

RECHERCHES SUR LA PRÉPARATION ET LES PROPRIÉTÉS DE LA THYROGLOBULINE PURE · I

par

YVES DERRIEN, RAYMOND MICHEL ET JEAN ROCHE*

Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris (France) et Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Marseille (France)

I. INTRODUCTION ET OBJET DU TRAVAIL

L'isolement d'iodoprotéines thyroïdiennes a été opéré par diverses techniques dont les modalités reflètent deux préoccupations dominantes: d'une part, obtenir des produits homogènes pouvant être considérés comme des corps purs; d'autre part, rechercher si la glande renferme ou non un mélange d'iodoprotéines correspondant à des degrés d'halogénéation différents et, le cas échéant, les séparer. La solution de l'un et de l'autre problèmes est nécessairement liée à l'obtention de protéines pures.

Après les travaux préliminaires de BAUMANN ET Roos¹, de BUBNOW², de GOURLAY³, d'HUTCHISON⁴, montrant le caractère globulinique des fractions iodées de l'extrait thyroïdien, OSWALD⁵ entreprit l'étude de la thyroglobuline, qu'il proposa de séparer par précipitation acétique après fractionnement au sulfate d'ammonium à demi-saturation. Le mode opératoire d'OSWALD conduisant à un produit dénaturé, selon HEIDELBERGER ET PALMER⁶, ces auteurs lui ont substitué la précipitation de la thyroglobuline au sulfate de sodium (demi-saturation à 35°) après délipidation au toluène et séparation d'un nucléoprotéide insoluble à $p_H = 4.8-5.0$. Pour CAVETT ET SELJES-KÖG⁷ les préparations ainsi obtenues sont en partie dénaturées et renferment des lipides en quantité appréciable. Il n'en serait plus de même lorsque la protéine est préparée par extraction à 0° au moyen d'une solution isotonique de chlorure de sodium de coupes minces de l'organe congelé et précipitation de la thyroglobuline entre 35 et 45% de la saturation des solutions en sulfate d'ammonium.

Bien que cette protéine (HEIDELBERGER ET PALMER) soit homogène au regard de l'ultracentrifugation et de l'électrophorèse (SVEDBERG ET HEIDELBERGER⁸, HEIDELBERGER ET PEDERSEN⁹, LUNDGREN¹⁰), la question de la présence de plusieurs thyroglobulines dans le corps thyroïde demeure ouverte. ABELIN ET KELLER¹¹, BLUM, LEHMANN ET LEISTNER¹² et, plus récemment, RIVIÈRE, GAUTRON ET THÉLY¹³, ont séparé d'extraits d'organes ou de thyroglobulines des produits de degrés d'ioduration divers et pensent, de ce fait, avoir montré l'hétérogénéité de l'iodoprotéine thyroïdienne. Leurs conclusions ne sauraient être adoptées sans réserves, car la pureté des préparations employées par ces auteurs ou le caractère protéique de toutes les fractions iodées obtenues reste à démontrer. L'adsorption d'acides aminés iodés ou d'ions iode à certaines de celles-ci peut en effet être à l'origine des faits observés. Néanmoins, il est très probable que le degré d'ioduration physiologique de la thyroglobuline peut subir des varia-

* Avec l'assistance technique de Mesdemoiselles JACQUELINE BERNARD et GÉORGETTE TABUSSE.

tions importantes et l'on peut envisager que le corps thyroïde d'un même animal renferme un mélange de protéines plus ou moins richement halogénées.

Il y avait intérêt à reprendre l'étude de la préparation de la thyroglobuline pour diverses raisons. D'une part, le contrôle de l'efficacité des moyens de purification adoptés jusqu'ici s'avère nécessaire pour établir une méthode permettant d'obtenir de la thyroglobuline pure et non dénaturée; aucune des techniques actuelles n'offre de garanties à cet égard. D'autre part, la préparation de l'iodoprotéine thyroïdienne pure permettrait seule d'étudier avec sécurité le problème de l'unité ou de la multiplicité des thyroglobulines. Il convenait pour entreprendre ce travail de disposer de critères d'homogénéité ou d'hétérogénéité des milieux protéiques et ni l'ultracentrifugation, ni l'électrophorèse n'avaient permis à cet égard une analyse fine des préparations obtenues par HEIDELBERGER ET PALMER. Nous avons employé dans ce but le test de solubilité des protéines en fonction de la concentration en sels neutres élaboré par E. J. COHN et appliqué sur une large échelle par ROCHE ET DERRIEN, sous la forme récemment développée par DERRIEN¹⁴. L'établissement des diagrammes de solubilité en fonction de la concentration en protéine dans un milieu de teneur constante en sel neutre (NORTHROP¹⁵) a été mise en œuvre par ailleurs.

Certains problèmes devaient nécessairement être abordés à propos de ce travail en dehors du domaine technique. La teneur en iodine des thyroglobulines s'est avérée variable (de 0.07 à 0.8% selon OSWALD⁵) et de nombreux auteurs admettent avec HARINGTON¹⁶ que "cette variabilité seule suffit à indiquer que la thyroglobuline est mal définie et que, même à l'heure actuelle, aucune preuve de l'isolement d'un produit homogène n'a été apportée". Par contre, HEIDELBERGER ET PALMER⁶, CAVETT MAC CLENDON ET RICE⁷, considèrent que la pureté d'une thyroglobuline peut être appréciée au moyen de son taux d'iodine, les derniers auteurs ayant obtenu à partir d'animaux d'abattoir des préparations renfermant jusqu'à 0.69% de celui-ci. En l'état de nos connaissances sur l'ioduration physiologique de la thyroglobuline, on peut penser que la fixation de l'halogène s'opère avec une intensité variable sur un produit de composition en acides aminés et de structure constantes. Il en découlerait que cette protéine est bien définie, à sa teneur en dérivés iodés près. Notre travail était susceptible d'apporter une contribution à la solution de ce problème. De plus, l'étude des thyroglobulines de quatre mammifères (Bœuf, Cheval, Chien, Porc) devait permettre de préciser l'existence éventuelle de caractères spécifiques de celles-ci, d'autres protéines, comme les hémoglobines, présentant à cet égard une grande diversité.

Nous avons, dans une première série de recherches, défini et localisé les protéines iodées dans les extraits thyroïdiens. Nous avons ensuite préparé des thyroglobulines par les méthodes d'OSWALD, d'HEIDELBERGER ET PALMER, de CAVETT ET SELJESKÖG et identifié dans celles-ci les impuretés ou les fractions dénaturées. Cette étude ayant précisé les facteurs de dénaturation et les caractères de solubilité de la thyroglobuline, nous avons élaboré une méthode de préparation de cette protéine pure non dénaturée, ce qui n'avait pas été réalisé auparavant. Un examen général des résultats obtenus a permis de définir la thyroglobuline au regard de critères chimiques et physicochimiques et de discuter le problème de son homogénéité.

II. RECHERCHES PERSONNELLES

A. Techniques

Les préparations d'extraits thyroïdiens et de thyroglobuline ont été obtenues selon *Bibliographie p. 469/470.*

des techniques précisées plus bas, à partir de glandes de taille et de poids normaux d'animaux d'abattoir sains (Bœuf: 10-14 g, Cheval 8-10 g, Porc: 12-14 g) ou de glandes de Chien*. Elles ont fait l'objet de recherches sur la solubilité de leurs constituants protéiques en fonction de concentrations croissantes en sulfate d'ammonium ou en mélange équimoléculaire de phosphates mono- et dipotassique à $p_H = 6.5$ et à 22° , ou en sulfate de sodium à $p_H = 6.5$ et à 37° , poursuivies selon les modalités réglées par l'un de nous¹⁴ (temps d'équilibre 20 heures à température constante à $\pm 0.05^\circ$, p_H défini à ± 0.05 près, concentration en N protéique 0.8-1.4 mg par ml). Les dosages d'azote protéique qu'elles ont comporté ont été opérés par microkjeldahl dans des conditions techniques rigoureuses; l'erreur relative dont leur précision est entachée ne dépasse pas 0.5%, sauf en présence de sulfate d'ammonium. Dans ce dernier cas, l'application de la méthode d'A. ROCHE ET MARQUET¹⁸ a permis d'obtenir des données exactes à 1 pour 100 près.

L'expression graphique des résultats de ces dosages a été, pour chaque expérience, établie simultanément selon les deux modalités suivantes: la première est la représentation classique de la variation de la solubilité S (mg N protéique dissous par ml) en fonction de la concentration en sel neutre C . La seconde, récemment mise au point par l'un de nous¹⁴, consiste en une différenciation de la courbe de solubilité $S = f(C)$. On calcule, à cet effet, les quantités de protéines ΔS (γ d'N protéique) précipitées dans chaque intervalle de concentration saline ΔC (le plus souvent égal à 1% dans les conditions expérimentales adoptées au cours du présent travail) et l'on établit la courbe des variations de $(\Delta S / \Delta C) i$ en fonction de C , i désignant l'incrément des concentrations salines dans une zone particulière, ou dans la totalité du graphique.

Dans le cas d'une protéine homogène, la courbe $S = f(C)$ est formée par un segment d'exponentielle tendant asymptotiquement vers l'ordonnée zéro (E. J. COHN), alors que la courbe $\Delta S / \Delta C = f(C)$ affecte schématiquement le profil asymétrique d'une dent de scie. Dans le cas d'un mélange de protéines de solubilités différentes, le premier des deux modes de représentation graphique conduit au tracé d'une courbe discontinue, formée par une succession de segments raccordés par des points d'infexion (ROCHE ET DERRIEN¹⁹) et le second à celui d'un diagramme comportant une série correspondante de maxima. L'avantage des graphiques de ce dernier type, analogues aux diagrammes d'électrophorèse, est d'objectiver sans ambiguïté l'hétérogénéité du milieu protéique étudié et de dénombrer les constituants (technique de recherche) ou les groupes de constituants (méthode de routine) de solubilité différente qu'il renferme¹⁴. Par contre, les courbes $S = f(C)$ se prêtent mieux à la détermination quantitative des divers constituants d'un mélange protéique. Enfin, les unes et les autres permettent d'entreprendre le fractionnement rationnel de ce dernier^{14, 15}.

Afin d'alléger la présentation de ce mémoire, nous nous sommes bornés à y insérer une série de clichés sans joindre à ceux-ci les valeurs numériques correspondantes. Toutes les figures rendant compte des résultats de nos recherches sont constituées par la représentation simultanée des deux types de courbes décrites ci-dessus. Les valeurs de S ou de $\Delta S / \Delta C$ définies plus haut, ont été portées en ordonnées en fonction des concentrations en sel C figurant en abscisses. C est exprimé en pour 100 en volume de solution saline stock

* Nous remercions MM. les Vétérinaires des Abattoirs de Marseille et, en particulier le Docteur PLACIDI d'avoir assuré le contrôle de l'état et de la taille des corps thyroïdes destinés à nos recherches et M. le Professeur MERCIER (Pharmacologie, Marseille), d'avoir bien voulu nous fournir les organes de Chien utilisés pour ce travail.

($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ saturé, SO_4Na_2 à 25 g pour 100, mélange équimoléculaire de $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H} + \text{PO}_4\text{KH}_2$ 3.5 M) et S en milligrammes d'azote protéique dissous par ml. Cette définition des systèmes de coordonnées adoptés ne sera pas répétée dans la légende de chaque figure, laquelle ne comporte que l'indication du produit étudié et celle des conditions de l'expérience. L'iode total a été dosé par les méthodes de LEIPERT²⁰ ou de MICHEL ET LAFON²¹ et le phosphore total par la méthode de NEUMANN (micro-technique de DUMAZERT ET MOURGUE²²) dans les extraits thyroïdiens ou leurs produits de fractionnement. Le contrôle du p_H (± 0.05) a été opéré par potentiométrique (électrode de verre).

B. Etudes des protéines des extraits thyroïdiens

La méthode d'HEIDELBERGER ET PALMER⁶ comporte dans un premier temps l'extraction à la presse de pulpe de corps thyroïde finement haché après lavage à l'eau glacée, cette opération étant répétée après mise en suspension de l'organe pressé dans une solution à 1 % d'acétate de sodium. Celle de CAVETT ET SELJESKÖG⁷ extrait la thyroglobuline brute de coupes minces de l'organe congelé, par des solutions isotoniques de chlorure de sodium de $\text{p}_\text{H} = 7.6$ (20 heures de contact à 0°). Nous avons comparé les produits obtenus par ces deux modes opératoires et étudié le rendement de ceux-ci.

Les protéines extraites par l'un ou l'autre procédé sur un lot homogène de corps thyroïdes présentent une teneur en iode pratiquement identique, en général un peu plus élevée dans le produit obtenu selon CAVETT ET SELJESKÖG, par exemple, 0.25 % pour le premier et 0.27 % pour le second. Par contre, le rendement de l'opération est nettement supérieur avec la technique de ces derniers auteurs (40% environ dans les conditions où nous nous sommes placés) et conduit à des milieux beaucoup moins riches en lipides. Dans les deux cas, l'extraction des glandes saines et de taille normale fournit des protéines de teneurs en iode très diverses. Toutefois, comme l'ont signalé par ailleurs MICHEL ET LAFON²³, le rapport: I thyroxinien/I total, est pratiquement constant et égal à 0.30-0.34 dans celles-ci. Pareils écarts dans le taux de l'iode protéique ont été constatés par certains auteurs et non par d'autres; ils tiennent probablement aux conditions alimentaires des animaux, mais aussi aux variations saisonnières de l'activité de l'organe. Les résultats obtenus à partir du corps thyroïde de porcs provenant d'élevage régionaux et d'animaux d'abattoir ou de laboratoire d'origine indéterminée ont été rassemblés dans le Tableau I.

TABLEAU I

TENEUR EN IODE POUR 100 DES PROTÉINES TOTALES D'EXTRAITS THYROÏDIENS DE DIVERS ANIMAUX
(GLANDES DE TAILLE NORMALE)

Espèce animale et type d'extraction	Mois de prélèvement et teneur en iode pour 100
Bœuf (CAVETT ET SELJESKÖG) . . .	novembre: 0.64; mars: 0.03
Bœuf (HEIDELBERGER ET PALMER) . . .	novembre: 0.72; janvier: 0.45
Cheval (CAVETT ET SELJESKÖG) . . .	janvier: 0.40; janvier: 0.34
Chien (CAVETT ET SELJESKÖG) . . .	mai-juin: 0.32
Porc (CAVETT ET SELJESKÖG) . . .	novembre: 0.46; mai: 0.08
Porc (HEIDELBERGER ET PALMER) . . .	novembre: 0.59; décembre: 0.47; décembre: 0.33; février: 0.21; mars: 0.18; avril: 0.21; mai: 0.31; juin: 0.32; octobre: 0.39

La solubilité en présence de sels neutres à concentration croissante des protéines que renferment ces extraits traduit leur hétérogénéité. Nous l'avons étudiée sur environ

cinquante préparations et l'on trouvera ci-dessous (Figs. 1, 2, 3, 4, 5 et 6) quelques exemples de résultats.

La Fig. 1 illustre ceux obtenus sur des extraits préparés par les techniques de CAVETT ET SELJESKÖG et d'HEIDELBERGER ET PALMER sur un même lot de glandes de Porc et additionnés de quantités progressivement croissantes de mélanges équimoléculaires de phosphates mono- et dipotassique 3.5 M, de $pH = 6.5$, à 22° .

L'examen de la Fig. 1 rend compte du fait que les deux types de préparations renferment en abondance un groupe de constituants protéiques dont le relargage a lieu entre des teneurs de 42 à 48% des solutions en mélange de phosphates de potassium 3.5 M dans les conditions opératoires adoptées. Par ailleurs, l'extrait obtenu par pression est plus riche en fractions protéiques, les unes plus solubles et les autres moins solubles que celles précipitant entre des teneurs de 42 à 48% en mélange salin. Les Fig. 2 à 6 établies à l'aide d'un plus grand nombre de déterminations, sont à cet égard plus significatives. L'hétérogénéité protéique qu'elles mettent en évidence est indépendante de l'origine animale des extraits et de la nature du sel précipitant. On la retrouve en effet lors du relargage par les phosphates alcalins, par le sulfate de sodium et par le sulfate d'ammonium (voir Fig. 2, 3 et 12). Elle se manifeste identiquement, quelle que soit la richesse en iodé des extraits, et n'est pas modifiée par la délipidation au toluène, qui doit dès lors être considérée comme un solvant des lipides dont l'emploi ne comporte aucune dénaturation des protéines (Fig. 6). Les courbes de S en fonction de C sont constituées par un certain nombre de segments successifs séparés par des points d'inflexion

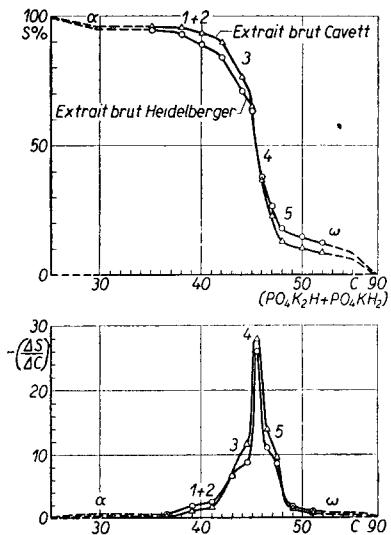


Fig. 1. Extraits thyroïdiens bruts (Porc) préparés selon CAVETT ET SELJESKÖG ($I\% = 0.27$) et HEIDELBERGER ET PALMER ($I\% = 0.25$), à partir d'un même lot de glandes. Solubilité (S) en présence de mélange équimoléculaire $\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ ($C = \text{p. 100 de solution } 3.5 \text{ M de ce mélange}$), $\text{pH} = 6.5$, $t = 22^\circ$

Bibliographie p. 469/470.

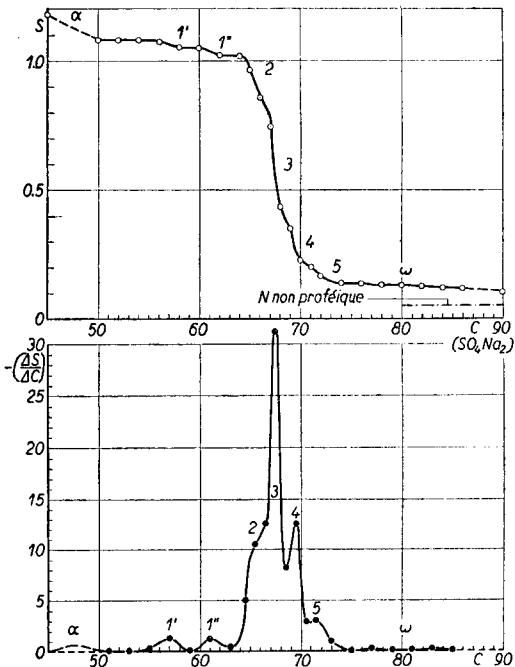


Fig. 2. Extrait thyroïdien brut (Bœuf) préparé selon HEIDELBERGER ET PALMER ($I\% = 0.45$). Solubilité (S) en présence de sulfate de sodium ($C = \text{p. 100 de solution à } 25 \text{ g p. 100 ml en ce sel}$) $\text{pH} = 6.5$, $t = 37^\circ$

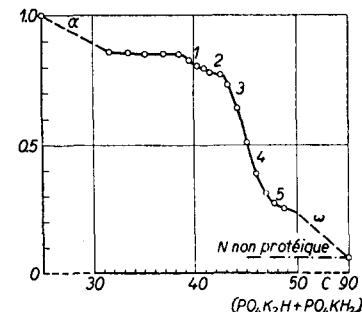


Fig. 3. Extrait thyroïdien brut (Cheval) préparé selon HEIDELBERGER ET PALMER ($I\% = c.40$). Solubilité (S) en présence de mélange équimoléculaire $\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ ($C = p. 100$ de solution 3.5 M de ce mélange), $\text{pH} = 6.5$, $t = 22^\circ$

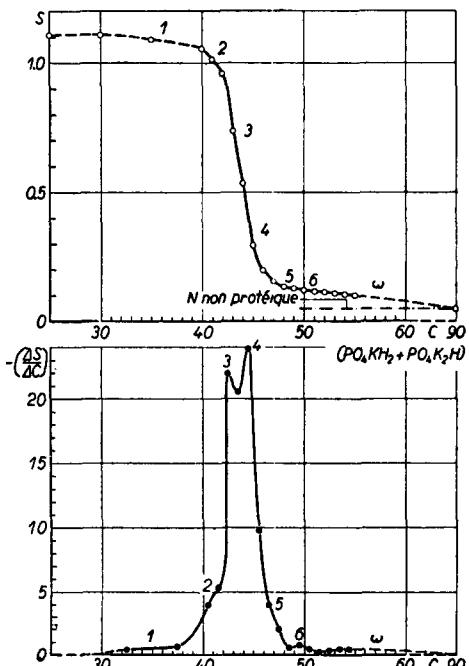


Fig. 5. Extrait thyroïdien brut (Porc) préparé selon CAVETT ET SELJESKÖG ($I\% = 0.24$); Solubilité (S) en présence de mélange équimoléculaire $\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ ($C = p. 100$ de solution 3.5 M de ce mélange), $\text{pH} = 6.5$, $t = 22^\circ$

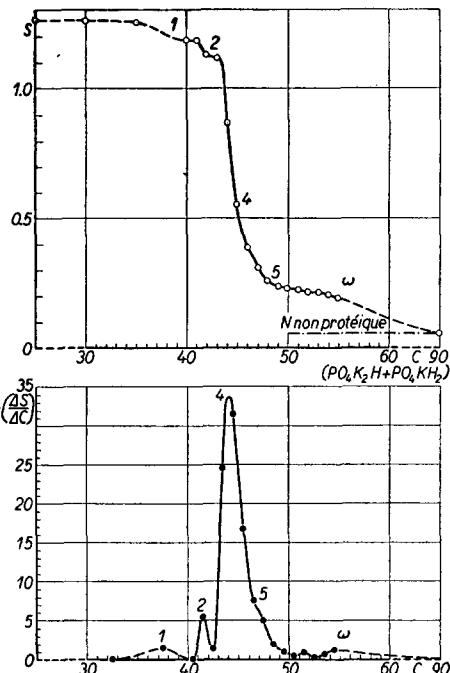


Fig. 4. Extrait thyroïdien brut (Porc) préparé selon HEIDELBERGER ET PALMER ($I\% = 0.08$). Solubilité (S) en présence de mélange équimoléculaire $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H} + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ ($C = p. 100$ de solution 3.5 M de ce mélange), $\text{pH} = 6.5$, $t = 22^\circ$

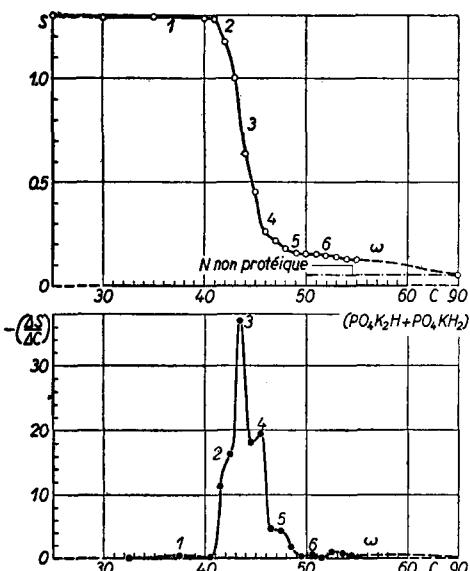


Fig. 6. Extrait thyroïdien brut (Porc) préparé selon HEIDELBERGER ET PALMER, délipidé au toluène ($I\% = 0.48$). Solubilité (S) en présence de mélange équimoléculaire $\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ ($C = p. 100$ de solution 3.5 M de ce mélange), $\text{pH} = 6.5$, $t = 22^\circ$

correspondant au début de précipitation d'un constituant (ou groupe de constituants) plus soluble que le précédent. Les positions des points d'infexion sont pratiquement identiques sur les divers graphiques dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placés*. Nous avons numéroté de 1 à 5 (et éventuellement de 1 à 6) les fractions qu'ils délimitent et désigné respectivement par les lettres *a* et *ω* les groupes d'impuretés protéiques les moins solubles et les plus solubles que renferment certaines des préparations étudiées. La première des fractions numérotées (1) peut se dédoubler (1' et 1'') ou être absente et le taux de la seconde (2) est très variable, comme on le verra plus bas; les fractions 3, 4 et 5 constituent seules la thyroglobuline, car elles renferment la quasi-totalité de l'iode. On remarquera que leur taux respectif est variable d'une préparation à l'autre et qu'une de ces fractions peut être fusionnée avec une autre lorsque celle-ci est beaucoup plus abondante. Par ailleurs nous avons constaté que la conservation des extraits et leur dilution provoquent des modifications du même ordre.

En définitive, les fractions thyroglobuliniques constituent de 60 à 80% des protéines dans les extraits bruts étudiés. Les limites de solubilité de ces produits dans une marge de concentration en divers sels neutres sont assez bien définies et constantes dans certaines conditions opératoires (42-48% de mélange équimoléculaire des phosphates mono- et dipotassique, 36 à 42% de la saturation en sulfate d'ammonium, à $p_{\text{H}} = 6.5$ et à 22° , 67 à 75% de la teneur en solution de sulfate de sodium à 25 g pour 100, à $p_{\text{H}} = 6.5$ et à 37° dans des milieux renfermant de 1.0 à 1.5 mg N protéique par ml). Elles sont à cet égard identiques, quelle que soit leur teneur en iode et leur origine animale. Aussi, le relargage par les sels neutres n'amenant aucune dénaturation, son application à la préparation de la thyroglobuline pure trouve-t-il une première base expérimentale dans nos résultats.

C. Elimination des impuretés protéiques, dénaturation et préparation de la thyroglobuline

HEIDELBERGER ET PALMER⁶ ont les premiers attiré l'attention sur l'existence, dans les extraits thyroïdiens, d'impuretés protéiques accompagnant la thyroglobuline et

montré que la précipitation acétique de celle-ci opérée par OSWALD⁵ entraîne sa dénaturation partielle. La Fig. 7, établie à partir de courbes de relargage par le sulfate de sodium, à $p_{\text{H}} = 6.5$ et à 22° , de la thyroglobuline obtenue par la méthode d'OSWALD et de protéines totales de l'extrait thyroïdien (Porc) ayant servi de matière première à la préparation de celle-ci, est à cet égard significative. Son examen montre en effet que les protéines thyroïdiennes séparées de l'extrait par précipitation isoélectrique sont dénaturées et transformées en produits *a*, *b* et *c*, précipitant par le sulfate de sodium à des concentrations en celui-ci, beaucoup plus faibles,

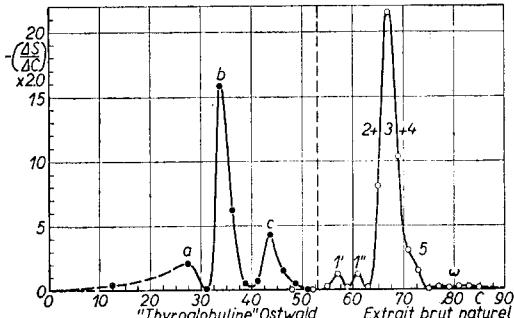


Fig. 7. Variation de $\Delta S/\Delta C$ de l'extrait thyroïdien brut (HEIDELBERGER ET PALMER) et de la thyroglobuline préparée par la méthode d'OSWALD en fonction de C (p. 100 de la concentration en solution à 25 g p. 100 de SO_4Na_2), à $p_{\text{H}} = 6.5$ et à 37° .

* Il est particulièrement important de respecter la concentration en protéine des milieux, voisine de 1.2-1.4 mg N protéique par ml dans nos expériences, pour que la position de ces points conserve une signification. Une dilution des solutions protéiques provoque un léger décalage des courbes vers les concentrations plus élevées en sel.

entre 20 et 50% de teneur en solution à 25 g pour 100 en ce sel à p_H 6.5 et à 37° au lieu de 67 et 75%.

HEIDELBERGER ET PALMER⁶ ont établi que les extraits bruts de corps thyroïde renferment un nucléoprotéïde que n'élimine pas la méthode d'OSWALD et, pour HEIDELBERGER ET PEDERSEN⁹, la dénaturation de la thyroglobuline serait liée à sa précipitation isoélectrique ($p_H = 4.48$), cette protéine étant très instable aux p_H inférieurs à 5.0. Les premiers auteurs ont proposé de séparer le nucléoprotéïde par précipitation à $p_H = 4.8-5.0$, puis de précipiter la thyroglobuline par le sulfate de sodium à demi-saturation. Nous avons répété le premier temps de la préparation décrite par HEIDELBERGER ET PALMER et étudié la solubilité de la protéine obtenue, en présence d'un mélange phosphates mono- et dipotassique 3.5 M à concentration croissante. Les graphiques reproduits sur la Fig. 8 illustrent nos résultats.

La fraction 1 de l'extrait brut de corps thyroïde est bien éliminée par le traitement préalable de celui-ci à $p_H = 4.9$, mais la solubilité d'une partie de la thyroglobuline régresse alors notablement, ce que traduit l'apparition de constituants précipitant à des concentrations en sels inférieures à celles auxquelles commence le relargage des fractions 3, 4 et 5 des protéines totales. De plus, la fraction 2 n'est probablement pas éliminée; il se peut néanmoins que le constituant précipitant dans la même zone au cours de l'expérience soit de la thyroglobuline faiblement dénaturée. Nous avons cherché à éviter cette modification de l'iodoprotéine en séparant le nucléoprotéïde présent dans les extraits bruts à des p_H supérieurs à 4.8-4.9. L'acidification de solutions à $p_H = 5.2$ provoque une précipitation des impuretés protéiques faiblement solubles sans altérer la thyroglobuline, laquelle conserve sa solubilité naturelle; mais les produits obtenus renferment encore des quantités appréciables des fractions 1 et 2. Il en découle que le procédé d'HEIDELBERGER ET PALMER doit être abandonné.

La méthode de CAVETT ET SELJESKÖG évite judicieusement toute acidification et isole la thyroglobuline en la précipitant entre 35 et 45% de la saturation en sulfate d'ammonium. La protéine préparée selon le mode opératoire décrit par ces auteurs en ayant soin de maintenir le p_H à 6.5 pendant le relargage présente des caractères de solubilité dont rend compte l'examen de la Fig. 9.

La thyroglobuline des auteurs américains ne renferme que des constituants protéiques de même solubilité que ceux présents dans les extraits bruts. Mais le fractionnement de ces protéines est alors très incomplet, puisque l'on y trouve, en dehors de la thyroglobuline (3, 4 et 5), une partie des fractions de tête (1 et 2) et une impureté de queue, plus soluble que le constituant 5. Il n'y a pas lieu de considérer ce produit comme pur. Il a d'ailleurs été possible de le fractionner et de démontrer que seuls les constituants 3, 4 et 5 des extraits bruts qu'il renferme correspondent à la thyroglobuline.

Bibliographie p. 469/470.

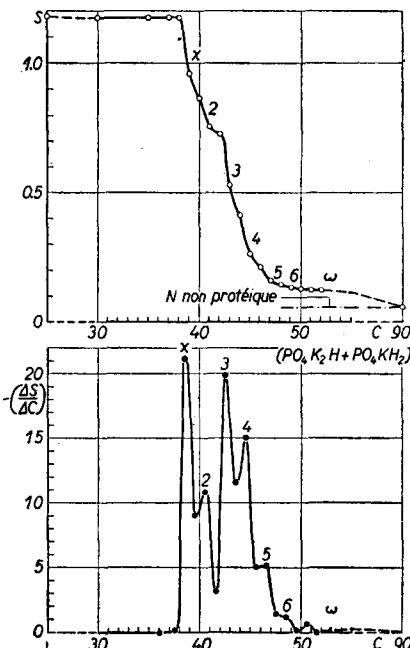


Fig. 8. Thyroglobuline de Porc préparée par la méthode d'HEIDELBERGER ET PALMER ($I\% = 0.56$). Solubilité (S) en présence de mélange équimoléculaire $PO_4KH_2 + PO_4K_2H$ ($C = p. 100$ de solution 3.5 M de ce mélange), $p_H = 6.5$, $t = 22^\circ$.

qui rend compte l'examen de la Fig. 9.

La Fig. 10 illustre les résultats d'une expérience que nous avons réalisée dans ce but.

Le fractionnement opéré à la concentration de 44.5% en solution 3.5 M de phosphates potassiques a permis de séparer 23% de protéines précipitées (B), 77% du produit (C) demeurant en solution. Les constituants les moins solubles sont ainsi concentrés dans B, produit riche en fractions 1, 2 (2' et 2'') et 3, pauvre en 4 et dépourvu de 5.

Le produit C renferme, par contre, presque exclusivement les fractions 4 et 5 de la préparation initiale, avec une trace de fraction 3. Or, la teneur en iodé de B est 0.19%, celle de C de 0.34% et celle de la préparation non fractionnée 0.30%. Si l'on rapporte la totalité de l'iodé aux constituants 3, 4 et 5, dont les taux respectifs sont

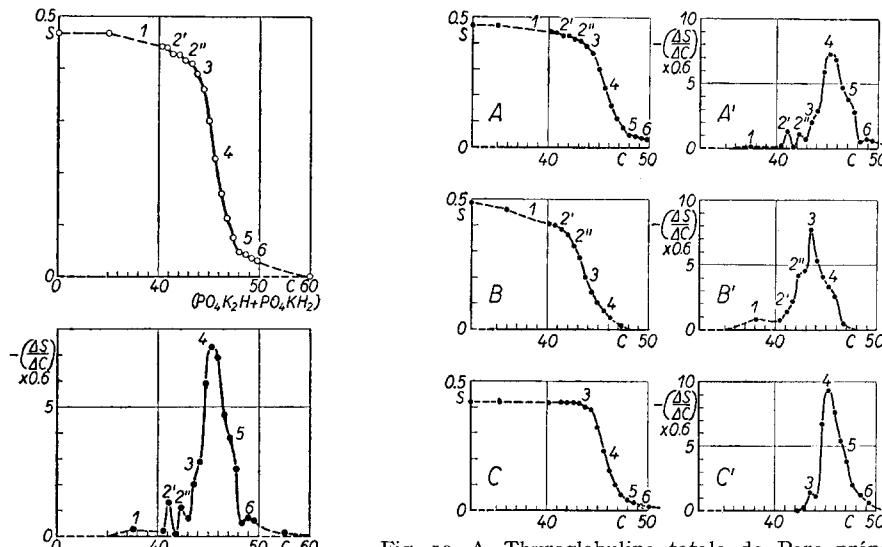


Fig. 9. Thyroglobuline de Porc préparée par la méthode de CAVETT ET SELJESKÖG ($I\% = 0.30$). Solubilité (S) en présence d'un mélange équimoléculaire $PO_4KH_2 + PO_4K_2H$ ($C = p$, 100 de solution 3.5 M de ce mélange), $pH = 6.5$, $t = 22^\circ$.

Fig. 10. A. Thyroglobuline totale de Porc préparée par la méthode de CAVETT ET SELJESKÖG ($I\% = 0.30$). B. Même produit fractionné à une teneur de 44.5% en mélange équimoléculaire $PO_4KH_2 + PO_4K_2H$ 3.5 M, fraction précipitée ($I\% = 0.19$). C. Même produit fractionné à une teneur à 44.5% du mélange équimoléculaire $PO_4KH_2 + PO_4K_2H$ 3.5 M, fraction soluble ($I\% = 0.34$). Solubilités (S) en présence d'un mélange équimoléculaire $PO_4KH_2 + PO_4K_2H$ 3.5 M ($C = p$, 100 de solution 3.5 M de ce mélange), $pH = 6.5$, $t^\circ = 22^\circ$.

déterminés graphiquement sur les courbes ci-jointes et si l'on calcule le degré d'ioduration que ceux-ci présentent dans les trois produits étudiés, on obtient dans chaque cas une valeur voisine de 0.36%. Il en découle que le produit obtenu par la méthode de CAVETT ET SELJESKÖG renferme des fractions protéiques non iodées (1, 2 et 6), et que la thyroglobuline en constitue uniquement les fractions 3, 4 et 5 individualisées sur les courbes de solubilité des extraits thyroïdiens comme sur celles des préparations de CAVETT ET SELJESKÖG. Le procédé de ces auteurs est donc supérieur à celui d' HEIDELBERGER ET PALMER en ce sens qu'il conduit à une thyroglobuline non dénaturée, mais celle-ci est souillée d'impuretés protéiques dont le taux est en général égal ou supérieur à 10%.

D. Répartition de l'iodé dans les extraits thyroïdiens et préparation de la thyroglobuline pure

La précipitation fractionnée par les sels neutres doit sans conteste être considérée, *Bibliographie p. 469/470.*

à la suite des résultats exposés plus haut, comme le principe à retenir pour séparer des extraits thyroïdiens la thyroglobuline non dénaturée. Néanmoins, les conditions de son application demeuraient à déterminer. Il convenait pour cela d'étudier systématiquement le relargage de la thyroglobuline et des impuretés protéiques qui l'accompagnent dans les extraits obtenus selon CAVETT ET SELJESKÖG, en mettant à profit les particularités de composition de l'une et des autres.

La thyroglobuline est iodée et les impuretés qui l'accompagnent dans des produits bruts ne le sont pas, l'une d'elles étant un nucléoprotéide. Aussi pouvait-on espérer préciser les limites des concentrations en sels neutres entre lesquelles s'opère le relargage de ces divers corps en étudiant la précipitation de l'azote protéique, de l'iode et du phosphore des extraits additionnés de ces sels à des taux progressivement croissants. Une expérience de ce type a été réalisée sur une série d'échantillons d'un extrait thyroïdien de Porc renfermant 11.40 mg de protéines totales, 0.043 mg I et 0.025 mg P par ml. Les divers échantillons de même volume (100 ml) renfermaient des quantités progressivement croissantes de sulfate d'ammonium (écart de 1 en 1% de la saturation en sel), et leur p_H , contrôlé à l'électrode de verre, était de 6.5. Après 20 heures d'équilibre à 22°, une prise d'essai du liquide recouvrant les précipités a été séparée et centrifugée et l'on y a dosé l'azote protéique, l'iode et le phosphore total, après avoir fait subir à trois parties aliquotes les minéralisations appropriées. Le taux des protéines dissoutes et précipitées et la teneur en iode et en phosphore de celles-ci ont été calculés à partir des résultats. On trouvera dans le Tableau II les plus significatifs de ceux-ci.

TABLEAU II

PRÉCIPITATION DES FRACTIONS IODÉES ET PHOSPHORÉES DES PROTÉINES D'UN EXTRAIT THYROÏDIEN DE PORC (CAVETT ET SELJESKÖG), PAR LE SULFATE D'AMMONIUM A CONCENTRATION CROISSANTE, $p_H = 6.5$, $t = 22^\circ$

Marge de concentration en sulfate d'ammonium dans laquelle la précipitation a lieu*	p. 100 de l'azote protéique précipité entre ces limites	Teneur en I pour 100 des protéines précipitées	Teneur en P pour 100 des protéines précipitées
de 30.0 à 32.5	1.16	traces indos.	0.395
de 32.5 à 35.0	2.79	traces indos.	
de 35.0 à 36.0	4.19	0.13	0.482
de 35.0 à 37.0	12.81	0.374	0.000
de 37.0 à 38.0	24.23	0.482	0.000
de 38.0 à 39.0	22.26	0.454	0.072
de 39.0 à 40.0	12.46	0.464	0.226
de 40.0 à 41.0	3.26		
de 41.0 à 42.0	2.44	{ 0.375	{ 0.366
de 42.0 à 43.0	0.93		
de 43.0 à 44.0	0.82	{ 0.091	{ 0.434
de 44.0 à 45.0	1.22		
de 45.0 à 47.5	2.74	{ 0.0114	{ 0.441
de 47.5 à 50.0	2.16		

* en % de la saturation en sulfate d'ammonium

Environ 75% des protéines iodées de l'extrait thyroïdien précipitent entre 36 et 40% de la saturation en sulfate d'ammonium à $p_H = 6.5$ et 5 à 22°. Par contre, le nucléoprotéide s'insolubilise dans les fractions de tête et les fractions de queue, moins abondantes, renferment du phosphore, probablement lipoprotéidique. Comme la séparation

d'une protéine dans un mélange comporte toujours l'entraînement d'autres dans les zones de salinité où elle commence et où elle s'achève, on pouvait espérer obtenir la thyroglobuline pure en réalisant deux fractionnements successifs entre 36 et 41% de la saturation en sulfate d'ammonium. Le premier a été conduit sur les protéines totales des extraits d'organe, le second sur le produit de la première opération repris par une solution à 36% de sulfate d'ammonium et centrifugé pour en éliminer les produits insolubles. Les résultats obtenus ont été mis à profit pour établir le mode opératoire permettant de préparer la thyroglobuline pure.

Préparation de la thyroglobuline pure

1 kg de corps thyroïdes normaux de Porc sont congelés et coupés en tranches minces (0.8-1.5 mm) au râsoir, puis mis en suspension dans 3 litres de solution à 0.9% de chlorure de sodium glacée et abandonnés 12 heures + à 2° C. On centrifuge pour éliminer le précipité et l'on enrichit en sulfate d'ammonium par addition d'un volume convenable de solution saturée en celui-ci jusqu'à 42% de la saturation en sel. Le précipité formé est séparé par centrifugation. Après 12 heures de séjour à 20° C, mise en suspension dans 2 litres 800 d'une solution de sulfate d'ammonium à 45% de la saturation, on ramène à 37% de celle-ci par addition d'eau. On centrifuge 12 heures après les protéines insolubles, que l'on élimine. La solution est enrichie en sel jusqu'à une teneur égale à 41% de la saturation, le précipité formé est mis en suspension dans du sulfate d'ammonium à 37% de la saturation et l'on centrifuge. La solution est ainsi débarrassée successivement des fractions solubles à 41% et de celles insolubles à 37% de la saturation en sel, adsorbées au produit de la première séparation. Elle renferme la thyroglobuline pure non dénaturée. Celle-ci peut être précipitée par l'alcool ou l'acétone de ses solutions après élimination des sels par dialyse, si la préparation est destinée à l'analyse chimique; elle est alors dénaturée. Les solutions dialysées de protéine, non dénaturée, peuvent être utilisées pour des recherches physicochimiques à condition d'être conservées à des p_H supérieurs à 5.0-5.2, de préférence à $p_H = 6.5-7.0$, et à 0°.

Le mélange équimoléculaire de phosphates mono- et dipotassique 3.5 M à $p_H = 6.5$ peut être substitué à la solution saturée de sulfate d'ammonium dans cette série d'opérations. Il convient seulement alors de se placer pour les fractionnements entre 43 et 48% de la teneur en solution 3.5 M de phosphates de potassium, en opérant selon des modalités identiques pour réduire au minimum les adsorptions (lavage du précipité à 48%, élimination de la solution, addition d'eau jusqu'à 43%, centrifugation du précipité, traitement de la solution par 48%, isolement du précipité, remise en solution à 43% et centrifugation). L'examen de la Fig. 11 permet d'apprécier l'efficacité de la purification en se basant sur l'étude de la solubilité de la thyroglobuline dans un extrait brut et après sa séparation.

Les produits obtenus dans les deux cas sont identiques au regard de leur critère de solubilité et de leur teneur en iodé, celle-ci étant fonction du matériel de départ. La méthode aux phosphates présente l'avantage d'éviter tout contrôle du p_H et tout risque d'acidification, en raison du pouvoir tampon élevé des milieux; mais les précipités protéiques se formant en milieu phosphaté sont plus ténus que ceux prenant naissance en présence de sulfate d'ammonium et il convient de disposer pour les séparer d'une centrifugeuse assez rapide (6 000 tours par minute).

La disparition des constituants protéiques 1 et 2 et de la fraction de queue plus soluble que le constituant 5 est totale lorsque l'on passe du produit A à la préparation B.

Seuls des constituants 3, 4 et 5 demeurent dans celle-ci et y conservent leurs caractères de solubilité. La preuve qu'ils correspondent bien à la thyroglobuline est apportée par l'étude de la précipitation à des concentrations croissantes en sels neutres de l'azote protéique et de l'iode total des préparations purifiées. La Fig. 12 résume les résultats d'une expérience poursuivie dans ce but en utilisant le sulfate d'ammonium comme agent de relargage.

Dans toute la marge de précipitation de la protéine, l'expérience montre qu'il existe une proportionnalité rigoureuse entre l'insolubilisation des protéines et celle de

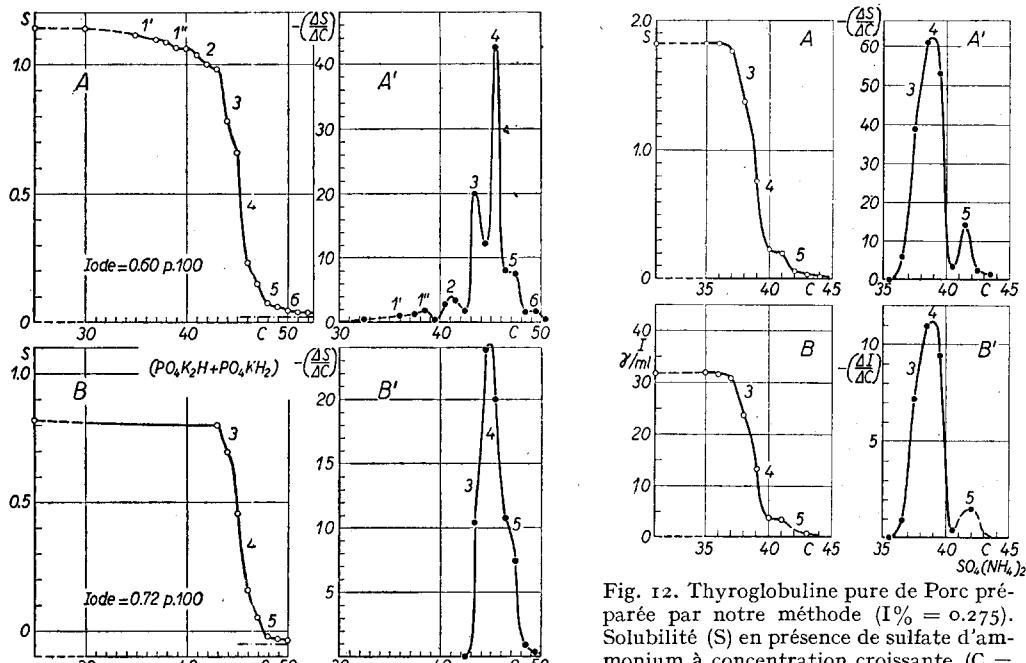


Fig. 11. A. Extrait thyroïdien brut (Porc). B. Thyroglobuline pure préparée par notre méthode. Solubilité (S) en présence d'un mélange équimoléculaire de phosphates mono- et dipotassique ($C = p. 100$ de ce mélange 3.5 M) $pH = 6.5$, $t = 22^\circ C$.

l'iode, le rapport: N/I demeurant constant dans les fractions solubles et dans les fractions précipitées aux diverses concentrations en sels. Il en découle que le produit séparé des extraits thyroïdiens que nous considérons comme la thyroglobuline pure est chimiquement homogène. Cette conclusion est corroborée par le fait que les courbes A et A', B et B' présentent le même nombre de fractions, caractérisées par la position des points d'infexion dans A et B et par celle de leurs sommets dans A' et B' aux mêmes concentrations en sels.

La teneur moyenne en azote de ces produits est $N\% = 15.8$; ils sont rigoureusement dépourvus de phosphore alors que ceux de CAVETT, RICE ET MAC CLENDON¹⁷ en contiennent de petites quantités. Certaines de nos préparations étaient plus riches en iode que toutes celles obtenues jusqu'ici sur des organes d'animaux de même espèce, la valeur de 0.84% I étant la plus élevée que nous ayons observée. Toutefois, la teneur en iode de ces produits est variable. La régularité des caractères de solubilité de la thyro-

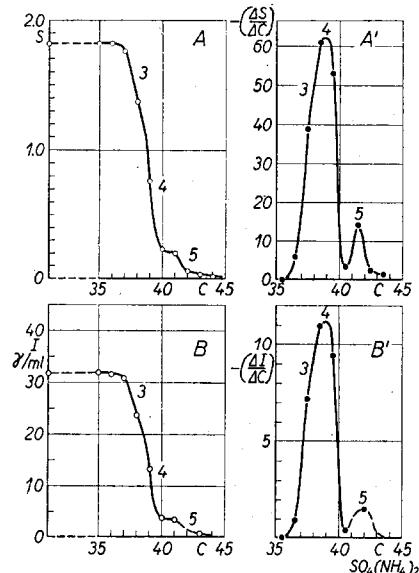


Fig. 12. Thyroglobuline pure de Porc préparée par notre méthode ($I\% = 0.275$). Solubilité (S) en présence de sulfate d'ammonium à concentration croissante ($C = p. 100$ de la saturation en ce sel), $pH = 6.5$, $t = 22^\circ$. A. Variation de S en mg d'azote protéique dissous par ml. B. Variation de I en gamma d'iode dissous par ml.

globuline s'oppose à la variabilité de son taux d'iode. A cet égard, l'hétérogénéité des produits purs, identique à celle de fractions correspondant à la thyroglobuline dans les extraits d'organes, ne saurait être mise en doute. Etant donné que la précipitation de cette protéine s'opère dans des limites assez étroites de concentration en sels, on pouvait penser que la distinction des fractions 3, 4 et 5 était quelque peu artificielle. C'est pourquoi il a paru utile de contrôler son existence en se basant sur un critère autre que celui tiré des courbes de solubilité en fonction de la concentration en sels neutres. Nous l'avons fait en établissant le diagramme de solubilité des préparations pures à concentration constante en sel neutre et à concentration variable

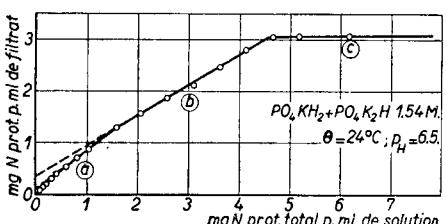


Fig. 13. Solubilité de la thyroglobuline pure préparée par notre méthode ($I\% = 0.34$) à concentration croissante en protéine dans des milieux de teneur en phosphates mono- et dipotassique constante (1.54 M), $\text{pH} = 6.5$, $t = 24^\circ$.

en protéine selon NORTHRUP¹⁵. Les résultats obtenus en présence d'un mélange équimoléculaire $1.54\text{ M } \text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ à $\text{pH} = 6.5$ à 24° ont été reproduits dans la Fig. 13.

Les deux tests auxquels nous avons fait appel pour étudier l'hétérogénéité de la thyroglobuline pure concordent donc pour démontrer l'existence dans cette protéine de trois fractions distinctes par leur solubilité, et cela malgré l'uniformité de teneur en iode de celles-ci et la constance du rapport: N/I dans les unes et les autres. L'étude de la composition en acides aminés des thyroglobulines préparées par la méthode décrite dans ce travail a permis par ailleurs de définir ces produits en se basant sur des critères chimiques. Nous en exposerons prochainement les résultats et examinerons à leur propos sur quelles bases il est légitime de faire reposer la définition de la thyroglobuline pure.

III. DISCUSSION DES RÉSULTATS

En dehors de la préparation de la thyroglobuline pure, sur laquelle il n'y a pas lieu de revenir, les résultats obtenus méritent d'être discutés pour en dégager une définition chimique et physicochimique de cette protéine.

A. Teneur en iode et pureté de la thyroglobuline

Une certaine confusion règne en ce qui concerne la teneur en iode de cette protéine. Divers auteurs ont admis que les produits les plus riches en iode obtenus jusqu'ici sont les plus purs. Pour d'autres, le corps thyroïde renfermerait un mélange de protéines différant entre elles par leur degré d'ioduration. Aucune des deux opinions ne paraît devoir être retenue à la suite de notre travail.

En effet, les caractères de solubilité de la thyroglobuline sont indépendants de son degré d'ioduration. Certaines de nos préparations ont une teneur en iode supérieures à la plus élevée signalée par les auteurs antérieurs (jusqu'à $0.84\% \text{ I}$ au lieu de 0.69% ¹⁷). Or, elles présentent les mêmes caractères de solubilité que les produits peu iodés ($0.1\% \text{ I}$) préparés par la même méthode en partant de glandes pauvres en halogène. Par ailleurs, comme nous l'établirons dans un prochain mémoire, la composition en acides aminés non iodés de thyroglobulines pures de teneurs en iode diverses provenant de glandes normales est constante. Il en découle que *la teneur en iode d'une thyroglobuline ne permet pas de définir son degré de pureté*. Le mécanisme biologique de la formation des acides

aminés iodés dans le corps thyroïde légitime indirectement cette manière de voir. Les travaux poursuivis depuis quinze ans dans ce domaine par les écoles anglaise et américaine permettent de penser avec HARINGTON²⁴, CHAIKOFF²⁵ et leurs collaborateurs, que la biosynthèse de la diiodotyrosine et de la thyroxine s'opère au sein de la molécule de thyroglobuline comme elle a lieu *in vitro* par action de l'iode sur les protéines²⁶. S'il en est ainsi, l'organe doit secréter une protéine de composition et de structure constantes dont l'halogénéation ultérieure est fonction de processus autonomes indépendants de la formation proprement dite de la protéine, manière de voir qui rejoint une hypothèse récemment formulée par SALTER²⁷. Dès lors, les seuls critères de pureté de la thyroglobuline auxquels on est en droit de s'adresser pour la caractériser sont sa composition en acides aminés non iodés—la diiodotyrosine et la thyroxine ne constituant par ailleurs jamais qu'une fraction de la molécule voisine de 1 à 2% au plus—and ses propriétés physicochimiques, mais non sa teneur en halogène ou en combinaisons halogénées. Nous considérons la protéine séparée des extraits thyroïdiens comme la thyroglobuline pure, car ses caractères de solubilité et sa teneur en certains acides aminés non iodés²⁸ sont rigoureusement constants, malgré la variabilité de la teneur en iode des préparations. Il n'existe à cet égard aucune différence entre les thyroglobulines de divers mammifères (Bœuf, Cheval, Chien, Porc), contrairement à ce que l'on observe pour les hémoglobines et les myoglobines, dont la composition et la solubilité varient dans de très larges limites. De ce fait, les concentrations salines entre lesquelles il convient de fractionner les extraits glandulaires bruts des divers animaux d'abattoir ou de laboratoire étudiés pour en séparer la thyroglobuline sont identiques, quelle que soit leur origine, à condition de respecter le mode opératoire indiqué plus haut.

B. Sur l'hétérogénéité de la thyroglobuline

Aucun des extraits thyroïdiens étudiés ne renfermait une iodoprotéine précipitant à la manière d'un produit homogène. Par ailleurs, les fractions caractérisant la thyroglobuline dans les produits bruts ont été en général retrouvées dans les préparations purifiées. Elles sont individualisées: 1. sur les courbes de solubilité par des segments de courbes délimités par des points d'inflexion; 2. sur les graphiques obtenus par différenciation des courbes précédentes par une série de sommets.

L'interprétation de ces faits est hypothétique sauf sur un point. Il est pratiquement certain que l'existence de fractions de solubilité diverses ne traduit pas celle d'un mélange de thyroglobulines, car la teneur en iode et en acides aminés de toutes celles-ci est identique. Par ailleurs, si les caractères de solubilité des protéines thyroïdiennes sont pratiquement constants dans presque tous les cas étudiés, la proportion des constituants 3, 4 et 5 est variable d'un extrait à l'autre et d'un de ceux-ci à la thyroglobuline que l'on en sépare. Elle peut par ailleurs se modifier en fonction de la dilution d'une préparation et certaines fractions font parfois défaut. Il paraît légitime d'admettre que l'hétérogénéité se manifestant ainsi répond à l'existence de divers états d'agrégation d'une même protéine. Or, comme nous l'avons établi avec K. O. PEDERSEN (résultats non publiés), nos préparations sont homogènes à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse opérées sur des solutions protéiques de faible molarité en sels neutres. Tel est aussi le cas pour les produits partiellement dénaturés d'HEIDELBERGER ET PALMER⁶ étudiés par HEIDELBERGER ET SVEDBERG⁸, par HEIDELBERGER ET PEDERSEN⁹ et par LUNGRÉN¹⁰. Le dernier auteur a longuement insisté sur le fait que la thyroglobuline est susceptible de s'associer réversiblement en particules, dont il a pu distinguer jusqu'à quatre types,

sous l'action de facteurs modifiant son ionisation. Il est probable que des phénomènes d'association moléculaire en milieu riche en sels neutres doivent être invoqués pour expliquer l'hétérogénéité des préparations que nous avons observée. Par ailleurs, puisque celles-ci sont chimiquement homogènes au regard de leurs teneurs en iodé et en acides aminés non iodés, il est peu vraisemblable qu'il existe dans ces produits un mélange de thyroglobulines. On peut physiologiquement concevoir que toutes les molécules de celles-ci présentes dans les vésicules colloïdes ne soient pas uniformément iodées, mais que leur structure soit identique. S'il en était ainsi la thyroglobuline telle que nous la définissons par des caractères physicochimiques précis et, comme nous le verrons prochainement, par sa composition constante en acides aminés non iodés, serait constituée par un mélange de fractions d'une même protéine plus ou moins halogénées. En l'état actuel de la technique biochimique, de tels mélanges sont encore indissociables et, même si leur existence doit être envisagée, la thyroglobuline dont nous avons décrit la préparation dans ce travail peut, en première approximation, être considérée comme une protéine pure.

RÉSUMÉ

1. L'étude de la solubilité à concentrations croissantes en divers sels neutres (sulfate d'ammonium, sulfate de sodium, mélange équimoléculaire de phosphates mono- et dipotassique) des protéines présentes dans les extraits bruts de corps thyroïde (Bœuf, Cheval, Chien, Porc) a permis de définir les constituants protéiques de ces milieux et d'y localiser trois fractions thyroglobuliniques. Celles-ci présentent des caractères de solubilité constants en présence d'un sel neutre déterminé, à un pH et à une température bien définis, en sorte qu'on peut les séparer des protéines qui les accompagnent en se basant sur nos observations. La dénaturation de ces fractions, très sensibles à des pH inférieurs, à 5,0, provoque une importante diminution de leur solubilité et peut être décelée grâce à celle-ci. L'étude de la teneur en iodé et en phosphore des protéines précipitées à des concentrations croissantes en sels neutres a permis de préciser les conditions dans lesquelles il convient de se placer pour réaliser cette opération en obtenant une protéine non dénaturée, dépourvue d'impuretés phosphorées (nucléoprotéides et lipoprotéides) et dont la teneur en iodé est uniforme dans toutes ses fractions. L'examen des produits préparés par les méthodes antérieurement décrites, y a décelé des impuretés non iodées en proportion appréciable et, dans certains cas, des produits de dénaturation de la thyroglobuline.

2. Les caractères de solubilité des préparations de thyroglobuline pure et non dénaturée sont indépendants de sa teneur en iodé et en acides aminés iodés. Cette protéine présente à certains égards la même composition dans toutes les fractions que l'on a pu en séparer des précipitations successives à des concentrations croissantes en divers sels neutres. Il en découle que la teneur en iodé des thyroglobulines pures doit être considérée comme variable et que le taux de ce constituant ne saurait servir de critère pour apprécier le degré de pureté des préparations. La thyroglobuline est probablement une protéine de composition en acides aminés non iodés et de structure pratiquement constantes, mais dont le degré d'ioduration varie dans diverses conditions physiologiques.

3. Dans les extraits thyroïdiens comme dans les préparations purifiées, la thyroglobuline est comprise dans trois fractions protéiques qu'il est possible de distinguer par leurs caractères de solubilité (courbes de relargage et test de NORTHROP). Ces trois fractions sont iodées à un même taux et il est probable qu'elles correspondent à des degrés divers d'association des molécules de thyroglobuline dans les conditions où nous nous sommes placés.

4. Aucune différence de solubilité n'a été relevée entre les thyroglobulines de mammifères de diverses espèces. Il en découle que la méthode de préparation proposée peut être appliquée sans adaptation particulière aux organes de Bœuf, de Cheval, de Chien et de Porc.

SUMMARY

1. The study at increasing concentrations in various neutral salts (ammonium sulphate, sodium sulphate, equimolecular mixture of mono- and di-potassium phosphates) of the solubility of proteins present in crude thyroid extracts (ox, horse, dog, pig) has made it possible to define the protein constituents of these media and to localise therein three thyroglobulin fractions. The latter, in the presence of a given neutral salt and at welldefined pH and temperature, have constant solubility.

characteristics such that on the basis of our observations it is possible to separate them from accompanying proteins. Denaturation of these fractions, which are very sensitive to pH below 5.0, brings about a significant lowering of solubility and may be detected in this way. Study of the iodine and phosphorus contents of the proteins precipitated at increasing concentrations of neutral salts has made it possible to define the conditions for obtaining an undenatured protein, free from phosphorus-containing impurities (nucleoproteins and lipoproteins), whose iodine content is the same in all fractions. Examination of the products prepared as above has revealed appreciable proportions of non-iodinated impurities and, in certain cases, denaturation products of thyroglobulin.

2. The solubility characteristics of the thyroglobulin preparations are independent of their content of iodine and iodinated amino acids. In addition, this protein presents in certain respects the same composition in all the fractions which it is possible to separate by successive precipitations in increasing concentrations of various neutral salts. It follows that the iodine content of pure thyroglobulin must be considered as variable and that estimation of this constituent is no criterion of purity. Thyroglobulin is probably a protein of practically constant structure and composition in non-iodinated amino acids, but whose degree of iodination varies with different physiological conditions.

3. Both in thyroid extracts and purified preparations thyroglobulin contains three protein fractions which it is possible to distinguish by their solubility characteristics (salting out curves and the NORTHROP test). These three fractions are iodinated to the same extent and it is probable that they correspond to different degrees of association of the thyroglobulin molecules.

4. No difference in solubility has been revealed between thyroglobulins from different mammals. It follows that the method of preparation proposed here may be applied without special modification to the organs of ox, horse, dog and pig.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Untersuchung der Löslichkeit der in Rohextrakten der Schilddrüse (Rind, Pferd, Hund, Schwein) vorhandenen Eiweisskörper bei steigenden Konzentrationen verschiedener neutraler Salze (Ammoniumsulfat, Natriumsulfat, aequimolares Gemisch von Mono- und Dikaliumphosphat) gestattete es, die Eiweissbestandteile in diesen Milieus zu definieren und darin drei Thyroglobulinfraktionen zu lokalisieren. Diese haben, bei Anwesenheit eines bestimmten Neutralsalzes und bei bestimmten pH und Temperatur, eine konstante Löslichkeit, und zwar so, dass man sie auf Grund unserer Beobachtungen von den begleitenden Eiweißen trennen kann. Die Denaturierung dieser Fraktionen, die für pH -Werte unterhalb von 5.0 sehr empfindlich sind, hat eine bedeutende Erniedrigung ihrer Löslichkeit zufolge und kann dadurch gezeigt werden. Die Untersuchung des Jod- und Phosphorgehaltes der bei steigenden Neutralsalzkonzentrationen präzipitierten Eiweisskörper ermöglichte die Präzisierung der Bedingungen, die man dabei anwenden muss, um ein nicht-denaturiertes Eiweiss, das arm an phosphorhaltigen Verunreinigungen (Nukleoproteide und Lipoproteide) ist, und dessen Jodgehalte in allen Fraktionen konstant ist, zu erhalten. Die Prüfung der nach früheren Methoden bereiteten Produkte zeigte darin jodfreie Verunreinigungen in beträchtlichen Mengen, und in gewissen Fällen Denaturierungsprodukte des Thyroglobulins an.

2. Die Löslichkeitseigenschaften der reinen und undenaturierten Thyroglobulinpräparate sind unabhängig von ihrem Gehalt an Jod und an jodhaltigen Aminosäuren. Außerdem hat dieses Eiweiss in gewisser Beziehung dieselbe Zusammensetzung in allen Fraktionen, die man durch Fällungen bei steigenden Neutralsalzkonzentrationen nacheinander trennen kann. Daraus folgt, dass der Jodgehalt reiner Thyroglobuline als variabel betrachtet werden muss, und dass er nicht als Kriterium dienen sollte, um den Reinheitsgrad von Präparaten zu beurteilen. Das Thyroglobulin ist wahrscheinlich ein Eiweiss dessen Zusammensetzung aus jodfreien Aminosäuren und dessen Struktur praktisch konstant sind, dessen Jodierungsgrad sich aber bei verschiedenen physiologischen Bedingungen ändert.

3. Sowohl in Schilddrüsenextrakten wie bei den gereinigten Präparaten besteht das Thyroglobulin aus drei Eiweissfraktionen, die durch ihre Löslichkeitseigenschaften unterschieden werden können (Aussalzungskurven und NORTHROP-Test). Die drei Fraktionen haben den gleichen Jodgehalt und entsprechen wahrscheinlich verschiedenen Assoziationsgraden von Thyroglobulinmolekülen.

4. Zwischen den Thyroglobulinen verschiedener Säugetiere bestand kein Löslichkeitsunterschied. Es zeigte sich, dass die vorgeschlagene Bereitungsmethode ohne besondere Anpassung auf Organe von Rind, Pferd, Hund und Schwein angewandt werden kann.

BIBLIOGRAPHIE

¹ E. BAUMANN UND E. ROOS, *Z. physiol. Chem.*, 21 (1895) 481.

² N. A. BUBNOW, *Z. physiol. Chem.*, 8 (1884) 1.

³ F. GOURLAY, *J. Physiol.*, 16 (1894) 23.

- 4 R. HUTCHISON, *J. Physiol.*, 23 (1898-99) 178.
- 5 A. OSWALD, *Z. physiol. Chem.*, 27 (1899) 14.
- 6 M. HEIDELBERGER AND W. W. PALMER, *J. biol. Chem.*, 101 (1933) 433.
- 7 J. W. CAVETT AND S. E. SELJESKÖG, *J. biol. Chem.*, 100 (1933) XXIV.
- 8 M. HEIDELBERGER AND T. SVEDEBERG, *Science*, 80 (1934) 414.
- 9 M. HEIDELBERGER AND K. O. PEDERSEN, *J. gen. Physiol.*, 19 (1935) 95.
- 10 H. P. LUNDGREN, *Nature*, 138 (1936) 122.
- 11 I. ABELIN UND A. KELLER, *Helv. chim. Acta*, 22 (1939) 1365.
- 12 BLUM, LEHMAN UND LEISTNER, cité d'après S. RAUCH, Zur Chemie und Physiologie der diiodotyrosinhaltigen Bestandteile des Thyroglobulins, *These doct. Med.*, Berne (1945) 76.
- 13 C. RIVIÈRE, C. GAUTRON ET M. THÉLY, *Compt. rend.*, 224 (1947) 423.
- 14 Y. DERRIEN, *Svensk Kem. Tid.*, 59 (1947) 139.
- 15 J. H. NORTHROP AND M. KUNITZ, *J. gen. Physiol.*, 13 (1930) 781.
- 16 C. R. HARRINGTON, *Fortschritte der Chemie der organischen Naturstoffe*, II (1933) 1 vol., 366 p. (ref. p. 112), J. Springer ed., Wien.
- 17 J. W. CAVETT, C. O. RICE AND J. F. MACCLENDON, *J. biol. Chem.*, 110 (1935) 673.
- 18 A. ROCHE ET F. MARQUET, *Bull. soc. chim. biol.*, 17 (1936) 1630.
- 20 T. LEIPERT, *Mikrochem.*, (Pregl's Festschrift), 266 (1929).
- 21 R. MICHEL ET M. LAFON, *Bull. soc. chim. biol.*, 27 (1945) 644.
- 22 C. DUMAZERT ET M. MOURGUE, *Bull. soc. chim. biol.*, 21 (1939) 1151.
- 23 R. MICHEL ET R. LAFON, *Compt. rend. soc. biol.*, 140 (1946) 634.
- 23 C. R. HARRINGTON, Revue d'ensemble sur les récentes acquisitions de la biochimie du corps thyroïde, *J. Chem. Soc.* (1944) 193.
- 25 M. E. MORTON AND I. L. CHAIKOFF, *J. biol. Chem.*, 147 (1943) 1.
- 26 W. LUDWIG UND P. VON MUTZENBECHER, *Z. physiol. Chem.*, 258 (1939) 195.
- 27 W. T. SALTER, The Chemistry and Physiology of Hormones, Euthyroidism and thyroid dysfunction (1944), 104-128 cité d'après *Annual Review of Biochemistry*, 14 (1945) 566.
- 28 J. ROCHE, R. MICHEL ET M. LAFON, *Compt. rend. soc. biol.*, 141 (1947) 301.

Reçu le 21 mai 1948