

RECHERCHES SUR LA PRÉPARATION ET SUR LES PROPRIÉTÉS DE LA THYROGLOBULINE PURE. II

par

YVES DERRIEN, RAYMOND MICHEI, KAI O. PEDERSEN ET JEAN ROCHE

Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris (France)

et

Institut de Chimie physique, Université d'Upsala (Suède)

La préparation de thyroglobuline pure au cours d'un précédent travail¹ méritait d'être suivie de recherches sur les propriétés de cette protéine. En effet, les données existant actuellement à ce sujet ont été établies sur des produits plus ou moins impurs et parfois dénaturés; elles présentent, de ce fait, un caractère provisoire et seules celles déterminées par HEIDELBERGER ET SVEDBERG², HEIDELBERGER ET PEDERSEN³, LUNDGREN⁴ sur l'ultracentrifugation et le point iso-électrique de cette protéine, par CAVETT, RICE ET MAC CLENDON⁵ sur sa composition en acides aminés non-iodés, peuvent légitimement être retenues. Quant aux teneurs en iodé et en thyroxine de la thyroglobuline dont le rapport (I thyroxinien/I total = 0.3) est à peu près constant⁶, leur variabilité d'une préparation à l'autre¹ pose un problème particulier. Deux hypothèses peuvent être faites pour l'expliquer, soit que le processus d'ioduration de la protéine, physiologiquement plus ou moins intense, s'exerce toujours sur un substrat identique, soit que la teneur en thyroxine de celui-ci et sa structure, variables, régissent la formation de l'hormone. Aussi la composition en acides aminés de la thyroxine de diverses origines devait-elle être étudiée.

Le but de ce travail est de définir: 1. certains caractères physicochimiques de la thyroglobuline pure; 2. la composition en acides aminés de la même protéine extraite de corps thyroïdes normaux ou hypertrophiés de divers mammifères.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les thyroglobulines pures étudiées ont été préparées par la méthode décrite dans le premier mémoire de cette série¹, à partir de lots homogènes (0.25 à 1.50 kg) de corps thyroïdes de Bœuf, de Porc et d'un petit nombre de glandes de Chien. Dans le cas des deux premières espèces, il a été possible de disposer non seulement d'organes normaux (12 à 15 g), mais aussi de glandes fortement hypertrophiées (80 à 115 g). La pureté des produits sur lesquels ont été poursuivies nos recherches a été contrôlée par l'établissement de courbes de solubilité, dont certaines figurent dans notre précédent travail; tous précipitaient entre 36 et 41% de la saturation en sulfate d'ammonium à pH = 6.5 et à 22°C (concentration en N protéique des essais: 1.5-2.0 mg N/ml).

A. PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES

En dehors de la solubilité des préparations en fonction de la concentration en sels neutres, à p_H et température constantes, nous avons étudié diverses propriétés de la thyroglobuline (Porc, animaux nongoîtreux) afin d'en préciser les caractères. Les données obtenues ont été déterminées à l'Institut de Physicochimie de l'Université d'Upsala au moyen de méthodes aujourd'hui classiques, en sorte qu'il n'y a pas lieu d'en rappeler ici le principe et les modalités d'application*.

1. *Ultracentrifugation* (SVEDBERG). Les variations de la constante de sédimentation s , exprimée en unités Svedberg, en fonction de la concentration en protéine, mesurée par la différence de l'indice de réfraction Δn des solutions dialysées contre $C\text{Na}$ 0.2 M et d'une solution de $C\text{Na}$ 0.2 M, sont les suivantes:

$\Delta n \cdot 10^{-5}$	s_{20}
0.00427	16.8
0.00073	18.9
0.00037	18.6
0.00018	19.9
0.00009	19.3

La valeur de la constante de sédimentation s_{20} pour $\Delta n = 0$, calculée par extrapolation à la concentration zéro définie à l'aide des données précédentes, est égale à $s^0_{20} = 19.4$ S.

2. *Diffusion* (LAMM). D_A et D_M ont été respectivement calculées par les méthodes de l'aire et par celle du moment, établies par GRALÉN.

$$D_A = 2.60 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$$

$$D_M = 2.61 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$$

3. *Volume spécifique partiel*. La détermination de celui-ci, basée sur des mesures picnométriques de densité, a donné les résultats suivants**:

Concentration en protéine (g p. 100 ml)	Volume spécifique partiel, V_{20}
1.090	0.721
0.626	0.725
Moyenne: 0.723	

4. *Poids moléculaire*. La formule de SVEDBERG, dans laquelle entrent, en dehors des données définies plus haut, la densité du solvant de la protéine ρ , R (constante des gaz) et T (température absolue) a permis de calculer le poids moléculaire M_s de la thyroglobuline pure.

$$M_s = \frac{RT \cdot s}{D(1 - V_\rho)} = 653000 \text{ (soit } 650000\text{)}$$

* L'un de nous (Y.D.) remercie très vivement les Professeurs SVEDBERG ET TISELIUS de l'avoir accueilli dans leurs laboratoires et les fondations (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE, FONDATION ROCKEFELLER et FONDATION NOBEL) qui ont bien voulu prendre les dispositions nécessaires pour permettre son séjour à l'Institut de Chimie physique de l'Université d'Upsala.

** Nous remercions le Docteur VIRGIL KOENIG d'avoir procédé à ces déterminations sous la direction du Professeur C. DRÜCKER.

5. *Mobilité électrophorétique* (TISELIUS-SVENSSON). A concentration voisine de 0.5% dans une solution tampon de phosphates alcalins de force ionique 0.2 et de pH = 7.68, à 0° et avec un gradient de potentiel de 6.75 volt/cm la thyroglobuline pure est électrophorétiquement homogène. Sa mobilité exprimée en $\text{cm}^2 \text{volt}^{-1} \text{sec}^{-1} \cdot 10^{-5}$ est alors:

$$\begin{array}{ll} \text{à l'anode: } & 4.62 \cdot 10^{-5} \\ \text{à la cathode: } & 4.46 \cdot 10^{-5} \end{array} \quad \text{mobilité moyenne: } 4.54 \cdot 10^{-5}$$

Les valeurs de la constante de sémentation et du poids moléculaire (déterminé par équilibre de sémination) sont voisines de celles obtenues par HEIDELBERGER ET SVEDBERG², HEIDELBERGER ET PEDERSEN³ sur les thyroglobulines d'Homme et de Porc, à savoir $s_{20}^0 = 19.2 \text{ S}$ et $M_s = 650000$. Les préparations étudiées par HEIDELBERGER ET PEDERSEN renfermaient toujours plus de 20% de constituants de poids moléculaires supérieur et inférieur à cette valeur, la proportion du constituant le plus léger s'élevant notablement dans des milieux très dilués. Il n'en est pas ainsi dans le cas des thyroglobulines pures sur lesquelles nos déterminations ont été effectuées. Cette protéine s'est comportée comme une substance homogène aux diverses dilutions étudiées à l'ultracentrifugation, comme à l'électrophorèse dans les conditions expérimentales indiquées plus haut. Il y a lieu de rappeler que, par contre, l'étude de sa solubilité à $\text{pH} = 6.50$ a permis d'y déceler trois fractions. Pareil fait a également été observé avec d'autres protéines et nous en poursuivons l'étude.

B. COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS

Nous nous sommes proposés, d'une part, d'étudier de manière aussi étendue qu'il nous était possible la composition de la thyroglobuline pure de Porc ($N = 15.8\%$) et, d'autre part, de comparer la teneur en certains acides aminés de la même protéine extraite du corps thyroïde de bœufs, de porcs et de chiens normaux ou goitreux (goître simple, de type colloïdal à l'examen histologique). Les résultats figurant dans les Tableaux I et II ont été obtenus par un ensemble de méthodes depuis longtemps éprouvées par deux d'entre nous (R.M. et J.R.)⁷ et l'erreur relative qu'ils comportent est en général nettement inférieure à $\pm 5.0\%$, sauf dans le cas de la leucine et de la valine, où cette limite est atteinte*. On les trouvera réunis ci-dessous.

TABLEAU I
TENEUR EN ACIDES AMINÉS DE LA THYROGLOBULINE PURE DE PORC

Nature de l'acide aminé	p. 100 présent dans la protéine	Nature de l'acide aminé	p. 100 présent dans la protéine	Nature de l'acide aminé	p. 100 présent dans la protéine
Arginine	12.72	Tyrosine	3.12	Alanine	7.40
Histidine	2.23	Diodotyrosine†	0.54	Glycocolle	3.70
Lysine	3.42	Thyroxine†	0.21	Leucine	12.80
Phénylalanine	6.68	Cystine	3.60	Valine	1.45
Tryptophane	2.08	Méthionine	1.30	Sérine	10.80

* Les teneurs en thyroxine et en diiodotyrosine, de même que celle en iodé total ($I = 0.48\%$) n'ont de signification qu'en ce qui concerne la préparation étudiée ici, puisqu'elles sont susceptibles de varier d'un produit à l'autre¹.

† Nous remercions le Professeur P. DESNUELLE (Marseille) d'avoir bien voulu doser la méthionine dans la thyroglobuline pure de Porc.

TABLEAU II

TENEURS EN IODE, EN THYROXINE, EN TYROSINE, EN TRYPTOPHANE ET EN CYSTINE DE THYROGLOBULINES PURES DE DIVERS ANIMAUX NORMAUX OU PORTEURS D'UN GOÛTRE SIMPLE (COLLOÏDAL)

Espèce animale, état et poids des glandes	I total %	Thyroxine %	Tyrosine %	Tryptophane %	Cystine %
Porc, gl. normales (14-16 g)	0.72	0.38	3.15	2.13	3.60
Porc, „ (14-16 g)	0.48	0.21	3.12	2.08	3.55
Porc, „ (14-16 g)	0.47	0.21	3.06	2.11	3.52
Porc, „ (14-16 g)	0.35	0.17	2.12	2.08	3.66
Porc, gl. hypertr. (115 g)	0.04	indosable	3.56	2.08	2.20
Bœuf, gl. normales (14 g)	0.74	0.34	3.55	2.27	3.50
Bœuf, „ (14 g)	0.63	0.29	3.50	2.28	3.55
Bœuf, gl. hypertr. (80 g)	0.01	indosable	5.52	2.25	1.60
Chien, gl. normales*	0.38	non dosée	3.46	2.28	non dosée

* Poids variant de 1 à 2 g selon celui des animaux.

La teneur en arginine élevée de la thyroglobuline avait été signalée par CAVETT^{5, 8}, ECKSTEIN⁹, WHITE¹⁰; toutefois nos préparations sont sensiblement plus riches en cet acide aminé que celles analysées par eux. Les teneurs en tyrosine et en tryptophane sont voisines dans les produits étudiés par ces auteurs, par BRAND, KASSEL ET HEIDEL-BERGER¹¹ et les nôtres. Par contre, des différences se manifestent entre les taux d'histidine et de cystine dans certaines préparations impures et ceux que nous avons déterminés sur le produit pur.

DISCUSSION

Les données physicochimiques établies sur la thyroglobuline pure n'appellent aucune discussion, étant l'expression de constantes caractéristiques de cette protéine. Par contre, la signification des résultats de nos analyses chimiques doit être dégagée.

Comme nous l'avons montré¹, les préparations de thyroglobuline pure provenant de lots divers de glandes normales (Bœuf et Porc) sont inégalement riches en iodé total, mais présentent une solubilité rigoureusement identique dans des milieux de concentration croissante en sels neutres, en sorte que l'on pouvait penser que leur degré d'halogénéation n'est pas lié à leur composition ou à leur structure, mais à l'activité d'un mécanisme physiologique indépendant de celles-ci. La thyroxine prend naissance par condensation de deux restes de diiodotyrosine provenant de l'halogénéation préalable de la tyrosine. Des écarts importants dans la teneur des préparations en les deux premiers acides aminés, renfermant respectivement 65.4 et 58.7 % I, ne sont pas susceptibles de modifier de manière sensible le taux de tyrosine, car ils portent sur des quantités très faibles de celle-ci dans les glandes normales (0.1-0.2%).^{*} La teneur en tyrosine de la thyroglobuline doit donc être relativement constante si le degré d'ioduration de la protéine n'est pas régi par elle. Or, tel est bien le cas et les résultats rassemblés dans le Tableau II montrent qu'il en est de même pour les taux du tryptophane et de la cystéine chez les animaux normaux d'une même espèce. Un ensemble de faits est donc acquis en faveur de l'hypothèse que nous avons antérieurement formulée en ce qui concerne la formation de l'hormone thyroïdienne au sein de la thyroglobuline, à savoir

* Un enrichissement de 0.200 % en thyroxine (P.M. = 777) est théoriquement compensé par une diminution de 0.093 % du taux de tyrosine (P.M. = 181).

que le corps thyroïde synthétise dans un premier temps cette protéine qui s'halogène par la suite. Protéinogenèse et formation de la diiodotyrosine et de la thyroxine sont des processus entièrement indépendants, le second évoluant sur un substrat toujours identique avec une intensité et une vitesse plus ou moins grandes.

La composition des thyroglobulines ne peut pas être caractérisée par une teneur en iode, mais seulement par le taux des acides aminés non iodés et par des constantes physicochimiques. Celles-ci n'ont été déterminées que dans les préparations de protéines de Porc, tandis que des données chimiques l'ont été sur les thyroglobulines de trois mammifères afin de rechercher si elles traduisent une spécificité analogue à celle des hémoglobines des mêmes animaux¹². Les différences observées sont assez faibles; toutefois, la thyroglobuline de Porc est moins riche en tyrosine et en tryptophane que celle du Bœuf ou du Chien*. Enfin, alors que CAVETT, RICE ET MAC CLENDON⁵ n'ont pas noté d'écart nets dans la composition des thyroglobulines d'Homme, provenant de sujets normaux ou goitreux, nous avons mis en évidence une forte diminution de la teneur en cystéine et une augmentation notable du taux de la tyrosine dans les préparations obtenues à partir d'organes hypertrophiés de Bœuf ou de Porc. Le degré de précision de nos méthodes analytiques, supérieur à celui qu'il était possible d'atteindre en 1935, ne doit probablement pas seul être mis en cause et il est possible que les animaux sur lesquels ont porté nos recherches aient présenté un état pathologique particulier. De toute manière, nos observations montrent que la synthèse de la thyroglobuline peut conduire dans des corps thyroïdes hypertrophiés à des protéines de composition anormale. Celles-ci sont, dans les deux cas étudiés, très pauvres en iode, bien que plus riches en tyrosine que les thyroglobulines des animaux normaux, et c'est là une nouvelle preuve que la teneur en tyrosine de la protéine ne commande pas, tout au moins à elle seule, son halogénéation. Quant à leur appauvrissement en cystine, peut-être y a-t-il lieu de le rapprocher du fait que de nombreux "antithyroïdiens" sont des corps sulfurés (thiouracile, sulfocyanures, etc.). Tout se passe donc comme si la formation de la thyroglobuline conduisait dans certains goîtres à une protéine présentant des possibilités accrues d'ioduration, celle-ci étant par ailleurs inhibée. L'étude que nous nous proposons de poursuivre systématiquement sur les thyroglobulines secrétées par des corps thyroïdes présentant des hyperplasies de divers types apportera sans doute de nouveaux éléments à la discussion de ce problème.

RÉSUMÉ

1. L'ultracentrifugation de la thyroglobuline pure (Porc) a permis de déterminer sa constante de sédimentations ($s_{20}^0 = 19.4 \text{ S}$) et son poids moléculaire ($M_s = 650000$). La protéine se comporte comme un corps homogène à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse, mais renferme trois constituants décelables par l'étude de sa solubilité dans des milieux de force ionique élevée.

2. La teneur de la thyroglobuline pure (Porc) en quinze acides aminés a été étudiée.

3. Les thyroglobulines de porcs, de bœufs et de chiens normaux présentent des différences de composition assez faibles. La protéine thyroïdienne de chaque espèce animale est susceptible de renfermer de l'iode à des taux divers, mais sa teneur en tyrosine et en d'autres acides aminés est pratiquement invariable. Il est donc certain que, si la tyrosine est la substance-mère de la thyroxine, son taux ne détermine pas l'intensité de la synthèse de l'hormone au sein de la thyroglobuline. La formation de cette protéine et son ioduration sont deux processus indépendants.

4. Des modifications pathologiques de la composition en acides aminés, en particulier de la teneur en tyrosine et en cystine, ont été enregistrées sur des thyroglobulines d'animaux goitreux.

* Les données figurant dans les Tableaux I et II ont été établies sur des préparations obtenues à partir d'un grand nombre de glandes, en sorte que chacune d'elles correspond à une moyenne. Les écarts individuels étant, de ce fait, éliminés, les différences observées (dosages en double ou en triple) sont significatives.

SUMMARY

1. Ultracentrifugation of pure thyroglobulin (pig) has made possible the determination of its sedimentation constant ($s^0_{20} = 19.4$ S) and of its molecular weight ($M_s = 650000$). The protein appears to be homogeneous as judged by its behaviour in the ultracentrifuge and during electrophoresis, but contains three constituents as is revealed by its solubility in media of high ionic strength.

2. The content of fifteen amino acids in pure thyroglobulin (pig) has been studied.

3. Thyroglobulins of normal pigs, cattle and dogs show fairly small differences in composition. The thyroid protein of each species can contain varying amounts of iodine, but its content of tyrosine and other amino acids is always the same. It is therefore certain that, tyrosine being the mother-substance of thyroxin, its content does not determine the intensity of the synthesis of the hormone in the thyroglobulin. The formation of this protein and its iodination are two independent processes.

4. In thyroglobulins of goitrous animals pathological changes have been observed in the amino acid composition, especially as regards the content of tyrosine and cystine.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Sedimentationskonstante ($s^0_{20} = 19.4$ S) und das Molekulargewicht ($M_s = 650000$) von reinem Thyroglobulin (Schwein) wurden durch ultrazentrifugieren bestimmt. Dieser Eiweißstoff verhält sich beim Ultrazentrifugieren und bei der Elektrophorese wie ein homogener Körper, enthält aber drei Bestandteile, die durch Untersuchung der Löslichkeit in stark ionisierten Medien nachgewiesen werden können.

2. Der Gehalt des reinen Thyroglobulins (Schwein) an 15 Aminosäuren wurde untersucht.

3. Die Thyroglobuline von normalen Schweinen, Ochsen oder Hunden zeigen in ihrer Zusammensetzung geringe Unterschiede. Das Schilddrüsensiess jeder Tierart kann verschiedene Mengen Jod enthalten aber sein Gehalt an Tyrosin und an anderen Aminosäuren ist praktisch konstant. Wenn das Tyrosin auch die Muttersubstanz des Thyroxins ist, so steht es doch fest, dass die Tyrosinmenge die Intensität der Hormonsynthese im Thyroglobulin nicht bestimmt. Die Bildung dieses Proteins und seine Iodierung sind zwei unabhängige Vorgänge.

4. Pathologische Veränderungen der Aminosäurezusammensetzung, insbesondere des Tyrosin- und Cystingehaltes, wurden in den Thyroglobulinen kropfskranker Tiere festgestellt.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Y. DERRIEN, R. MICHEL ET J. ROCHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 454.
- 2 M. HEIDELBERGER ET T. SVEDBERG, *Science*, 80 (1934) 414.
- 3 M. HEIDELBERGER ET K. O. PEDERSEN, *J. Gen. Physiol.*, 19 (1935) 95.
- 4 H. P. LUNDGREN, *J. Phys. Chem.*, 6 (1938) 177 et *J. Biol. Chem.*, 138 (1941) 293.
- 5 J. W. CAVETT, C. O. RICE ET J. F. MAC CLENDON, *J. Biol. Chem.*, 110 (1935) 673.
- 6 R. MICHEL ET M. LAFON, *Compt. rend. soc. biol.*, 140 (1936) 634.
- 7 Dosage de l'arginine selon C. DUMAZERT ET R. POGGI, *Bull. soc. chim. biol.*, 2L (1939) 1381; de l'histidine selon MAC PHERSON, *Biochem. J.*, 36 (1942) 59; de la lysine selon R. KUHN ET P. DESNUELLE, *Ber.*, 70 (1937) 1907; de la phénylalanine selon J. ROCHE, R. MICHEL ET M. MOUTTE, *Bull. soc. chim. biol.*, *Trav.*, 25 (1943) 1324; du tryptophane et de la tyrosine selon J. H. W. LUGG, *Biochem. J.*, 31 (1937) 1423 et 32 (1938) 775; de la diiodotyrosine et de la thyroxine selon J. ROCHE ET R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 335; de la cystine selon J. W. H. LUGG, *Biochem. J.*, 26 (1932) 2160; de la méthionine selon T. F. LAVINE, *Federation Proc.*, 1 (1942) 1920; de l'alanine selon R. MICHEL ET O. MICHEL, *Bull. Soc. chim. biol.*, 29 (1947) 886; du glyccolide selon R. MICHEL, O. MICHEL ET M. BOZZI-TICHADOU, *Bull. soc. chim. biol.*, 29 (1947) 881; de la leucine et de la valine selon C. FROMAGEOT ET M. MOURGUE, *Enzymologia*, 9 (1940) 329; de la sérine selon R. MICHEL ET M. BOZZI-TICHADOU, *Bull. soc. chim. biol.*, 29 (1947) 884.
- 8 J. W. CAVETT, *J. Biol. Chem.*, 114 (1936) 65.
- 9 H. C. ECKSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 67 (1927) 601.
- 10 A. WHITE, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 32 (1935) 1558.
- 11 E. BRAND, B. KASSEL ET M. HEIDELBERGER, *J. Biol. Chem. (Proc.)*, 128 (1939) xi.
- 12 J. ROCHE, P. DUBOULOZ ET G. JEAN, *Bull. soc. chim. biol.*, 16 (1934) 768.

Reçu le 16 février 1949