

SUR LA FORMATION DE LA THYROXINE ET DE SES PRÉCURSEURS DANS LES IODOPROTÉINES ET LES IODOPEPTONES. II

par

JEAN ROCHE, RAYMOND MICHEL, MARCELLE LAFON ET D. P. SADHU

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

INTRODUCTION

La formation de monoiodotyrosine, de diiodotyrosine et de thyroxine par action de l'iode sur les protéines a été démontrée qualitativement par LUDWIG ET VON MUTZENBECHER¹ et nous l'avons étudiée quantitativement en fonction du nombre d'atomes d'halogène mis en œuvre par molécule de tyrosine². La principale conclusion se dégageant de nos résultats est la présence dans les protéines de certains restes de tyrosine aptes à se condenser pour donner naissance à la thyroxine par ioduration totale, tandis que d'autres y demeurent alors à l'état de diiodotyrosine. Comme l'avaient antérieurement observé REINEKE ET TURNER³, et comme nous l'avons confirmé, un optimum de rendement en thyroxine se manifeste lorsque l'on fait agir six atomes d'iode par molécule de tyrosine, un excès d'halogène provoquant la dégradation partielle du produit initialement formé. Or, la valeur du rapport: tyrosine % de la protéine non iodée/thyroxine %, ne dépasse pas alors 0.23 pour la caséine et 0.20 pour la thyroglobuline iodées. Il est donc probable qu'une égale fraction de la tyrosine totale des deux protéines — le sixième environ — participe à la réaction donnant naissance à la thyroxine. Tel n'est plus le cas pour la fibroïne de la soie, dont PITT RIVERS ET MICHEL⁴ ont montré que l'ioduration comporte un rendement en thyroxine de 0.4%, malgré une teneur initiale en tyrosine égale à 12.0%, la caséine et la thyroglobuline renfermant respectivement 7.2 et 3.3% de cet acide aminé. Néanmoins, il était possible que ce fait soit particulier aux scléroprotéines, puisque, comme l'ont récemment établi deux d'entre nous, les gorgonines renferment en abondance de la monoiodotyrosine et de la diiodotyrosine, mais seulement des quantités minimales de thyroxine⁵. Il y avait dès lors intérêt à étendre nos recherches antérieures à d'autres protéines solubles de teneurs diverses en tyrosine. Le premier but de ce travail a été d'étudier la formation des dérivés iodés de celle-ci dans la zéine et dans l'insuline.

Par ailleurs, si la réactivité de la tyrosine présente dans les protéines est liée à la structure de celles-ci, certains restes de cet acide aminé doivent y occuper une position privilégiée leur permettant de se condenser pour donner naissance à la thyroxine. LERMANN ET SALTER⁶, RAUCH⁷ ont montré que l'hydrolyse alcaline ou enzymatique partielle de la thyroglobuline et d'iodoprotéines artificielles libère des peptones, dont certaines renferment, en tant qu'acide aminé iodé, les unes de la thyroxine, les autres de la diiodotyrosine. Tout se passe donc comme si la première était localisée dans des

régions des molécules protéiques où les restes de tyrosine qui lui donnent naissance occupent initialement une position particulière permettant sa condensation. Dès lors, on pouvait penser que l'hydrolyse partielle d'une protéine avant ioduration serait susceptible de libérer avec une vitesse inégale les molécules de tyrosine présentes, les unes à l'extrémité, les autres au sein de chaînes peptidiques, et que la réactivité de cet acide aminé serait très différente dans une protéine et dans ses peptones. Aussi le second but de ce travail a-t-il été d'étudier la formation de la thyroxine à partir de peptones peptiques de caséine, protéine dont le comportement à cet égard nous était déjà connu².

Un problème complémentaire du précédent a été abordé afin d'étendre nos recherches sur un autre plan. L'activité biologique des protéines thyroïdiennes est proportionnelle à leur teneur en "iode acido-insoluble" (thyroxinien) (PARKES⁸), alors qu'il n'en est pas ainsi pour les iodoprotéines artificielles (DEANESLY ET PARKES⁹). Or, REINEKE, WILLIAMSON ET TURNER¹⁰, étudiant les conditions dans lesquelles l'ioduration de diverses protéines leur confère une activité, ont montré que celle-ci se développe au cours d'une incubation de 20 heures à 70° après un bref temps d'action de l'halogène (2 heures environ) à 37°. Nous avons étudié dans un premier mémoire la formation de la thyroxine et de ses précurseurs en présence de quantités croissantes d'iode. Il a pu être utile d'acquérir en outre des connaissances sur l'évolution de ce processus en fonction du temps d'action de la quantité optima d'halogène.

L'objet de ce travail est donc d'étudier la formation de la thyroxine et de ses précurseurs par ioduration de la zéine et de l'insuline, d'une part, de peptones de caséine, d'autre part, et son évolution dans le temps.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. *Ioduration de la zéine et de l'insuline.* — L'halogénéation de la zéine a été réalisée par NEUBERGER¹¹ en faisant réagir avec cette protéine 5% de plus de la quantité d'iode théoriquement nécessaire pour transformer la tyrosine en dérivé diiodé. Le produit obtenu renferme 7.54% I (théorie: 7.65%) et le déplacement de pK_{OH} sur sa courbe de titration montre qu'il n'existe plus de tyrosine dans l'iodoprotéine, laquelle ne donne pas la réaction de MILLON. Il convenait pour nos recherches d'opérer l'halogénéation au moyen de quantités croissantes d'iode agissant sur divers échantillons de zéine. Nous l'avons réalisée par la technique suivante*. Des solutions à 2.5% de zéine purifiée (N = 15.29%, tyrosine = 5.84%, cendres = 0.10%) dans l'éthanol à 85° additionné de 5% d'ammoniaque (d = 0.925) ont été traitées par des quantités de solution N d'iode correspondant de 1 à 8 atomes I par molécule de tyrosine. Les opérations sont conduites à 0°. Après 1 heure de contact, le mélange est porté à $p_H = 6.9$ et versé dans 4 volumes de solution 0.035 M de phosphates mono- et dipotassique (mélange équimoléculaire, de $p_H = 6.7$), ce qui provoque la précipitation de l'iodozéine. On purifie cette dernière par solubilisation dans l'éthanol à 90° et précipitation aqueuse, jusqu'à disparition des ions I^- adsorbés, ce qui exige au moins deux séries d'opérations. Les préparations, lavées rapidement à l'éthanol, ont été séchées sous vide. Elles se présentent comme des poudres faiblement colorées (chamois) dont les caractères de solubilité sont analogues à ceux de la zéine.

* Nous remercions le Professeur NEUBERGER (*National Institute for Medical Research, Hampstead, N.W. 3*) d'avoir mis à notre disposition la zéine utilisée dans ces recherches.

Bibliographie p. 657.

L'ioduration de l'insuline par HARINGTON ET NEUBERGER¹² a conduit ces auteurs à l'obtention d'une préparation renfermant 15.4% I, soit environ le taux correspondant à la transformation totale de la tyrosine (12.5%) en diiodotyrosine (valeur théorique: 16.37% I). L'insuline étant soluble dans l'eau, nous l'avons traitée par la technique de REINEKE ET TURNER, celle employée par HARINGTON ET NEUBERGER donnant naissance à un produit biologiquement inactif. En raison de la rareté de cette protéine, nous nous sommes bornés à l'halogéner en présence de 6 atomes d'iode par molécule de tyrosine*. La technique employée a été la suivante: On dissout dans un tube à centrifuger de 35 ml 0.500 g d'insuline cristallisée (tyrosine: 12.2%) dans 17 ml d'eau distillée. On ajoute 0.125 g CO₃NaH et une goutte NaOH N pour réaliser un p_H très voisin de 8.0. On porte au bain-marie à 37° et l'on ajoute, en deux heures et par petites fractions, 0.275 g d'iode finement pulvérisé, le p_H étant maintenu à 8.0 au moyen de NaOH 0.5 N et l'homogénéité du milieu étant assurée par une agitation mécanique. L'addition d'iode terminée, on porte à 70°, on ferme au moyen d'un joint à mercure traversé par un agitateur et l'on poursuit le chauffage pendant 20 heures, sous agitation continue. Après refroidissement, on acidifie à p_H = 5.3 par l'acide acétique à 10%, ce qui provoque la précipitation de l'iodoprotéine. On centrifuge, on met en suspension le culot dans 20 ml d'eau distillée et, après avoir acidifié à p_H = 3.0 avec de l'acide chlorhydrique N on porte au bain-marie à 45°. La protéine dissoute est alors précipitée à p_H = 4.5 par addition de NaOH 5 N et séparée par centrifugation. Le précipité, mis en suspension dans 20 ml d'eau distillée, est dissous par addition de NaOH N jusqu'à p_H = 9.0, précipité par l'acide chlorhydrique N à p_H = 4.5, redissous à p_H = 9.0 et séparé à p_H = 4.5. Ces opérations ont pour but d'éliminer les iodures adsorbés en abondance lors de la première précipitation. Elles ont permis de recueillir 0.470 g d'une protéine faiblement colorée (chamois), renfermant 14.8% I et ne donnant pas la réaction de MILLON.

Les iodozéines et les iodoinsulines ont été analysées en ce qui concerne leurs teneurs en iode total (méthode de LEIPERT¹³), en tyrosine (méthode de LUGG¹⁴), en monoiodo-

TABLEAU I

TENEURS EN IODE TOTAL, EN TYROSINE, EN MONOIODOTYROSINE, EN DIIODOTYROSINE ET EN THYROXINE D'INSULINE ET DE ZÉINES IODÉES À DIVERS DEGRÉS

Nombre d'atomes I mis en œuvre par mol de tyrosine	I total %	Tyrosine %	Monoiodotyrosine %	Diiodotyrosine %	Thyroxine %
A. INSULINE					
0 (témoin)	—	12.20	—	—	—
6	14.80	0	0	(non dosé)	1.35
B. ZÉINE					
0 (témoin)	—	5.84	—	—	—
1	1.21	4.20	2.25	traces	traces
2	2.10	3.30	4.35	1.05	0.20
4	4.50	1.10	3.50	3.20	0.65
6	6.85	0.86	2.30	5.65	1.61
8	9.70	0.50	0.81	6.21	1.50

* Trois échantillons d'insuline cristallisée ont été soumis à l'ioduration. Nous remercions les Professeurs J. C. DRUMMOND (Nottingham), E. JORPES (Karolinska Institutet, Stockholm) et K. LINDERSTRÖM-LANG (Carlsberg Laboratorium, Copenhagen) et les Maisons BOORS, LEO et VITRUM, qui ont bien voulu nous les adresser. Ces trois préparations présentaient la même teneur en tyrosine (12.2%).

tyrosine, en diiodotyrosine et en thyroxine (méthode de ROCHE ET MICHEL¹⁵). On trouvera dans le Tableau I les résultats obtenus.

Ces données seront discutées plus bas. Le fait le plus significatif découlant de leur examen est que le rendement en thyroxine de l'ioduration de la zéine est sensiblement supérieur à celui de l'insuline, bien que cette dernière, soit plus de deux fois plus riche en tyrosine. Par ailleurs, comme dans le cas des protéines étudiées antérieurement, la thyroxine ne prend naissance qu'en présence de quantités importantes d'iode. Le meilleur rendement en cet acide aminé est obtenu par action de 6 atomes I par molécule de tyrosine et les produits ainsi préparés sont d'autant plus pauvres en monoiodotyrosine qu'ils sont plus riches en halogène.

2. *Ioduration de peptones pepsiques de caséine.* — La fixation de l'iode par les peptones est depuis longtemps connue, mais la nature des combinaisons halogénées présentes dans leurs dérivés n'a pas été précisée à notre connaissance. Ayant antérieurement étudié les modalités de la formation des acides aminés iodés dans la caséine, nous nous sommes proposés d'halogéner des peptones pepsiques de cette protéine, afin de comparer leur composition en dérivés halogénés de la tyrosine à celle d'iodocaséines.

Six échantillons de peptone ont été préparés par le procédé suivant. 10 g de caséine de Vache pure (LINDERSTRÖM-LANG) (N = 15.62 %, cendres = 0.1 %, tyrosine = 7.20 %) sont triturés au mortier dans 50 ml d'eau distillée et dissous par addition de 8 ml NaOH N. On complète à 150 ml avec de l'eau distillée et l'on ajoute, par petites portions, un mélange de 128 ml d'eau et de 22 ml HCl N, puis 0.3 g de pepsine dissous dans 50 ml HCl N/10. Après avoir ajusté le p_H à 1.5 et saturé le milieu de toluène, on porte à 37°, en ayant soin de contrôler le p_H chaque jour et, si besoin est, de le ramener à p_H = 1.5 après chaque vérification. Au bout de trois jours, on concentre sous vide à 25 ml à une température inférieure à 37° et l'on amène à p_H = 5.7 au moyen de NaOH N. La tyrosine libérée par la pepsine précipite en 24 heures à 0°; on la sépare par centrifugation et le liquide surnageant est ensuite additionné de 4 volumes d'éthanol à 95°, ce qui provoque la formation d'un précipité de peptone, que l'on centrifuge et sèche sous vide. Le rendement de ces opérations est d'environ 1 gramme.

Après avoir dosé la tyrosine dans le produit obtenu, on procède à son ioduration par la technique de REINEKE, WILLIAMSON ET TURNER¹⁰. Pour cela, on ajoute, en 2 heures et par petites portions, 0.109 g d'iode finement pulvérisé à 2.6 g de peptone dissous dans 70 ml d'eau renfermant 0.64 g de bicarbonate de sodium, la température étant maintenue à 37°. Cette quantité d'iode correspond, dans l'exemple choisi, à 5.7 atomes I par molécule de tyrosine. Le p_H du milieu est maintenu à voisinage de 7.8 pendant cette opération, que l'on fait suivre d'un chauffage de 20 heures à 70°, sous agitation continue, dans un récipient fermé par un joint à mercure. Après refroidissement, on complète le volume à 80 ml et l'on dose l'iode combiné et la thyroxine dans des prises d'essai. La teneur de la peptone en iode combiné est calculée au moyen de la différence: I total % (LEIPERT) - I des iodures¹⁸ et le taux de la thyroxine déterminé par colorimétrie¹⁵ après hydrolyse barytique. La solution (iodopeptone totale) a été fractionnée par addition de six volumes d'éthanol à 95° (mélange hydroalcoolique à 81.5° d'éthanol) en un précipité que l'on isole par centrifugation et un produit soluble que l'on recueille après évaporation sous vide. L'analyse de l'iodopeptone totale et de ses deux fractions a donné, sur une série de préparations, des résultats rassemblés dans le Tableau II.

Les peptones de caséine étudiées, toutes beaucoup plus pauvres en tyrosine que

TABLEAU II
TENEURS EN IODE TOTAL, EN THYROXINE ET EN DIIODOTYROSINE DE DIVERSES IODOPEPTONES
DE CASÉINE

N° et teneur en tyrosine de la peptone non iodée initiale	Atomes I mis en œuvre p. molécule de tyrosine	Thyroxine % de l'iodo- peptone totale	Pourcentage de l'iodopeptone in- soluble dans l'éthanol à 81.5° en			Thyroxine % de l'iodopep- tone sol. dans l'éthanol à 81.5°
			iode	thyroxine	diiodo- tyrosine	
(I) 1.00	6.4	—	1.37	0.02	—	—
(II) 1.48	5.5	—	1.33	0.03	—	—
(III) 1.92	6.1	—	1.91	0.03	1.77	—
(IV) 1.07	5.7	0.04	1.09	0.02	0.89	0.05
(V) 1.21	5.9	—	0.97	0.03	0.97	0.07
(VI) 2.70	2.7	0.05	1.03	0.04	1.00	0.06
(VI) 2.70	7.1	0.14	2.72	0.11	2.25	0.14
(VI) 2.70	10.1	0.07	3.19	0.10	2.38	0.06

la protéine à partir de laquelle elles ont été préparées, renferment néanmoins cet acide aminé à un taux parfois voisin de celui caractérisant la thyroglobuline (2.7% au lieu de 3.3%). Toutefois, leur ioduration n'est suivie en aucun cas de la formation de quantités importantes de thyroxine. La signification de ce fait sera discutée plus bas.

3. *Evolution dans le temps de l'ioduration de la caséine.* — Bien avant les travaux de LUDWIG ET VON MUTZENBECHER¹, de nombreux auteurs, en particulier BLUM ET STRAUSS¹⁷, BLUM ET VAUBEL¹⁸ avaient établi que les protéines mises en présence d'iode à des p_H divers s'halogènent rapidement au maximum dans le cycle benzénique de la tyrosine. Par la suite, LUDWIG ET VON MUTZENBERG¹, REINEKE ET TURNER³ constatèrent qu'une incubation prolongée à 37° ou, mieux, à 70° d'iodoprotéines physiologiquement inactives leur confère des propriétés analogues à celles des préparations thyroïdiennes. Il était donc possible qu'une première phase de l'halogénéation conduise spécifiquement à la formation de diiodotyrosine, alors qu'une seconde, beaucoup plus lente, comporterait seule la réaction de condensation donnant naissance à la thyroxine. La plupart des auteurs admettent implicitement ou explicitement cette manière de voir, que nous discuterons dans un prochain mémoire consacré à l'activité biologique des iodoprotéines. Nous nous bornerons à exposer ici les essais que nous avons poursuivis sur la formation de la thyroxine et de ses précurseurs en fonction du temps d'action de l'iode sur la caséine dans des conditions diverses.

Une première série d'expériences a consisté à faire agir à 45° six atomes d'iode en solution (3 g I + 6 g IK + H₂O q.s.p. 50 ml) par molécule de tyrosine sur de la caséine de Vache en solution à 2% en présence de bicarbonate de sodium à 1.0%. L'iode, ajouté par petites portions, est rapidement fixé par la protéine, la solution ne demeurant que très faiblement colorée en jaune en fin d'expérience. Les temps indiqués dans le compartiment A du Tableau III sont ceux employés pour l'addition de la quantité totale de réactif, l'incubation de la caséine en présence de celui-ci étant interrompue par sa précipitation isoélectrique². Dans une seconde série d'essais, nous avons appliqué la méthode de REINEKE, WILLIAMSON ET TURNER¹⁰ à la préparation d'iodocaséine, mais en opérant à diverses températures et en séparant les produits formés aux temps successifs de la technique décrite par ces auteurs. Enfin, l'ioduration en présence d'oxydes de manganèse renforçant l'activité physiologique des produits, il nous a paru utile de la

TABLEAU III

TENEURS EN IODE TOTAL, EN TYROSINE, EN MONOIODYTYROSINE, EN DIIDODYTYROSINE ET EN THYROXINE DE CASÉINES IODÉES PAR ACTION DE 6 ATOMES I PAR MOLÉCULE DE TYROSINE DANS DES CONDITIONS DIVERSES

Temps d'action de I et conditions de l'expérience	I total %	Tyrosine %	Monoiodo-tyrosine %	Diiodo-tyrosine %	Thyroxine %
A. IODURATION PAR I EN SOLUTION EN MILIEU BICARBONATÉ À 45°; TEMPS D'IODURATION VARIABLES					
0 (témoin)	—	7.20	—	—	—
Essai 1					
5 minutes	7.89	0.40	2.74	6.36	1.14
15 "	9.00	0.34	2.30	6.41	1.87
30 "	9.27	0.36	1.30	6.60	1.66
60 "	9.84	0.28	1.08	6.90	1.77
Essai 2					
3 minutes	8.28	0.32	1.62	7.80	1.06
11 "	10.47	0.38	1.50	7.60	1.21
25 "	10.84	0.31	1.32	7.90	1.53
40 "	11.29	0.27	1.36	6.90	1.62
120 "	10.27	0.22	1.06	6.80	1.83
Essai 3					
5 minutes	8.70	0.43	1.45	6.40	1.10
10 "	8.63	0.33	1.80	6.55	1.22
25 "	9.10	0.39	1.33	6.70	1.37
60 "	8.90	0.33	1.04	6.70	1.70
120 "	10.48	néant	0.85	6.80	1.81
B. IODURATION PAR I EN POUDRE SELON REINEKE, WILLIAMSON ET TURNER; TEMPS ET MODALITÉS D'ACTION DE L'HALOGENE VARIABLES					
2 heures à 37°	9.20	0.22	1.10	6.40	1.21
6 " " 37°	9.30	0.45	1.20	6.30	1.62
6 " " 70°	8.12	0.27	0.80	6.41	1.60
6 " " 70° + Mn ₃ O ₄	8.30	0.22	0.90	6.46	1.30
2 h à 37° et 20 h à 70° (technique orig. des auteurs)	9.23	0.16	1.00	7.25	1.33

mettre en œuvre dans une expérience. On trouvera dans le Tableau III les résultats de nos recherches dans ce domaine*.

La formation de la thyroxine est donc un phénomène très rapide et l'incubation prolongée à diverses températures n'en augmente pas l'intensité de manière appréciable. La signification de ce fait en ce qui concerne le défaut d'activité des iodoprotéines prenant naissance par une halogénéation de courte durée sera envisagée par la suite.

DISCUSSION

Deux questions peuvent être utilement discutées à partir des données rassemblées dans les Tableaux I, II et III. Il convient d'envisager, d'une part dans quelle mesure le rendement en thyroxine de l'ioduration des protéines est fonction de leur teneur en tyrosine et, d'autre part, si l'augmentation de l'activité thyroïdienne se manifestant

* Comme nous l'avons discuté dans un travail antérieur¹⁸, la méthode colorimétrique de dosage de la thyroxine que nous employons, plus spécifique que diverses autres, donne des résultats moins élevés qu'elles dans les iodoprotéines. C'est la raison pour laquelle les rendements en thyroxine figurant dans ce tableau sont, en apparence, inférieurs à ceux indiqués par REINEKE et ses collaborateurs^{8, 10}.

lors de l'incubation des iodoprotéines dans diverses conditions va de pair avec une augmentation de leur teneur en thyroxine.

a. *Teneur en tyrosine, structure des protéines et rendement maximum en thyroxine de l'ioduration.* — Nous avons réuni dans le Tableau IV un ensemble de données établies antérieurement^{2, 4} et au cours de ce travail, afin de simplifier la discussion de ces dernières. Les teneurs en thyroxine indiquées sont celles de produits préparés par la méthode de REINEKE et ses collaborateurs¹⁰, sauf dans les cas de la fibroïne et de la zéïne. Ces deux protéines ont été iodées dans des milieux particuliers (voir paragraphe précédent) en raison de leur insolubilité dans l'eau⁴. Il est néanmoins probable que les résultats obtenus peuvent tous être légitimement comparés, car l'ioduration de la caséine dans les conditions les plus diverses nous a fourni des dérivés à peu près également riches en thyroxine, à condition qu'elle soit opérée par la quantité optima de réactif (6 atomes I par molécule de tyrosine).

TABLEAU IV
RENDEMENT EN THYROXINE DE L'IODURATION DE PROTÉINES ET DE PEPTONES

Produit étudié	Teneur initiale en tyrosine % (A)	Teneur en thyroxine % après ioduration (B)	Rapport: $\frac{B \times 100}{A}$
Caséine	7.20	1.65	22.9
Fibroïne	12.00	0.40	3.3
Insuline	12.20	1.35	12.7
Thyroglobuline	3.30	0.68	20.6
Zéïne	5.84	1.61	27.5
Peptone IV	1.07	0.04	3.7
Peptone VI	2.70	0.14	5.2

On ne saurait, après examen de ces données, admettre que la teneur en tyrosine d'une protéine régit son aptitude à donner naissance à de la thyroxine. Le premier acide aminé étant la substance-mère du second, son taux est nécessairement important, mais sa position dans la molécule des protéines ou de leurs dérivés paraît être le facteur prédominant du rendement en thyroxine. Celui-ci, dont la dernière colonne du Tableau IV indique les valeurs relatives rapportées à la tyrosine initialement présente, est environ deux fois plus faible dans l'insuline que dans la thyroglobuline et dans la caséine, et la protéine thyroïdienne ne présente à cet égard aucune propriété particulière. Ce dernier fait est en désaccord avec des résultats récemment publiés par RIVIÈRE, GAUTRON ET THÉLY¹⁹ et que nous n'avons pas pu reproduire²⁰. Par ailleurs, les peptones de caséine étudiées donnent naissance à des traces de thyroxine par rapport à la tyrosine qu'elles renferment, alors que cette réaction affecte une partie importante de l'acide aminé dans la protéine.

Ces diverses observations relèvent d'une même interprétation, à savoir, que seuls certains restes de tyrosine peuvent, en raison de leur position dans les molécules protéiques, se condenser en thyroxine après transformation en diiodotyrosine. La répartition spatiale de ces restes, leur proximité, sont nécessairement fonction de la structure des diverses protéines et l'action de la pepsine peut, soit les libérer, soit dissocier des molécules dans lesquelles ils occupent une position privilégiée. De toute manière, la totalité des restes de tyrosine ne présente pas dans les protéines une réactivité uniforme

et l'on peut espérer mettre à profit les résultats de l'ioduration pour orienter des recherches sur la répartition et le mode de combinaison de la tyrosine dans les protéines de divers types.

b. Formation de la thyroxine en fonction du temps d'incubation des protéines dans le milieu d'ioduration et activité biologique. — De nombreuses observations, dues entre autres à LUDWIG ET VON MUTZENBECHER², à REINEKE, WILLIAMSON ET TURNER¹⁰ ont établi que l'incubation prolongée des iodoprotéines au sein du milieu où elles se forment renforce, parfois même fait apparaître, leur activité biologique. Or, comme il est actuellement certain que la thyroxine se forme à partir de la diiodotyrosine prenant naissance dans un premier temps, REINEKE ET TURNER²¹ ont admis que le rendement en la première est très fortement augmenté par la prolongation du temps de chauffage des préparations en solution iodée, surtout en présence d'oxydes de manganèse. Cette hypothèse apparaissait comme d'autant plus plausible que l'incubation à 37° de la diiodotyrosine pure en milieu faiblement alcalin conduit à la formation de thyroxine (VON MUTZENBECHER²², JOHNSON ET TEWKESBURY²³, HARINGTON ET PITT RIVERS²⁴). Les données que nous avons établies sur des iodocaséines ayant subi l'action de l'halogène pendant des temps divers (Tableau III) ne sont pas favorables à cette manière de voir.

En effet, le rendement maximum en thyroxine, à 45° et en milieu très faiblement alcalin (CO₃NaH 1%), est en général atteint en 30 à 60 minutes, la quantité de cet acide aminé présente étant déjà élevée quelques minutes après addition du réactif au taux de six atomes d'iode par molécule de tyrosine. Dans ces conditions, la prolongation du temps de chauffage n'exerce aucune action sur la formation de thyroxine. Il en est de même lorsque l'halogénéation est opérée selon la technique de REINEKE, WILLIAMSON ET TURNER¹⁰. Dans nos essais, aucune augmentation de la teneur en thyroxine n'a été observée, ni en portant de 37° à 70° la température de chauffage pendant six heures, ni lors de l'addition de Mn₂O₄ et la technique originale (chauffage de 2 heures à 37°, puis de 20 heures à 70°) conduit à un résultat voisin de celui obtenu à la fin de son premier temps. Or, il n'est pas douteux que les produits préparés par ces diverses techniques sont d'activité biologique très inégale, ceux ayant subi une longue incubation à 70° étant seuls doués à cet égard d'une efficacité importante. Il en découle que celle-ci est liée à des facteurs multiples, dont l'assimilation de la thyroxine présente dans les iodoprotéines est peut-être l'un des plus importants, comme nous le discuterons dans un prochain travail*. Le fait que REINEKE et ses collaborateurs auraient observé une augmentation de la teneur en thyroxine des iodoprotéines après incubation à 70°, surtout en présence d'oxydes de manganèse, n'est pas en contradiction avec nos résultats, car la méthode de dosage de l'hormone employée par ces auteurs, moins spécifique que la notre, comporte une erreur par excès due sans doute à l'entraînement de produits de dégradation de la thyroxine et de la diiodotyrosine présents dans les iodoprotéines, récemment étudiés par PITT RIVERS²⁵ (diiodohydroxybenzaldéhyde et triiodophénol). De toute manière, la formation de la thyroxine dans les protéines doit être considérée comme une réaction s'opérant très rapidement en milieu faiblement alcalin; l'activité biologique des produits obtenus paraît dès lors plus liée à l'assimilation de la thyroxine qu'ils renferment qu'au taux de celle-ci.

* Signalons que TURNER ET REINEKE²⁶ ont observé que l'utilisation digestive de la thyroxine contenue dans les iodoprotéines est très faible chez les ruminants; elle ne paraît être que de 5% chez le Mouton.

RÉSUMÉ

1. L'action de l'iode en quantité optima (6 atomes I par molécule de tyrosine) sur les protéines conduit à la formation de thyroxine, de diiodotyrosine et de moniodotyrosine en proportions diverses selon la nature du produit étudié. Une partie seulement de la tyrosine est susceptible de se transformer en thyroxine dans la caséine, l'insuline, la thyroglobuline, la zéine; l'autre, toujours beaucoup plus importante, demeure à l'état de diiodotyrosine en présence d'un excès de réactif. Le rendement maximum en thyroxine par unité de poids de tyrosine est différent pour chaque protéine. L'interprétation la plus simple de ces faits est que certains restes de tyrosine, seuls aptes à se condenser en thyroxine, occupent dans les protéines une position privilégiée leur conférant une réactivité particulière. L'aptitude d'une protéine à donner naissance à de la thyroxine n'est donc pas seulement fonction de sa teneur en tyrosine, mais aussi de sa structure.

2. Des peptones pepsiques de caséine ne renferment après action de l'iode que des traces de thyroxine, la quasi-totalité de la tyrosine étant alors transformée en dérivé diiodé. Leur comportement vis-à-vis de l'halogène peut tenir soit à la mise en liberté par l'hydrolyse enzymatique des molécules de tyrosine susceptibles de se condenser, soit à la dislocation de la structure les maintenant dans une position favorable.

3. La formation de la thyroxine par ioduration des protéines est une réaction beaucoup plus rapide que ne permet de le prévoir l'évolution de l'activité biologique des préparations en fonction de leur temps d'incubation en présence des réactifs. Elle donne, dans les conditions indiquées, naissance en quelques minutes à des quantités importantes de cet acide aminé.

SUMMARY

The action of the optimal quantities of iodine (6 atoms iodine per molecule of tyrosine) on proteins results on the formation of thyroxin, diiodotyrosine and moniodotyrosine in different proportions depending on the protein investigated. Only a part of the tyrosine can be transformed into thyroxin in casein, insulin, thyroglobulin and zein; the main part of the tyroxin remains as diiodotyrosine in the presence of an excess of reagent. The maximum yield of thyroxin per unit of weight of tyrosine is different for each protein. The simplest explanation of these facts is that certain tyrosine residues able to condense to form thyroxin, occupy certain positions in the proteins which make them particularly reactive. Hence the ability of a protein to produce thyroxin is not only dependent on its tyrosine content, but also on its structure.

2. The pepsic peptones of casein, after being treated with iodine, contain only traces of thyroxin, practically all the tyrosine being transformed into the diiodo-derivative. Behaviour of these peptones towards halogens may be due to the liberation by enzymatic hydrolysis of certain molecules of tyrosine or to the break-down of the structure which maintains them in a favourable position.

3. The formation of thyroxin by iodination of proteins proceeds much more rapidly than would be expected from the evolution of the biological activity of the preparations as a function of their incubation time with the reagent. Under the conditions indicated above, considerable amounts of thyroxin are formed in a few minutes.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Wirkung von Jod in optimaler Menge (6 Atome I per Mol. Tyrosin) auf Proteine führt zur Bildung von Thyroxin, Dijodotyrosin und Monojodotyrosin in wechselnden Mengen, je nach der Art des untersuchten Proteins. Im Casein, Insulin, Thyroglobulin oder Zein ist nur ein Teil des vorhandenen Tyrosins befähigt, sich in Thyroxin umzuwandeln; der stets viel grössere Teil bleibt als Dijodotyrosin in Gegenwart eines Überschusses an Reagens. Die maximale Ausbeute an Thyroxin per Tyrosin-Gewichtseinheit ist für jedes Protein verschieden. Die einfachste Erklärung dieser Tatsachen ist die, dass gewisse Tyrosinreste, die allein befähigt sind, sich zu Thyroxin zu kondensieren, im Protein eine bevorzugte Stellung einnehmen, die ihnen eine besondere Reaktionsfähigkeit verleiht. Die Fähigkeit eines Proteins, Thyroxin zu bilden, hängt also nicht allein von seinem Tyrosin-gehalt ab, sondern ebenfalls von seiner Struktur.

2. Pepsinpeptone aus Casein enthalten, nach Einwirkung von Jod, nur Spuren von Thyroxin; fast das ganze Tyrosin liegt dann in Form des Dijodderivates vor. Ihr Verhalten gegenüber dem Halogen kann entweder davon herrühren, dass durch die enzymatische Hydrolyse die zur Kondensation befähigten Tyrosinmolekeln abgespalten worden sind, oder davon, dass die Struktur, die sie in günstiger Lage zusammenhielt, auseinandergezerrt worden ist.

3. Die Bildung des Thyroxins durch Jodierung der Proteine ist eine viel raschere Reaktion als die Evolution der biologischen Wirksamkeit der Präparate, bezogen auf ihre Inkubationszeit in Gegenwart der Reagentien, es vorauszusehen erlaubt. Unter den angegebenen Bedingungen werden in wenigen Minuten bedeutende Mengen dieser Aminosäure gebildet.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ W. LUDWIG ET P. VON MUTZENBECHER, *Z. physiol. Chem.*, 258 (1939) 195.
- ² J. ROCHE, R. MICHEL ET M. LAFON, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 453.
- ³ E. P. REINEKE ET C. W. TURNER, *J. Biol. Chem.*, 149 (1943) 555 et 563.
- ⁴ R. MICHEL ET R. PITT RIVERS, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 223.
- ⁵ J. ROCHE ET M. LAFON, *Compt. rend. soc. biol.*, 142 (1948) 1200.
- ⁶ J. LERMANN ET W. T. SALTER, *Endocrinology*, 25 (1939) 712.
- ⁷ S. RAUCH, *Thèse Doct. Méd.*, Berne, 1945, Graph. Anst. Schule, Biel, éd.
- ⁸ A. S. PARKES, *J. Endocrinol.*, 4 (1946) 426.
- ⁹ R. DEANESLY ET A. S. PARKES, *J. Endocrinol.*, 4 (1945) 356.
- ¹⁰ E. P. REINEKE, M. B. WILLIAMSON ET C. W. TURNER, *J. Biol. Chem.*, 147 (1943) 115.
- ¹¹ A. NEUBERGER, *Biochem. J.*, 28 (1934) 1982.
- ¹² C. R. HARRINGTON ET A. NEUBERGER, *Biochem. J.*, 30 (1936) 809.
- ¹³ T. LEIPERT, *Mikrochem.*, Pregls Festschrift (1929) 266.
- ¹⁴ J. W. H. LUGG, *Biochem. J.*, 32 (1938) 775.
- ¹⁵ J. ROCHE ET R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 335.
- ¹⁶ J. ROCHE ET R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 97.
- ¹⁷ F. BLUM ET E. STRAUS, *Z. physiol. Chem.*, 112 (1921) 111; 127 (1923) 199.
- ¹⁸ F. BLUM ET W. VAUBEL, *J. prakt. Chem.*, 56 (1897) 393; 57 (1898) 365.
- ¹⁹ C. RIVIÈRE, G. GAUTRON ET M. THELY, *Bull. soc. chim. biol.*, 29 (1947) 600.
- ²⁰ J. ROCHE, R. MICHEL ET M. LAFON, *Compt. rend. soc. biol.*, 142 (1948) 692.
- ²¹ E. P. REINEKE ET C. W. TURNER, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 613; 162 (1946) 369.
- ²² P. VON MUTZENBECHER, *Z. physiol. Chem.*, 261 (1939) 253.
- ²³ T. B. JOHNSON ET L. B. TEWKESBURY, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.*, 28 (1942) 73.
- ²⁴ C. R. HARRINGTON ET R. PITT RIVERS, *Biochem. J.*, 39 (1945) 157.
- ²⁵ R. PITT RIVERS, *Communication au Congrès international de Chimie, Londres 1947 et Biochem. J.*, 43 (1948) 223.
- ²⁶ E. P. REINEKE ET C. W. TURNER, *J. Dairy Sci.*, 27 (1944) 642.

Reçu le 27 janvier 1949