

L'ACTION DE L'IODE SUR LE TRYPTOPHANE DANS LES PROTÉINES ET A L'ÉTAT LIBRE

par

JEAN ROCHE ET RAYMOND MICHEL

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Marseille (France)

I. INTRODUCTION ET OBJET DU TRAVAIL

L'action de l'iode sur les protéines comporte la fixation de l'halogène à celles-ci et des processus d'oxydation. La première a depuis longtemps été localisée principalement sur la tyrosine; elle conduit en effet à la formation de thyroxine, de diiodotyrosine et de monoiodotyrosine (LUDWIG et VON MUTZENBECHER¹) selon des modalités que nous avons étudiées avec LAFON², et, très probablement, à celle de diiodohistidine (PAULY³, BLUM et STRAUSS⁴, BAUER et STRAUSS⁵). Or, HOFMEISTER⁶, puis OSWALD⁷, BLUM et STRAUSS⁵, ont par ailleurs observé que non seulement les réactions de MILLON et de PAULY, mais aussi celle d'ADAMKIEWICZ, propre au tryptophane dans les protéines, devient négative au cours de l'ioduration de celles-ci. Comme la formation de diiodotyrosine et de thyroxine aux dépens de la tyrosine explique alors la disparition d'un caractère particulier à cet acide aminé, on peut se demander dans quelle mesure une ioduration nucléaire du tryptophane n'explique pas les faits observés en ce qui concerne la réaction d'ADAMKIEWICZ. Divers auteurs, entre autres MUUS, COONS et SALTER⁸, ABELIN⁹ ont admis que cet acide aminé participe à l'ioduration des protéines. Par contre, PAULY³, dont les conclusions ont été adoptées par REINEKE¹⁰, n'a pas réussi à ioder le tryptophane libre, lequel est, pour lui, oxydé par l'halogène sans donner au préalable naissance à un dérivé de substitution dans les protéines. Aussi y avait-il lieu d'entreprendre des recherches sur la nature de l'action de l'iode sur le tryptophane, tant dans les protéines qu'à l'état libre. L'objet de ce mémoire est d'exposer celles que nous avons poursuivies dans ce but.

II. RECHERCHES PERSONNELLES

Nous nous sommes proposés de doser le tryptophane dans les protéines iodées afin d'étudier sa disparition dans celles-ci en fonction de leur degré d'halogénéation. Par la suite, nous avons cherché à établir le mécanisme de l'action de l'iode sur cet acide aminé, tant dans les protéines qu'en solution pure.

A. Action de l'iode sur le tryptophane dans les protéines. L'étude que nous nous proposons de faire a tout d'abord exigé des essais sur le dosage du tryptophane dans les iodoprotéines. Celui-ci s'est en effet révélé impossible par les méthodes usuelles basées sur les réactions aldéhydiques de l'indylalanine, en raison de l'oxydation du formol ou des autres aldéhydes qu'elles mettent en oeuvre par l'iode libéré au cours des opéra-

tions. Par contre, l'application de la méthode de LUGG¹¹, reposant sur la colorimétrie de la réaction brun-rouge se développant dans les mêmes conditions que celle de MILLON après séparation du tryptophane à l'état de combinaison mercurique, s'est montrée satisfaisante. Nous l'avons utilisée en substituant aux mesures colorimétriques des dosages au photomètre de PULFRICH (filtre S₄₇), en nous référant à une courbe d'étalonnage; cette dernière est une droite pour des quantités de tryptophane comprises entre 0.125 et 0.750 mg. Ni la thyroxine, ni la diiodotyrosine et la monoiodotyrosine, ni les iodures n'en altèrent la précision et la fidélité; il en est de même de l'ensemble des acides aminés halogénés de l'iodozéine, protéine ne renfermant pas de tryptophane. La méthode est exacte à 5 % près pour des teneurs en tryptophane de 0.5 % et au-dessus; elle est sensiblement moindre pour des produits plus pauvres en indylalanine.

Nous avons pris comme matériel d'étude des caséines et des thyroglobulines iodées dont la préparation a été décrite dans un travail antérieur². Une série d'entre elles a été halogénée à $p_H = 7.4$ par l'iode en poudre ajouté à une solution de protéine additionnée de bicarbonate de sodium (REINEKE et TURNER¹²); une autre l'a été en milieu ammoniacal (5 %) par un procédé très voisin de celui décrit par VON MUTZENBECHER¹³. L'ioduration en présence de quantités diverses d'halogène nous a permis de disposer de produits dont les teneurs en iode, déterminées par la méthode de LIEPERT¹⁴, s'échelonnent dans des limites très larges. 200 mg de chacun ont été hydrolysés par 5 ml de soude 5 N à 100° en tube scellé pendant 20 heures et traités en vue du dosage du tryptophane selon LUGG. Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau I.

TABLEAU I

TENEUR EN TRYPTOPHANE D'IODOCASÉINES ET D'IODOTHYROGLOBULINES PRÉPARÉES DANS DES CONDITIONS DIVERSES

Nombre d'atomes I mis en œuvre par mol de tyrosine pour halogéner la protéine	Caséine iodée				Thyroglobuline iodée, CO ₃ NaH, $p_H = 7.4$	
	sol. CO ₃ NaH, $p_H = 7.4$		sol. NH ₄ OH 5 %		I %	Tryptophane %
	I %	Tryptophane %	I %	Tryptophane %		
0	0	1.50	0	1.50	0.27	2.50
0.95	1.95	1.47	—	—	—	—
1.00	—	—	1.62	1.07	0.50	1.80
2.00	—	—	—	—	1.41	1.94
2.75	—	—	4.67	0.60	1.23	1.52
2.83	5.12	1.31	—	—	—	—
4.50	6.76	1.09	7.85	0.44	2.06	1.62
6.00	—	—	—	—	3.52	1.49
6.90	8.08	0.82	—	—	—	—
7.00	—	—	11.50	0.33	3.65	1.40
10.00	9.20	0.33	11.10	0.10	5.17	1.07

La teneur en tryptophane diminue donc progressivement en fonction du degré d'ioduration de la protéine dans chacune des trois séries de préparations. Néanmoins des différences se manifestent à cet égard, d'une part, entre la caséine et la thyroglobuline et, d'autre part, selon les modalités de l'ioduration d'une même protéine. La caséine, plus riche en tyrosine que la thyroglobuline, fixe relativement plus d'iode, surtout en milieu ammoniacal (iodure d'azote). La diminution du taux du tryptophane

dans ce dernier cas est très importante; elle répond alors à des conditions particulièrement favorables soit à une réaction de substitution, soit à la dégradation de l'acide aminé. Par ailleurs, une partie de l'acide aminé présente dans la thyroglobuline une labilité plus grande que dans la caséine, puisque son taux est réduit d'environ 25 % dans la première après action d'un atome d'iode par molécule de tyrosine à $p_H = 7.4$, alors que tel n'est pas le cas dans la seconde. Ce fait doit être relié à la diversité de structure des deux protéines. De toute manière, une disparition très importante de l'indylalanine ne se manifeste dans tous les cas qu'à un degré d'halogénéation élevé, lorsque l'ioduration de la tyrosine est complète*.

La diminution d'intensité de la réaction colorée sur laquelle repose la méthode de LUGG ne peut être interprétée simplement. Selon cet auteur, l'indol et ses dérivés dans lesquels l'atome d'hydrogène α du cycle pyrrolique n'est pas substitué présentent la propriété de se colorer en brun-rouge dans les conditions choisies. Dès lors, deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer les faits observés. Ceux-ci peuvent traduire soit une ioduration progressive du tryptophane avec formation d'un dérivé de substitution nucléaire ne donnant pas la réaction colorée, soit une oxydation détruisant le cycle pyrrolique. La première éventualité apparaît comme peu probable à la suite d'expériences au cours desquelles nous avons cherché à décomposer les combinaisons iodées du tryptophane éventuellement présentes.

Lorsque la diiodotyrosine est traitée à 100° par le stannite de sodium, elle perd progressivement son iode en régénérant de la monoiodotyrosine, puis de la tyrosine, phénomène sur lequel BRAND et KASSEL¹⁵ ont basé une méthode de dosage dont nous avons antérieurement fait la critique¹⁶. Nous avons recherché si pareil traitement faisait réapparaître du tryptophane lorsqu'il est appliqué aux iodoprotéines dans lesquelles une partie de cet acide aminé est soit "dissimulé" en raison de son halogénéation, soit détruit. 100 mg de diverses iodoprotéines (caséines) ont été additionnés de 2 ml d'une

TABLEAU II
DÉSIODURATION D'IDOCASÉINES PAR ACTION DU STANNITE DE SODIUM À 100°

Condition d'étude de la protéine	Tryptophane %	Tyrosine %	Monoiodotyrosine %
Caséine iodée à $p_H = 7.4$ (CO_3NaH); I % = 8.80; diiodotyrosine % = 6.52			
avant désioduration	0.82	0.10	1.66
après désioduration	0.71	2.80	3.60
Caséine iodée à $p_H = 7.4$ (CO_3NaH); I % = 9.20; diiodotyrosine % = 3.76			
avant désioduration	0.30	0	0
après désioduration	0.20	2.47	4.72
Caséine iodée en sol. NH_4OH ; I % = 7.85; diiodotyrosine % = 3.76			
avant désioduration	0.40	0.10	6.22
après désioduration	0.30	2.70	5.10
Caséine iodée en sol. NH_4OH ; I % = 11.50; diiodotyrosine % = 9.30			
avant désioduration	0.30	0	0.80
après désioduration	0.26	2.20	2.50

* La disparition totale de la réaction d'ADAMKIEWICZ dans les protéines iodées au maximum par les auteurs dont les travaux ont été cités plus haut est due au manque de fidélité des réactions aldéhydiques du tryptophane en présence de traces d'iode.

solution aqueuse renfermant 5 g de chlorure stanneux et 22 g de soude par 100 ml, dans un tube à essai que l'on a scellé sous vide. Après séjour de 20 heures à 100°, le tryptophane a été dosé par la méthode de LUGG et des dosages de tyrosine et de moniodotyrosine (ROCHE et MICHEL¹⁶) ont été faits par ailleurs pour contrôler l'efficacité de l'action du stannite de sodium. Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau II.

La constance, aux erreurs d'expérience près, de la teneur en tryptophane des caséines avant et après désioduration par le stannite de sodium contraste avec la régénération de la tyrosine et de la moniodotyrosine due à cette dernière. Dès lors, il est peu probable que les iodoprotéines renferment un dérivé halogéné du tryptophane; cet acide aminé doit plutôt être oxydé au cours de la préparation des iodocaséines.

B. Action de l'iode sur le tryptophane en solution pure. La fixation de l'iode au cycle indolique du tryptophane envisagée par NEUBERG¹⁷ n'a pas pu être démontrée expérimentalement et, pour PAULY³, l'acide aminé soumis à l'action de l'iode serait oxydé sans présenter au préalable de substitution nucléaire. Il se comporterait à cet égard d'une toute autre manière que la tyrosine et que l'histidine, dont des dérivés diiodés stables prennent alors naissance (OSWALD¹⁸, WHEELER et JAMIESON¹⁹, LI²⁰). Des essais préliminaires ont montré à l'un de nous²¹ que le tryptophane en solution ammoniacale réagit avec l'iode, sans que la nature de ce processus ait été précisée. Nous avons cherché à la définir en dosant l'iode libre, les iodures et le tryptophane dans des solutions de celui-ci additionnées de quantités croissantes d'halogène. En effet, les réactions de substitution donnant naissance à de l'acide iodhydrique selon l'équation: $RH + I_2 = RI + HI$, on pouvait espérer suivre leur évolution par l'établissement de bilans des corps y participant. Nous avons poursuivi à ce sujet les expériences suivantes:

1. Action de l'iode en milieu boraté. 5 ml de solution à 1.05 % de tryptophane ($p_H = 8.4$) sont additionnés de 20 ml d'une solution tampon borato-borâtée (SØRENSEN) de $p_H = 8.5$ et d'iode en poudre, mis en œuvre en quantités croissantes. Après séjour de 32 heures à 37° en flacon émeri au cours duquel on agite fréquemment, on refroidit

TABLEAU III
ACTION DE L'IODE SUR LE TRYPTOPHANE A L'ÉTAT LIBRE

Iode mis en œuvre		mg retrouvés en fin d'expérience			Bilan d'I (mg): (b + c) — a
mg dans l'essai (a)	atomes I par molécule de tryptophane	Tryptophane	Iode libre (b)	Iode des iodures (c)	
<i>A. Essais en milieu boraté</i>					
0	0	51	0	0	0
63.5	2	32.5	0	59.5	— 4
127.0	4	14.7	0	124	— 3
190.5	6	3.5	0	190	— 0.5
254.0	8	1.9	13	238	— 3
<i>B. Essais en milieu bicarbonaté</i>					
0	0	51	0	0	0
63.5	2	27.8	0	60	— 3.5
127.0	4	10.4	0	125	— 2
190.5	6	4.5	0	195	+ 4.5
254.0	8	1.8	27	219	— 8

à 0° et l'on extrait l'iode par le sulfure de carbone après acidification. L'halogène libre ainsi séparé est dosé colorimétriquement au photomètre de PULFRICH (filtre S_{50}) en se reportant à une courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions sur des solutions titrées. L'iode des iodures est dosé par la même technique, après élimination de l'halogène libre et action du nitrite de sodium en milieu acide, et le tryptophane par la méthode de LUGG sur une prise d'essai extraite au sulfure de carbone.

2. Action de l'iode en milieu bicarbonaté. 5 ml de solution à 1.05 % de tryptophane ($p_H = 8.4$) sont placés dans un tube à essai de 40 ml avec 15 ml d'eau, 5 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 3.5 % et des quantités croissantes d'iode pulvérisé. On scelle sous vide les récipients, que l'on place 22 heures à 37° en les agitant de temps en temps. L'iode libre, celui présent dans les iodures et le tryptophane sont dosés en fin d'expériences par les techniques indiquées plus haut. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III.

On n'observe donc aucune fixation appréciable d'iode au tryptophane dans les conditions de nos expériences. L'acide aminé disparaît du milieu en même temps que l'halogène, lequel est quantitativement réduit en hydracide. Un très léger excès d'iode (5 à 10 %) demeure présent lorsque 8 atomes I réagissent avec 1 molécule de l'acide aminé; mais on ne saurait donner une représentation simple de la réaction d'oxydation, car le rapport du nombre de molécules de tryptophane dégradées au nombre d'atomes d'iode réduits diminue en fonction de la quantité d'halogène mise en œuvre. De toute manière, comme la réaction colorée propre aux dérivés indoliques à noyau pyrrolique intact et non substitué en α disparaît en même temps que l'iode est réduit, il y a lieu d'admettre que l'oxydation du tryptophane comporte alors la rupture du cycle pyrrolique.

III. DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

L'iode participe à des réactions nucléaires de substitution avec la tyrosine et l'histidine lorsqu'il se combine aux protéines. L'ensemble de nos résultats montre que le tryptophane ne se comporte pas à cet égard comme ces acides aminés, même en présence d'un fort excès d'halogène. En effet, on observe bien alors une diminution progressive de l'intensité des réactions colorées qui caractérisent l'indylalanine, mais celle-ci n'est pas régénérée dans les conditions où la diiodotyrosine est desiodée par action du stannite de sodium. Ce fait implique soit l'absence d'iodotryptophane dans les protéines halogénées, soit la dégradation par l'iode du cycle pyrrolique de l'indylalanine.

La seconde hypothèse doit être adoptée. En effet, la totalité de l'iode réagissant avec le tryptophane en solution pure donne naissance à de l'acide iodhydrique, ce qui exclut la formation d'un dérivé halogéné. Comme la réaction colorée permettant de doser le tryptophane devient alors de plus en plus faible, il en découle que l'action oxydante de l'iode conduit à la destruction du cycle indolique, probablement par ouverture du noyau pyrrol. Au demeurant, si l'on calcule la teneur en iode théorique des protéines saturées d'halogène en admettant que la totalité de la tyrosine et de l'histidine y existent à l'état de dérivés diiodés, les valeurs obtenues sont peu éloignées de celles déterminées par dosage. Toutefois, comme une partie des acides aminés est alors oxydée par l'iode, il n'était pas possible d'exclure sans preuves la formation de dérivés iodés du tryptophane par action de l'halogène sur les protéines.

RÉSUMÉ

1. L'ioduration de la caséine et de la thyroglobuline dans diverses conditions provoque une diminution progressive de la teneur en tryptophane de ces protéines, déterminée par la méthode de LUGG, dont l'application aux protéines iodées a été réalisée. Les faits observés peuvent traduire soit la formation d'un dérivé iodé du tryptophane, soit l'oxydation de celui-ci.

2. La désioduration au moyen du stannite de sodium des protéines halogénées libère de la tyrosine et de la monoiodotyrosine à partir de la diiodotyrosine. Elle ne fait, par contre, pas réapparaître de tryptophane. Il est donc très peu probable que les iodoprotéines renferment un dérivé iodé de celui-ci.

3. Le tryptophane traité par l'iode en solution neutre ou faiblement alcaline est oxydé sans donner naissance préalablement à un dérivé de substitution, car la totalité de l'halogène réagissant est réduit en acide iodhydrique. Il y a tout lieu d'admettre qu'il en est de même dans les protéines, dont la tyrosine et l'histidine sont, dès lors, les seuls acides aminés dont celles-ci renferment en quantité importante des dérivés iodés après action de l'halogène.

SUMMARY

1. The iodination of casein and thyroglobulin under various conditions results in a progressive diminution of the tryptophan contents as estimated by LUGG's method, the application of which to iodinated proteins has been worked out. The observations can be explained in terms of either an iodinated derivative of tryptophan or its oxidation.

2. The de-iodination of halogenated proteins by sodium stannite liberates tyrosine and monoiodotyrosine from di-iodotyrosine, but the reaction does not liberate any tryptophan from iodoproteins. It is thus improbable that these proteins contain an iodo-tryptophan.

3. Tryptophan treated with iodine in neutral or slightly alkaline solutions is oxidised without previous substitution, the iodine being reduced quantitatively in hydriodic acid. This is most likely to happen also in proteins, in which tyrosine and histidine are the only amino acids liable to be iodinated in important amounts.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Jodierung des Caseins und Thyreoglobulins unter verschiedenen Bedingungen verursacht eine fortschreitende Verminderung des Tryptophangehaltes dieser Eiweisskörper. Der Tryptophangehalt wurde mit der Methode von LUGG bestimmt, deren Anwendung auf jodierte Eiweisskörper ausgearbeitet wurde. Die Wahrnehmungen können entweder als Bildung eines jodhaltigen Tryptophanderivats oder als Oxydation des Tryptophans interpretiert werden.

2. Die Dejodierung halogenierter Eiweisskörper mit Hilfe von Natriumstannit setzt, wenn von Dijodtyrosin ausgegangen wird, Tyrosin und Monojodtyrosin frei. Dabei erscheint jedoch Tryptophan nicht wieder. Es ist deshalb wenig wahrscheinlich, dass die Jodeiweisse ein jodhaltiges Derivat des Tryptophans enthalten.

3. Tryptophan, das in neutraler oder schwach alkalischer Lösung mit Jod behandelt wurde, wird oxydiert, ohne dass daraus erst ein Substitutionsderivat entsteht; die Gesamtmenge des reagierenden Halogens wird nämlich zu Jodwasserstoffsäure reduziert. Man kann ziemlich sicher annehmen, dass es in den Eiweisskörpern auch so ist. Tyrosin und Histidin sind also die einzigen Aminosäuren in Eiweisskörpern, deren jodhaltige Derivate nach Halogeneinwirkung in bedeutenden Mengen in Eiweisskörpern vorkommen.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ W. LUDWIG ET P. VON MUTZENBECHER, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 258 (1939) 195.
- ² J. ROCHE, R. MICHEL ET M. LAFON, *Biochim. et biophys. Act.*, 1 (1947).
- ³ H. PAULY, *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, 43 (1910) 2243.
- ⁴ F. BLUM ET E. STRAUSS, *Z. f. physiol. Chem.*, 112 (1921) 111.
- ⁵ H. BAUER ET E. STRAUSS, *Biochem. Z.*, 284 (1936) 197.
- ⁶ F. HOFMEISTER, *Z. f. physiol. Chem.*, 24 (1898) 159.
- ⁷ A. OSWALD, *Z. f. physiol. Chem.*, 27 (1899) 14.
- ⁸ J. MUUS, A. H. COONS ET W. T. SALTER, *J. biol. Chem.*, 139 (1941) 135.
- ⁹ I. ABELIN, *Helv. chim. Act.*, 25 (1942) 1421.
- ¹⁰ E. P. REINEKE, *Vitamins and hormones*, 4 (1946) 207.

- ¹¹ J. W. H. LUGG, *Biochem. J.*, 31 (1937) 1422.
- ¹² E. P. REINEKE ET C. W. TURNER, *J. biol. Chem.*, 161 (1945) 613.
- ¹³ P. VON MUTZENBECHER, *Z. f. physiol. Chem.*, 261 (1939) 253.
- ¹⁴ T. LIEPERT, *Mikrochem. (PREGLS Festschr.)* (1929) 266.
- ¹⁵ E. BRAND ET B. J. KASSEL, *J. biol. Chem.*, 131 (1939) 489.
- ¹⁶ J. ROCHE ET R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 335.
- ¹⁷ C. NEUBERG, *Biochem. Z.*, 24 (1910) 423.
- ¹⁸ H. S. WHEELER ET G. S. JAMIESON, *Amer. chem. J.*, 33 (1905) 365.
- ¹⁹ A. OSWALD, *Z. f. physiol. Chem.*, 70 (1910) 310.
- ²⁰ C. H. LI, *J. Am. Chem. Soc.*, 66 (1944) 225.
- ²¹ R. MICHEL, *Thèse Doct. Pharm. (Etat)* Marseille, 1944, 1 vol., 89 p., Declume éd., Lons le Saunier.

Reçu le 11 Décembre 1947