des récepteurs nucléaires de cette hormone.

Les travaux les plus récents de Segal [12] ont précisé les événements qui précèdent la stimulation du captage de 2-désoxyglucose. L'effet le plus rapide observé après administration de T3 est l'activation du flux calcique entrant détectable en moins de 45 secondes; une stimulation de l'adénylyl cyclase et une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc lui succèdent, phénomènes perceptibles en moins de 2 minutes. Cet ensemble de données suggère donc que la T3 active rapidement l'entrée du 2-désoxyglucose *via* la voie des seconds messagers que constituent l'AMPc et le calcium.

Ces résultats sont difficilement explicables par une action de la T3 relayée par ses récepteurs nucléaires. L'existence d'une voie d'action membranaire de cette hormone a donc été proposée. Cependant, en l'absence de caractérisation d'un récepteur membranaire de la T3, une telle possibilité reste à confirmer.

La triiodothyronine stimule l'activité mitochondriale

L'analyse de l'ensemble des travaux réalisés sur ce sujet indique que les hormones thyroïdiennes exercent plusieurs types d'action au niveau des mitochondries: les actions «immédiates», apparentes en quelques minutes; les actions rapides décelables en quelques heures; les actions à long terme, détectables après un délai supérieur ou égal à 24 heures.

Nous aborderons tout d'abord les effets mitochondriaux «immédiats» des hormones thyroïdiennes. De nombreux travaux entrepris en particulier par Sterling [13, 14] montrent que ces hormones activent la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP. Cette action est insensible aux inhibiteurs de la synthèse protéique nucléaire ou mitochondriale. Elle est, de plus, observée après un temps de latence extrêmement bref: 15 minutes *in vivo* et moins de 2 minutes sur mitochondries isolées. De même, une activation de la translocase mitochondriale, qui joue un rôle clé dans l'exportation de l'ATP synthétisé par les mitochondries, est détectable moins de 15 minutes après administration de T3 [15]. Hormis leur rapidité, ces actions possèdent donc deux caractéristiques: elles surviennent sur mitochondries isolées, et elles ne sont pas influencées par les inhibiteurs de la synthèse protéique. Cela permet d'écarter *a priori* l'intervention des facteurs de transcription que constituent les récepteurs nucléaires de la T3. Ces éléments constituent donc des arguments forts en faveur d'une action extragénomique de cette hormone impliquée dans la stimulation à court terme de l'activité mitochondriale.

Selon Brown *et al.* [16], la fuite des protons à travers la membrane interne mitochondriale représenterait plus de 20% du contrôle multifactoriel de l'activité mitochondriale. Or, les études réalisées sur mitochondries isolées au stade respiratoire IV* [17, 18] ou sur hépatocytes isolés [19], indiquent que ces hormones

* La fuite de protons des mitochondries, incubées en l'absence d'ADP, exerce un contrôle important sur la respiration mitochondriale.

abaissent le potentiel de membrane mitochondrial en augmentant la perméabilité de la membrane interne aux protons. Cette influence, insensible à l'actinomycine D, est détectable en quelques heures [20]. Elle peut donc être classée dans les effets mitochondriaux « rapides » de la T3. Une telle action des hormones thyroïdiennes est actuellement mieux comprise. En effet, la T3 augmente la surface de la membrane interne et, par conséquent, la fuite passive des protons [21]. En outre, elle induit une modification de la composition des phospholipides membranaires qui augmente la perméabilité de la membrane interne aux protons [21]. Cette modification affecte la teneur en cardiolipine de la membrane interne, phospholipide spécifique de la mitochondrie. Sa concentration est, en effet, réduite par l'hypothyroïdie et accrue par l'hyperthyroïdie [22, 23]. Selon les mêmes travaux, la teneur en cardiolipine de la membrane interne modifie l'activité de nombreuses enzymes ou transporteurs mitochondriaux. Un tel mécanisme pourrait donc être également à l'origine de la stimulation par les hormones thyroïdiennes de la respiration mitochondriale observée sur organites isolés au stade III* de la respiration [18]. En effet, les activités de l'ATP synthase et/ou de la translocase, qui contribuent toutes deux à dissiper le potentiel de membrane, ont été impliquées dans cette action [18]. Ainsi, l'influence « rapide » de la T3 sur la consommation d'oxygène pourrait s'exercer essentiellement sur les processus dissipateurs du potentiel de membrane mitochondrial, en induisant des modifications de la membrane interne.

Enfin, depuis les travaux initiaux de Gross [24], il est bien établi que l'une des actions les plus caractéristiques de la T3 consiste à stimuler la mitochondriogenèse. Cette action à long terme, décelable après un délai supérieur à 24 heures, implique à la fois la stimulation de l'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines à localisation mitochondriale, et la stimulation de l'expres-

sion du génome mitochondrial. Les données rapportées dans les paragraphes suivants permettent de mieux comprendre l'action de la T3 sur l'expression de ces deux génomes.

La triiodothyronine active la transcription du génome mitochondrial

Bien que les messagers ribosomiques 12S et 16S ne soient pas clairement influencés, de très nombreux travaux montrent que les hormones thyroïdiennes élèvent de manière coordonnée l'abondance de tous les ARNm mitochondriaux, conséquence directe de l'activation de la transcription du génome mitochondrial [25, 26]. Ces résultats sont en accord avec la mise en évidence d'une régulation positive par la triiodothyronine de l'abondance du messenger mtTFA, produit d'un gène nucléaire [27]. En effet, mtTFA est un facteur de transcription du génome mitochondrial importé dans l'organite [28]. Ainsi, la T3 peut contrôler, *via* ses récepteurs nucléaires, la synthèse d'une protéine codée par le génome nucléaire capable d'induire l'expression du génome mitochondrial. L'influence de la triiodothyronine sur la biogenèse mitochondriale est donc considérée par certains auteurs comme une action indirecte, commencée au niveau nucléaire. Cependant, la mise en évidence d'un effet de la T3 sur la transcription du génome mitochondrial détectable en moins de 5 minutes, notamment sur mitochondries isolées [29], n'est pas en accord avec l'hypothèse d'une voie d'action indirecte exclusive de cette hormone par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires c-ErbA. Une telle observation posait donc la question de l'existence d'un récepteur mitochondrial de la T3, facteur de transcription du génome mitochondrial activé par cette hormone.

Multiplicité des mécanismes d'action de la T3 au niveau mitochondrial

Pour certains auteurs l'influence des hormones thyroïdiennes sur l'activité mitochondriale prendrait essentiellement sa source au niveau nucléaire.

Une telle hypothèse est en accord avec l'observation selon laquelle la sous-unité β -F1 de l'ATP synthase est le produit d'un gène nucléaire qui est sous contrôle transcriptionnel direct de la T3 [30]. De même, bien qu'un contrôle transcriptionnel direct n'ait pas été clairement mis en évidence, le niveau d'équilibre de l'ARNm du cytochrome c1, produit d'un gène nucléaire, est également augmenté par la T3 [31]. Enfin, cette hypothèse est confortée par l'observation précédemment rapportée concernant le contrôle de l'état d'équilibre du messenger mtTFA par la T3 [27]. Cependant, l'idée de l'exclusivité d'un tel mécanisme n'est pas acceptable puisqu'il peut être *a priori* écarté dans la plupart des actions rapides de la T3. En effet, comme nous l'avons signalé précédemment, la brièveté du temps de latence de l'hormone, associée à l'insensibilité de ce type d'action aux inhibiteurs de la synthèse protéique, n'est pas en accord avec une telle hypothèse. En outre, le fait qu'en règle générale la T3 influence peu l'abondance des protéines mitochondriales codées par des gènes nucléaires [32, 33] ne constitue pas un argument en faveur d'une voie d'action nucléaire exclusive de la T3. Ces données démontrent donc l'implication d'autres mécanismes d'action dans l'influence mitochondriale de la T3.

Certains effets mitochondriaux de la T3 sont comparables à ceux d'autres hormones induisant une augmentation du flux calcique entrant dans la cellule [22]. Cette observation a fait naître l'hypothèse d'une implication de la voie calcique dans l'influence de la T3 sur l'organite [34]. En effet, les travaux de Segal [12] précédemment mentionnés, indiquent que la T3 induit très rapidement une stimulation de l'entrée de calcium. Or, certains paramètres mitochondriaux, notamment l'activité des déshydrogénases, sont stimulés par Ca^{2+} . Un tel mécanisme pourrait donc expliquer de manière satisfaisante les effets mitochondriaux rapides de la T3. Cette hypothèse suppose, cependant, que l'augmentation du flux calcique entrant induit par la T3 se traduise nécessairement par une élévation du *pool* de calcium mitochondrial. Cela n'est précisément pas en accord avec les travaux de Murphy [35]. En effet,

* Sur ces mitochondries incubées en présence de substrat et d'ADP qui phosphorylent ce dernier en ATP, la fuite des protons n'influence pas significativement la respiration mitochondriale.

RÉFÉRENCES

31. Joste V, Goitom Z, Nelson BD. Thyroid hormone regulation of nuclear-encoded mitochondrial inner membrane polypeptides of the liver. *Eur J Biochem* 1989; 184: 255-60.
32. Nelson BD, Mutvei A, Joste V, Wielburski A, Kuzela S. *66th Nobel symposium, Membrane proteins: structure, function, assembly*. Cambridge: Cambridge University Press, 1987: 239.
33. Van Itallie CM. Thyroid hormone and dexamethasone increase the levels of a messenger ribonucleic acid for a mitochondrial encoded subunit but not for a nuclear-encoded subunit of cytochrome c oxidase. *Endocrinology* 1990; 127: 55-62.
34. Soboll S. Long-term and short-term changes in mitochondrial parameters by thyroid hormones. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 799-803.
35. Murphy MP. Calcium uptake by liver mitochondria from hypothyroid rats is inhibited *in vitro* by triiodothyronine. *Biochem Intern* 1992; 27: 1019-26.
36. Thomas WE, Crespo-Armas A, Mowbray J. The influence of nanomolar calcium ions and physiological levels of thyroid hormone on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. A possible signal amplification control mechanism. *Biochem J* 1987; 247: 315-20.
37. Hardy DL, Mowbray J. The rapid response of isolated mitochondrial particles to 0.1 nM-tri-iodothyronine correlates with the ADP-ribosylation of a single inner-membrane protein. *Biochem J* 1992; 283: 849-54.
38. Thomas WE, Mowbray J. Evidence for ADP-ribosylation in the mechanism of rapid thyroid hormone control of mitochondria. *FEBS Lett* 1987; 223: 279-83.
39. Sterling K, Campbell GA, Taliadouros GS, Nunez EA. Mitochondrial binding of triiodothyronine (T3). Demonstration by electron microscopic radioautography of dispersed liver cells. *Cell Tissue Res* 1984; 236: 321-5.

selon cet auteur, la T3 induit une diminution du captage de Ca^{2+} par l'organite, corrélée à la diminution du potentiel de membrane précédemment rapportée. Néanmoins, quelle que soit son importance précise, Ca^{2+} amplifie le signal hormonal au niveau de l'organite, puisque sa présence à la concentration de 25 nM dans le milieu de survie des mitochondries isolées permet de déceler des actions rapides de la T3 pour des concentrations hormonales aussi faibles que 10^{-13} M [36].

Une autre voie d'action, dont la signification physiologique reste à démontrer, a été proposée par Hardy et Mowbray [37]. Selon ces auteurs, la T3 induirait l'ADP-ribosylation d'une protéine de la membrane interne de 11 kDa, corrélée à l'augmentation de la respiration mitochondriale. En outre, l'utilisation d'un inhibiteur de l'ADP-ribosylation bloque l'influence précoce de la T3 sur l'organite [38]. Enfin, l'existence d'un récepteur mitochondrial de la T3, qui fait l'objet d'une controverse majeure, a été proposée sur la base des éléments expérimentaux suivants: en 1984, Sterling *et al.* [39] mettaient en évidence un captage rapide et quantitativement important de T3 par les

mitochondries; paradoxalement, alors que seule la voie d'action nucléaire de la T3 était admise, ces organites constituaient un compartiment majeur d'accumulation de cette hormone. En outre, malgré la publication de résultats négatifs sur lesquels les partisans de l'action nucléaire de la T3 s'appuient exclusivement, trois équipes différentes ont mis en évidence la présence de sites de liaison spécifiques dans l'organite, localisés notamment sur la membrane interne [40-42]. La difficulté de mettre en évidence de tels sites dans une structure cellulaire particulièrement riche en liaisons non spécifiques est de nature à expliquer en partie les résultats négatifs rapportés par ailleurs. En outre, Goglia *et al.* [43] ont montré *in vitro* que les diiodothyronines (3,3'-T2 et 3,5-T2), dérivés physiologiques de la T3 obtenus par désiodation, se lient à la cytochrome-oxydase purifiée, modifient sa conformation, et activent cette enzyme de la membrane interne. Si un tel mécanisme est fonctionnel *in vivo*, ce qui reste à établir, la cytochrome-oxydase pourrait, d'une certaine manière, être considérée comme un véritable récepteur des iodothyronines.

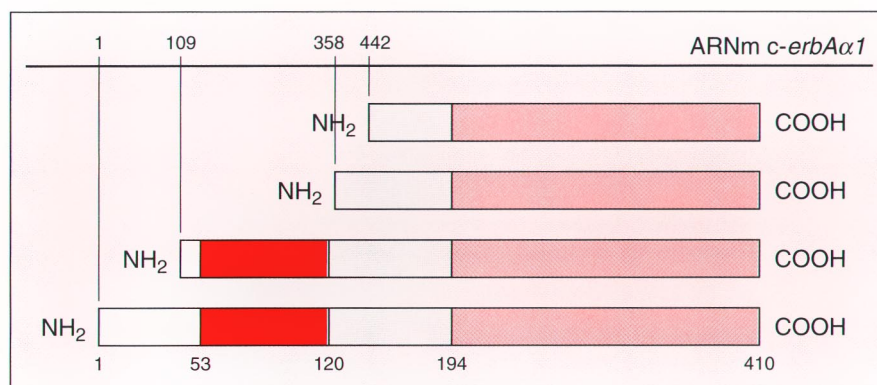


Figure 2. **Les protéines c-ErbA tronquées sont synthétisées à partir de sites internes de démarrage de la traduction du message c-erbA α 1.** Selon Bigler *et al.* [46], l'utilisation du premier codon AUG permet la synthèse du récepteur nucléaire de la T3. La p43 serait synthétisée par utilisation du second AUG (nucléotide n° 109). La construction utilisée pour surexprimer cette protéine a été obtenue en délétant le premier codon d'initiation sur un ADNc permettant l'expression du récepteur nucléaire c-ErbA α 1 [46]. Les protéines c-ErbA les plus courtes sont synthétisées par l'utilisation de deux autres AUG situés plus en aval (nucléotides n° 358 et 442).

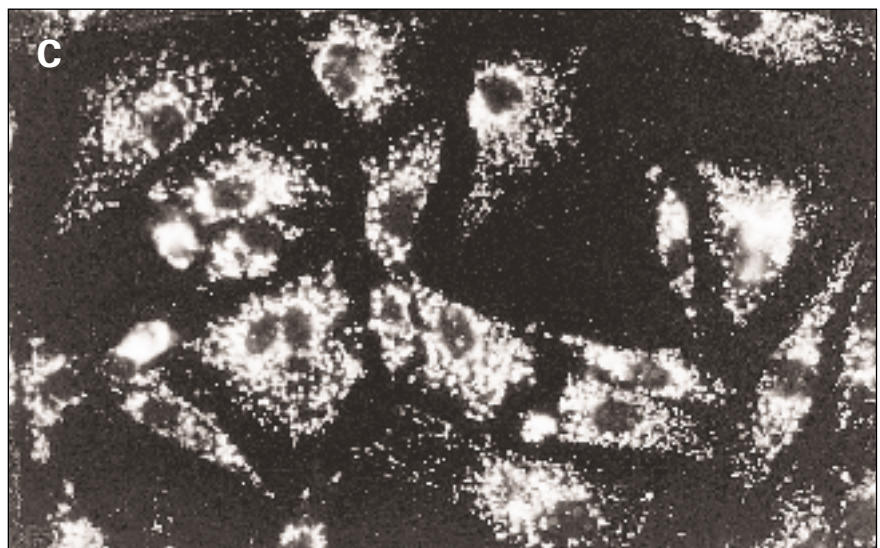
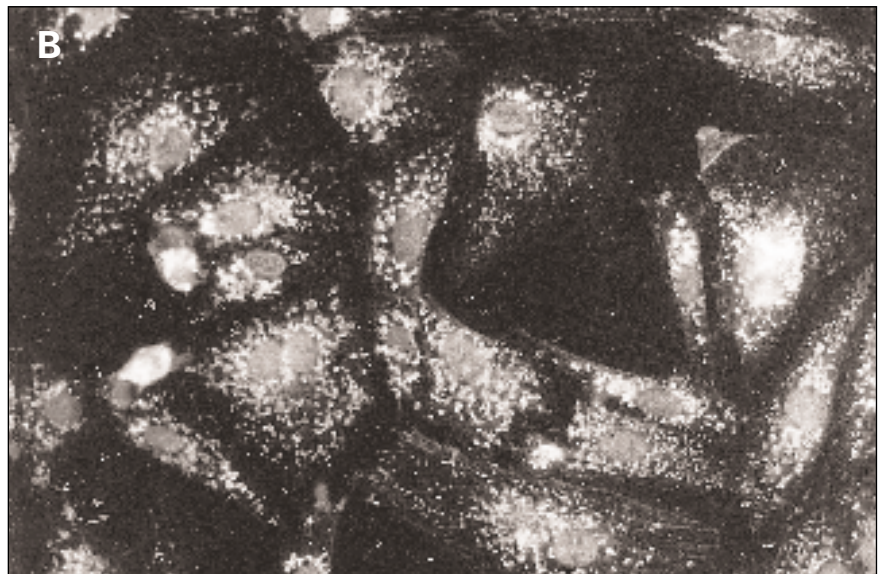
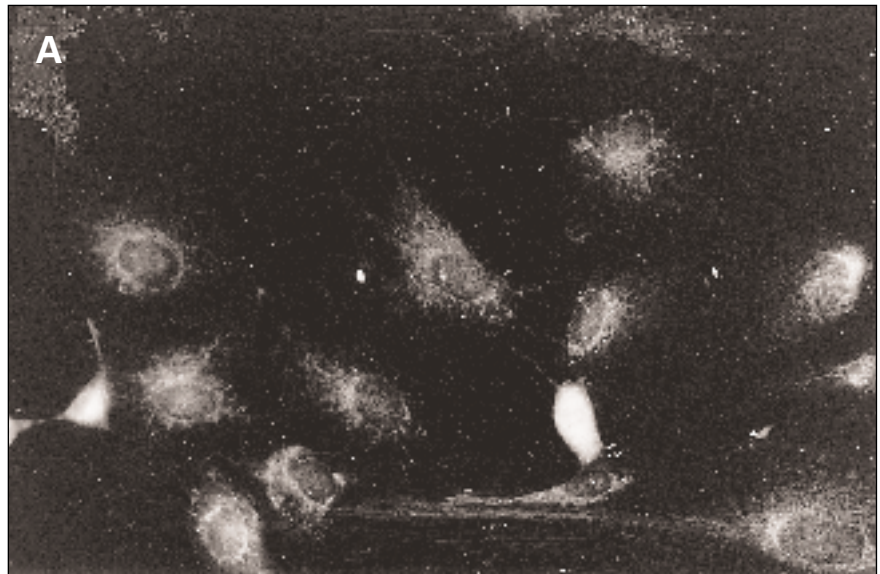


Figure 3. **L'expression d'une protéine c-ErbA α 1 tronquée (environ 43 kDa) dans les cellules CV1 démontre sa localisation mitochondriale.** **A.** Marquage de cellules CV1 (cellules de rein de singe) témoins (transfectées avec le vecteur vide) avec un anticorps obtenu contre le domaine de liaison hormonal de c-ErbA (détection avec un second anticorps marqué à la fluorescéine). **B.** Marquage des cellules CV1 surexprimant la p43 avec un anticorps obtenu contre le domaine de liaison hormonal de c-ErbA (détection avec un second anticorps marqué à la fluorescéine). **C.** Marquage des mitochondries des cellules CV1 surexprimant la p43 par un anticorps obtenu contre un antigène mitochondrial (détection avec un second anticorps marqué à la rhodamine). La comparaison des images B et C démontre une parfaite colocalisation des deux marquages (document reproduit avec l'autorisation de l'éditeur de J Biol Chem).

Une protéine c-ErbA α 1 est localisée dans la matrice mitochondriale [44]

L'existence éventuelle d'un récepteur mitochondrial de la T3, possible facteur de transcription du génome mitochondrial, nous a conduits à tenter de caractériser ce dernier par plusieurs approches complémentaires. Une technique de marquage par photo-affinité (PAL-T3), identique à celle qui a permis de mettre en évidence la multiplicité des récepteurs nucléaires de la T3 [2], a été utilisée sur des préparations de mitochondries de foie de rat très purifiées. Deux protéines liant spécifiquement la PAL-T3 dans l'organite ont été mises en évidence : une protéine de 28 kDa située sur la membrane interne de la mitochondrie, dont le poids moléculaire et la localisation correspondaient aux don-

nées précédemment rapportées par Sterling *et al.* [14], et une protéine de 43 kDa située dans la matrice mitochondriale.

Les travaux initiaux concernant la caractérisation du récepteur nucléaire de la T3 c-ErbA α 1 [4] indiquaient que la transfection d'un ADNc permettant la synthèse de ce récepteur (MM 46 kDa) dans les fibroblastes aviaires induisait également la présence minoritaire d'une protéine c-Erba de plus petit poids moléculaire (environ 40 kDa). Par ailleurs, les travaux de Bigler et Eisenman [45] montraient la présence de plusieurs formes de protéines c-ErbA α 1 tronquées dans les cellules aviaires. Certaines d'entre elles avaient, en outre, une localisation extranucléaire. Ces données nous ont donc incités à rechercher une éventuelle parenté entre les protéines mitochondriales liant la T3 et les récepteurs nu-

cléaires de cette hormone. L'utilisation de deux anticorps dirigés contre des séquences différentes du domaine de liaison hormonal de c-Erba nous a permis de mettre en évidence la présence d'une protéine de 43 kDa dans la matrice mitochondriale, immunologiquement reliée à c-ErbA α 1. L'utilisation de la technique de gel retard a, par ailleurs, permis de montrer que cette protéine se liait spécifiquement aux éléments de réponse des récepteurs nucléaires de la T3 (T3RE). Enfin, après marquage des protéines mitochondriales par la PAL-T3 radioactive, il était possible d'immunoprécipiter une protéine de 43 kDa liée à la PAL-T3 à l'aide de l'un des anticorps précédemment utilisés. Ces résultats établissaient donc l'existence, dans la matrice mitochondriale, d'une protéine c-ErbA α 1 qui fixe la T3 et qui possède le domaine de liaison hormonal et le do-

Tableau II

CLASSIFICATION DES EFFETS DE LA T3 AU NIVEAU MITOCHONDRIAL ET MÉCANISMES D'ACTION PROPOSÉS

Actions immédiates	
Temps de latence : quelques minutes	
• Activation de la respiration mitochondriale [13, 14]	1, 2
• Activation de la synthèse d'ATP [13, 14]	1, 2
• Activation de la translocase [15]	1, 2
Mécanismes proposés :	
• Augmentation du <i>pool</i> de calcium mitochondrial [1, 34, 36]	3, 1
• ADP-ribosylation d'une protéine de la membrane interne [37, 38]	1
• Modification allostérique d'une enzyme de la membrane interne [43]	4
Actions rapides	
Temps de latence : quelques heures	
• Modification de la composition lipidique de la membrane interne induisant :	
– Une augmentation de la fuite des protons [19, 21]	1, 2, 5
– Une stimulation de l'activité de plusieurs enzymes et transporteurs mitochondriaux [22, 23]	1
• Activation rapide de l'expression du génome mitochondrial [29]	2
Mécanismes proposés	
• Effet extramitochondrial :	
– Modification du métabolisme lipidique de la cellule [24, 25]	
• Effet intramitochondrial :	
– Intervention du récepteur mitochondrial de la T3 [44]	
Actions à long terme	
Temps de latence : supérieur à 24 heures	
• Biogenèse mitochondriale [24]	1
Mécanismes proposés :	
• Expression coordonnée des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales et des gènes mitochondriaux.	
• Implication des récepteurs nucléaires et mitochondriaux de la T3 [28, 44]	

Le type d'expérimentation réalisée est précisé dans la colonne de droite du tableau :

1: Traitement effectué in vivo. Mesures effectuées sur mitochondries isolées.

2: Expérimentation totalement réalisée sur mitochondries isolées.

3: Observations indirectes.

4: Interactions avec l'enzyme purifiée.

5: Hépatocytes isolés.

RÉFÉRENCES

40. Sterling K, Milch PO. Thyroid hormone binding by a component of mitochondrial membrane. *Proc Nat Acad Sci USA* 1975; 72: 3225-9.
41. Goglia F, Torresani J, Bugli P, Barletta A, Liverini G. *In vitro* binding of triiodothyronine to rat liver mitochondria. *Pflügers Arch* 1981; 390: 120-4.
42. Hashizume K, Ichikawa K. Localization of 3,5,3'-triiodothyronine receptor in rat mitochondrial membrane. *Biochem Biophys Res Comm* 1982; 106: 920-6.
43. Goglia F, Lanni A, Barth J, Kadenbach B. Interaction of diiodothyronines with isolated cytochrome c oxidase. *FEBS Letters* 1994; 346: 295-8.
44. Wrutniak C, Cassar-Malek I, Marchal S, Rasle A, Heusser S, Keller JM, Fléchon J, Dauca M, Samarut J, Ghysdael J, Cabello G. A 43-kDa Protein related to c-ErbA α 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *J Biol Chem* 1995; 270: 16347-54.
45. Bigler J, Eisenman RN. *c-erbA* encodes multiple proteins in chicken erythroid cells. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 4155-61.
46. Bigler J, Hokanson W, Eisenman RN. Thyroid hormone receptor transcriptional activity is potentially autoregulated by truncated forms of the receptor. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 2406-17.
47. Van Den Bogert C, Spelbrink JN, Dekker HL. Relationship between culture conditions and the dependency on mitochondrial function of mammalian cell proliferation. *J Cell Physiol* 1992; 152: 632-8.
48. Kaneko T, Watanabe T, Oishi M. Effect of mitochondrial protein synthesis inhibitors on erythroid differentiation of mouse erythroleukemia (Friend) cells. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 3311-5.
49. Vayssière JL, Cordeau-Lossouarn L, Larcher JC, Basseville M, Gros F, Croizat B. Participation of the mitochondrial genome in the differentiation of neuroblastoma cells. *In vitro Cell Dev Biol* 1992; 28A: 763-72.
50. Korohoda W, Pietrzowski Z, Reiss K. Chloramphenicol, an inhibitor of mitochondrial protein synthesis inhibits myoblast fusion and myotube differentiation. *Folia Histochem Cytobiol* 1993; 31: 9-13.

maine de liaison à l'ADN du récepteur nucléaire de cette hormone (p43). Nous avons, par ailleurs, identifié plusieurs T3RE présomptifs dans le génome mitochondrial de rat, notamment localisés dans la *D-loop*, région qui comprend les promoteurs de ce génome. La mise en évidence d'une liaison spécifique de la p43 sur au moins l'une de ces séquences, nous conduit actuellement à tester l'hypothèse selon laquelle cette protéine constituerait un facteur de transcription mitochondrial dépendant de l'hormone.

L'importance physiologique d'un tel récepteur a été abordée de deux manières. L'étude de l'expression tissulaire spécifique de la p43 s'est avérée riche d'enseignements. D'une part, l'abondance intramitochondriale de cette protéine est corrélée positivement à la richesse en organites des divers tissus testés. En particulier, la p43 est présente en très grande quantité dans les mitochondries de tissu adipeux brun. Cela suggère donc une implication de ce récepteur dans la régulation de la mitochondriogenèse, processus contrôlé par la T3. D'autre part, la p43 est indétectable dans les mitochondries de cerveau de rat adulte, tissu insensible à l'action calorigène des hormones thyroïdiennes, ce qui suggère une implication du récepteur mitochondrial dans cette action thermogénique. Ces résultats ont été complétés par l'étude de l'influence de la surexpression d'une protéine *c-ErbA α 1* tronquée d'une masse molaire voisine de 43 kDa. Selon Bigler *et al.* [46], les protéines *c-ErbA* tronquées, précédemment identifiées par ces auteurs, sont synthétisées à partir du messenger codant pour le récepteur nucléaire *c-ErbA α 1*, par utilisation de sites de démarrage interne de la traduction (figure 2). Une construction réalisée par ces auteurs, obtenue par délétion du site initial de démarrage de la traduction, permet la synthèse d'une protéine majoritaire d'une masse molaire voisine de 43 kDa. Nous montrons que cette protéine est ciblée dans la mitochondrie (figure 3). En outre, sa surexpression induit une forte stimulation de l'activité mitochondriale estimée par le captage de rhodamine 123 et l'activité cytochrome-oxydase, démontrant l'implication de ce récepteur dans la régulation de l'activité mitochondriale.

Ces résultats établissent ainsi sans ambiguïté l'existence d'une voie d'action mitochondriale directe de la T3. Cependant, ils ne démontrent en aucun cas que tous les effets de la T3 sur l'organite sont relayés par ce récepteur, comme nous le signalons dans la conclusion de cet article. Il reste néanmoins à comprendre les processus à l'origine du ciblage vers la mitochondrie d'une protéine possédant un signal de localisation nucléaire. De même, l'absence du récepteur *c-ErbA β* dans l'organite attire notre attention, d'autant plus qu'elle fait apparaître pour la première fois une réelle différence fonctionnelle entre la forme α 1 et les formes β .

Conclusions

Les données rapportées dans cette revue démontrent la complexité des mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes. En effet, parallèlement aux mécanismes relayés par les récepteurs nucléaires *c-ErbA*, une voie d'action incluant une augmentation de l'entrée de calcium dans la cellule, et une activation de l'adénylyl cyclase a été proposée. En outre, les mitochondries constituent la cible d'une activité particulièrement complexe de la T3. Contrairement aux données générales de la littérature, il nous paraît raisonnable de présenter non pas deux, mais trois types d'action de la T3 sur ces organites (Tableau II). Les actions très rapides, détectables en quelques minutes, généralement insensibles aux inhibiteurs de la synthèse protéique, s'exercent probablement au niveau de l'organite, *via* des modifications éventuelles du flux calcique entrant, la possible ADP-ribosylation d'une protéine qui reste à caractériser, ou des modifications allostériques de certaines enzymes de la membrane interne conduisant à leur activation (interactions possibles diiodothyronines-cytochrome oxydase). Les actions rapides, détectables en quelques heures, sont probablement de nature plus complexe, avec deux composantes: une composante extramitochondriale, impliquant notamment les modifications du métabolisme lipidique à l'origine d'une altération de la composition de la membrane interne mitochondriale,

avec ses conséquences sur la dissipation du potentiel de membrane et sur l'activité de divers transporteurs; une composante intramitochondriale qui comprendrait une activation précoce de l'expression du génome de l'organite et qui pourrait être induite par la protéine c-ErbA mitochondriale de 43 kDa. Enfin, les actions à plus long terme, détectables après plus de 24 heures, qui se traduisent par une activation de la mitochondriogenèse, comprendraient, à la fois l'activation relayée par les récepteurs nucléaires de la T3 de certains gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales, et une augmentation de l'expression du génome mitochondrial, induite par mtTFA (codé par un gène nucléaire) et, peut-être, par le récepteur mitochondrial de la T3. Les effets des hormones thyroïdiennes sont particulièrement diversifiés. Ces hormones sont, en effet, im-

pliquées dans la régulation des métabolismes glucidique, protidique et lipidique, et elles interviennent dans les processus de thermorégulation et de thermoadaptation. En outre, elles exercent une influence importante sur le développement et sur la différenciation de nombreux types cellulaires. Il est tentant de proposer que ces derniers effets, associés à l'induction ou à la stimulation de l'expression de gènes spécifiques de tissu, sont exclusivement induits par les récepteurs nucléaires de la T3. De même, les activités extranucléaires des hormones thyroïdiennes pourraient être essentiellement impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique. Cependant, un nombre croissant de travaux soulignent l'importance de l'activité mitochondriale pour la prolifération [47] et la différenciation cellulaires [48-50]. Ces éléments permettent de pen-

ser qu'une interaction permanente entre les diverses voies d'action de la T3 interviendrait dans la majorité des effets généraux de cette hormone. Dans ces conditions, il serait intéressant d'évaluer l'importance réelle des effets mitochondriaux de la T3 ■

Remerciements

Outre le financement de l'Inra, les travaux réalisés au laboratoire sur ce sujet ont bénéficié du soutien financier de l'Association française contre les myopathies (AFM). Les auteurs remercient également leurs collègues de Jouyen-Josas, Lyon, Orsay et Nancy ainsi que les membres du laboratoire qui ont participé à ce travail.

TIRÉS À PART

C. Wrutniak.

Summary

The direct triiodothyronine mitochondrial pathway: myth or reality?

Besides the well established triiodothyronine (T3) nuclear pathway, direct influences of this hormone upon cell membrane and mitochondria have been proposed. However, although a T3 stimulation of calcium influx and cAMP production have been reported, an hypothetical T3 membrane receptor remains to be identified. Numerous data underline that T3 exerts short and long-term effects upon mitochondria. In particular, hormonal stimulation of oxygen consumption, ATP synthesis and mitochondrial translocator activity have been reported. These influences are detected with a short latency period, in *in vivo* experiments as well as on isolated mitochondria, and are not affected by protein synthesis inhibitors. Therefore, they are not mediated by T3 nuclear receptors. In addition, a long-term effect upon mitochondrial biogenesis is well established. The short-term stimulation of mitochondrial activity by T3 is linked to an increase in the inner membrane area and acute changes in its phospholipid composition. This pheno-

menon induces in turn an increase in mitochondrial carriers and enzymes activities and a rise in inner membrane proton leak. In addition, T3 also stimulates mitochondrial gene expression. Several mechanisms have been proposed to explain the T3 mitochondrial influence. An increase in the mitochondrial calcium pool, a possible ADP-ribosylation of an inner membrane protein, or an induction of cytochrome-oxidase allosteric changes have been proposed to be involved in the short-term influence of T3. Moreover, evidences suggesting that the nuclear pathway is involved in long-term influences are provided. Lastly, the identification of a c-ErbA-related protein in the mitochondrial matrix, inducing strong changes in mitochondrial activity, clearly establishes the occurrence of a direct T3 mitochondrial pathway. Over all, it appears that T3 influences mitochondrial activity by a number of different mechanisms initiated inside and outside the organelle.