

THYROGLOBULINE MARQUÉE OU
ARTIFICIELLEMENT IODÉE SANS DÉNATURATION.
FORMATION DANS DES
CONDITIONS EXPÉRIMENTALES DIVERSES ET PROPRIÉTÉS

par

JEAN ROCHE, RAYMOND MICHEL, ODETTE MICHEL,
GUY-H. DELTOUR ET SERGE LISSITZKY

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

La thyroglobuline des animaux normaux présente, dans les extraits d'organe bruts et dans ses préparations les plus pures, électrophorétiquement homogènes, trois fractions de solubilité distincte en présence de sels neutres dont la composition paraît identique^{1, 2}. Comme elle renferme, par ailleurs, des quantités d'iode variables selon son origine, on pouvait se demander si cette hétérogénéité répond à des degrés divers d'halogénéation d'une même protéine. Il ne semble pas en être ainsi, car la précipitation fractionnée de la thyroglobuline par les sels neutres à concentration croissante ne permet de séparer d'un extrait glandulaire que des produits dont le rapport N/I est constant. Un fractionnement direct de la protéine, dont l'insolubilisation s'opère dans des limites de concentration en sels très étroites — par exemple entre [37] et [42]* avec $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à $\text{pH} = 6.5$ et à 23° dans des milieux renfermant 1 p. 100 de thyroglobuline de Bœuf ou de Porc — paraît irréalisable. De ce fait, l'étude de l'hétérogénéité de cette protéine dans des milieux riches en sels doit être poursuivie en se basant sur d'autres critères.

Nous avons mis en œuvre dans ce but la préparation de la thyroglobuline marquée par le radioiode ^{131}I et son ioduration *in vitro* sans dénaturation. La première nous a paru devoir permettre de confirmer et de préciser son hétérogénéité. En effet, les variations de la solubilité de la thyroglobuline en fonction de concentrations croissantes en un sel neutre ne doivent pas évoluer parallèlement à celles de la radioactivité des milieux la renfermant, si l'hétérogénéité de cette protéine traduit la diversité de composition des fractions de solubilité diverses. Par ailleurs, les caractères de la thyroglobuline marquée une fois définis, nous nous sommes proposé d'étudier son repérage dans un mélange à l'aide de mesures de radioactivité. Son identification par cette méthode s'est révélée facile, dans un extrait glandulaire comme dans des milieux protéiques plus complexes. Aussi a-t-il été possible d'étendre nos recherches à un autre domaine.

La formation de la thyroglobuline est un processus indépendant de son ioduration.

* Selon la notation usuelle inaugurée par SÖRENSEN dans les études de cette nature, les chiffres entre crochets désignent ici les pourcentages de la teneur en solution servant au relargage (salting out) des protéines (solution saturée en sulfate d'ammonium de $\text{pH} = 6.6$ et mélange équimoléculaire de phosphates mono- et dipotassique 3.5 M de $\text{pH} = 6.5$).

Or, les travaux entrepris jusqu'ici pour relier des dérèglements de la fonction thyroïdienne à des troubles de la formation de la thyroxine paraissent indiquer que les protéines thyroïdiennes ne sont pas susceptibles de se modifier^{3, 4}, sauf dans des cas exceptionnels dont l'étude n'a été qu'ébauchée⁵; seul le mécanisme de l'ioduration de la thyroglobuline serait influencé par des agents goïtrogènes ou des facteurs pathologiques. Il nous a paru utile de poursuivre des recherches sur l'existence de modifications éventuelles de cette protéine dans des conditions où sa formation est soit opérée par la glande en quantité anormalement grande, soit inhibée par des agents goïtrogènes. Comme les protéines peuvent être caractérisées par leur solubilité en présence de sels neutres et comme la radioactivité d'une iodoprotéine marquée permet de suivre spécifiquement sa précipitation par les mêmes corps dans un mélange, l'une et l'autre propriétés ont été mises à profit pour étudier les constituants des extraits thyroïdiens d'animaux normaux et d'animaux mis soit en hyperactivité thyroïdienne par des injections répétées de thyroestimuline, soit en hypoactivité glandulaire par administration de fortes doses de produits antithyroïdiens*.

L'injection de thyroestimuline augmente la formation de thyroxine et appauvrit la glande en iode⁶, mais on peut se demander si ce dernier fait est bien dû à une accélération de l'hydrolyse enzymatique totale de la thyroglobuline ou s'il traduit une libération sélective des acides aminés iodés. Dans le premier cas, l'organe ne devrait renfermer que des quantités relativement minimes de l'iodoprotéine, tandis que, dans le second, ses extraits pourraient contenir des quantités importantes d'une thyroglobuline faiblement iodée et dont l'appauvrissement en thyroxine et en iodotyrosines modifierait sans doute légèrement la solubilité. Enfin, on peut envisager que la synthèse de la thyroglobuline soit dérégulée dans le corps thyroïde mis en activité "forcée" par des injections de thyroestimuline.

Par ailleurs, on a considéré jusqu'ici les antithyroïdiens du groupe du thiouracile comme des agents inhibiteurs de la formation de la thyroxine⁵, mais les modifications histologiques importantes de la glande consécutives à leur administration prolongée suggèrent qu'ils gênent la synthèse de la thyroglobuline. Par ailleurs, on trouve dans le corps thyroïde des animaux traités des quantités importantes d'iode dit "faiblement combiné", non compris dans les iodotyrosines ou dans la thyroxine⁷; aussi, est-il possible que l'organe renferme alors, d'une part une thyroglobuline anormale se prêtant mal à l'ioduration physiologique de ses restes de tyrosine et, d'autre part, des protéines différentes susceptibles de former avec l'iode des combinaisons labiles d'un type particulier.

Quant à la fixation de l'halogène sans dénaturation sur la thyroglobuline, il y avait lieu de la réaliser afin de rechercher si elle provoque une modification de l'hétérogénéité de la protéine, auquel cas celle-ci pourrait être liée soit à des teneurs diverses en iode de ses fractions, soit à des différences dans la valeur du rapport: iodotyrosines/thyroxine de certaines d'entre elles. Les essais d'ioduration réalisés dans des travaux antérieurs, que nous avons discuté dans un précédent mémoire⁸, ne permettent pas de se faire une opinion à cet égard, car ils ne comportent aucun contrôle en ce qui concerne la dénaturation.

* Les extraits renferment le contenu des vésicules colloïdes et de petites quantités de protéines cellulaires.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

A. Thyroglobuline marquée. Caractères et repérage dans un mélange protéique

1. Préparation de la thyroglobuline radioactive

De la thyroglobuline marquée a été préparée en appliquant la méthode décrite par DERRIEN et deux d'entre nous¹ soit à des corps thyroïdes (Bœuf) perfusés avec un liquide additionné d'iodures radioactifs*, soit au même organe d'animaux ayant reçu une injection de ces sels.

Les corps thyroïdes, prélevés aseptiquement**, ont été perfusés avec le sérum sanguin, additionné d'iodures marqués, des animaux dont provenait l'organe et la fixation d'¹³¹I a été suivie par des mesures au compteur de GEIGER-MÜLLER opérées sur des prises d'essai du liquide nutritif. La perfusion a été réalisée aseptiquement à 37° dans un appareil permettant la survie prolongée d'organes. Des recherches poursuivies avec A. THOMAS et qui seront publiées par ailleurs ont montré que le corps thyroïde concentre alors des ions I⁻ pendant un temps pouvant atteindre 24 heures, en sorte qu'il a été possible d'extraire et de purifier la thyroglobuline marquée des organes, mis en expériences. Voici, à titre d'exemple, le détail d'un de nos essais: 2 millicuries ¹³¹I (sans entraîneur) sont ajoutés à l'état d'iodure à deux litres de sérum. Après 5 heures, la glande, pesant 46 g, est soigneusement disséquée, congelée et débitée au rasoir en coupes minces (1 mm d'épaisseur environ) que l'on immerge pendant 24 heures à 0° dans 150 ml de ClNa à 0.9 %, en agitant à quatre reprises successives³. Après filtration sur gaze et centrifugation, le liquide d'extraction renferme 3.4 mg N/ml et sa radioactivité est de $1.07 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml. La thyroxine, dosée par la méthode de BLAU¹⁰ dans l'hydrolysât barytique de l'extrait, présente une radioactivité de $1.03 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml. La thyroglobuline est séparée des protéines du liquide de perfusion par fractionnement au sulfate d'ammonium à pH = 6.6 et à 20° entre [33] et [45] % de la saturation en ce sel. Ces limites de précipitation sont sensiblement plus étendues que celles permettant d'obtenir une thyroglobuline très pure; nous les avons néanmoins adoptées pour recueillir la quasi-totalité de la protéine marquée, laquelle ne renferme alors que 5 à 10 % d'impuretés de solubilité voisine. Le précipité de thyroglobuline est redissous dans de l'eau distillée et dialysé contre celle-ci jusqu'à disparition des ions SO₄⁼ et NH₄⁺. Sa solution renferme alors 1.90 mg N/ml, pour une radioactivité de $0.85 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml, dont $8 \cdot 10^5$ correspondent à l'iode thyroïdien***:

Un porc normal de 140 kg a reçu, par ailleurs, 1 millicurie ¹³¹I en injection dans la veine marginale de l'oreille et a été sacrifié 24 heures après par saignée. Le corps thyroïde de cet animal a été prélevé et extrait selon le procédé indiqué plus haut et la thyroglobuline purifiée par fractionnement au sulfate d'ammonium entre [36] et [45].

2. Solubilité de la thyroglobuline à l'état pur et dans un mélange protéique

La solubilité d'une protéine à concentration croissante en un sel neutre permet de la caractériser (S. P. L. SÖRENSEN, E. J. COHN), mais l'identification des constituants d'un mélange au moyen du même critère demeure discutée. Des processus d'adsorption et l'existence de combinaisons protéido-protéïdiques sont en effet susceptibles de compliquer les observations. Dans une première série d'expériences, nous avons mis à profit la radioactivité de la thyroglobuline marquée pour contrôler ses caractères, en particulier l'existence dans ses préparations de fractions de solubilité différentes. Dans une seconde, nous avons recherché si elle conservait cette hétérogénéité dans un mélange et s'il était possible de l'identifier dans celui-ci en y étudiant sa précipitation à des concentrations croissantes en sels neutres, par des mesures de radioactivité associées à des dosages d'azote protéique.

Des courbes de solubilité de la thyroglobuline marquée de Bœuf en fonction de

* Nous remercions le Laboratoire d'Harwell (Angleterre) de nous avoir fourni l'iodure de sodium marqué (¹³¹I) nécessaire à nos recherches, par l'obligeant intermédiaire du Centre National de la Recherche Scientifique.

** Nous remercions MM. les vétérinaires des Abattoirs de La Villette et de Vaugirard (Paris), en particulier le Dr SERGENT, d'avoir pris les dispositions nécessaires à ces prélèvements.

*** Le rapport: ¹³¹I thyroïdien / ¹³¹I total est inférieur à 1 % dans ce produit, car la thyroxine ne se forme que lentement à partir de la diiodotyrosine dans l'organe perfusé comme *in vivo*. La plus grande partie d'¹³¹I de la préparation est présente dans les iodyrosines, le taux de thyroxine marquée dans la protéine thyroïdienne étant d'autant plus grand que la perfusion a été plus longue.

concentrations croissantes en sulfate d'ammonium ont été établies par la même technique que dans nos recherches antérieures. Toutefois, comme nous n'avons pas toujours disposé de quantités importantes de protéine, nous avons dosé les quantités de celle-ci demeurées en solution, soit par microkjeldahl après élimination du sulfate d'ammonium (technique de A. ROCHE ET F. MARQUET), soit par mesure de l'intensité de l'absorption ultraviolette à 2750 Å au spectrophotomètre de BECKMANN*. La radioactivité a été mesurée à l'aide d'un compteur de GEIGER-MÜLLER (type CEA cylindrique) sur une partie aliquote des mêmes milieux, en sorte que nous avons déterminé le pourcentage des protéines totales et de la radioactivité totale (ramenée à la radioactivité initiale) dans les fractions solubles à diverses concentrations en sel neutre après filtration des précipités. Les dosages des protéines doivent être considérés comme exacts à $\pm 1\%$ près et les mesures de radioactivité à $\pm 2\%$, sauf aux deux extrémités des courbes obtenues, où les dernières sont entachées d'une erreur de $\pm 4-6\%$ (excès de protéine absorbant des radiations au début de la précipitation, radioactivité trop faible à la fin de celle-ci). On trouvera dans la Fig. 1 un exemple des graphiques établis à partir d'une de nos préparations.

Le parallélisme des variations en fonction de C, du taux de protéine et de la radioactivité dans les solutions ressort de l'examen de cette figure. Toutefois, les courbes qui y sont reproduites ne comportent pas un nombre assez grand de points pour que l'on puisse calculer avec précision des rapports entre la radioactivité et la teneur en protéine relatives à chaque concentration en sel; seule l'allure générale de telles courbes est significative. Les résultats obtenus apportent néanmoins une confirmation de l'hétérogénéité de la thyroglobuline sur laquelle nous reviendrons; ils permettent en outre de prévoir que la précipitation de cette protéine dans un mélange doit pouvoir être suivie grâce à sa radioactivité.

Deux types de mélanges ont été réalisés, l'un avec un extrait thyroïdien brut non radioactif, l'autre avec les protéines totales du sérum. Dans le premier, nous avons ajouté à un extrait thyroïdien (Porc) assez concentré en protéines une petite quantité de thyroglobuline marquée (Bœuf) et établi à partir de leur mélange les courbes reproduites dans la Fig. 2.

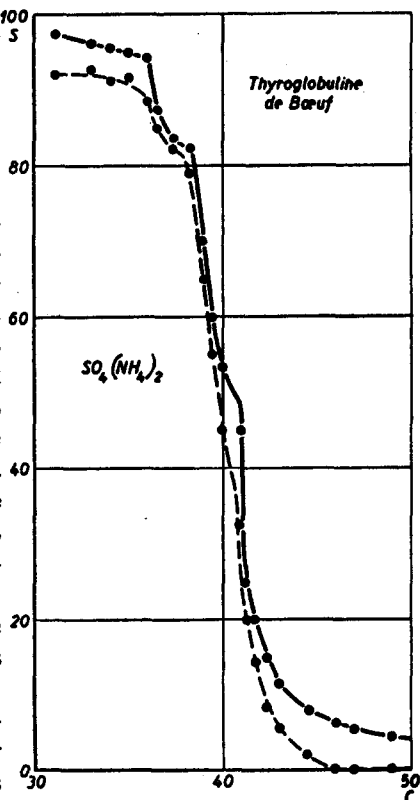


Fig. 1. Courbe de solubilité de la thyroglobuline de Bœuf radioactive (concentration 0.80 g N/ml; radioactivité $0.34 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml) en fonction de concentrations croissantes en sulfate d'ammonium ($pH = 6.6$, 23° temps d'équilibration: 24 heures). Abscisses: C = concentration en sulfate d'ammonium en % de la saturation. Ordonnées: tracé continu (—) S = % des protéines totales en solution; tracé discontinu (----) S = % de la radioactivité dans la solution.

* Le principe de cette méthode a été indiqué par Y. DERRIEN¹¹, que nous remercions de nous avoir communiqué le mode opératoire mis au point par lui, actuellement en cours de publication.

Les solubilités de la thyroglobuline pure de Porc et de Bœuf en présence de sulfate d'ammonium sont identiques et la première est accompagnée dans les extraits bruts de 10 à 15% de protéines non iodées, les unes plus, les autres moins solubles qu'elle¹. L'examen de la Fig. 2 montre l'entraînement d'une petite quantité de la protéine marquée par les fractions de tête et de queue des protéines de l'extrait brut avant [36] et après [42]. Ce phénomène ne constitue pas un obstacle important à la caractérisation du produit radioactif, qui conserve dans le mélange son hétérogénéité et y précipite entre des limites de concentration en sel voisines*. Ces faits méritent d'être retenus pour la préparation de la thyroglobuline pure, et il convenait par ailleurs de rechercher s'ils pourraient être retrouvés dans un milieu plus complexe qu'un extrait glandulaire.

L'efficacité du fractionnement aux sels neutres d'un extrait glandulaire en vue de la purification de la thyroglobuline est illustrée par les Figs. 3 et 4. Celles-ci ont été établies à partir de l'extrait thyroïdien du Porc traité par 1 millicurie ¹³¹I 24 heures avant abattage, étudié dans un premier temps à l'état brut et dans un second après fractionnement au sulfate d'ammonium à $p_H = 6.6$ et à 23°, entre des limites de concentration en sel assez larges — soit [36] et [45] — afin d'éviter des pertes en protéine marquée.

L'extrait total, relativement riche en fractions de queue non iodées en raison des mauvaises conditions de saignée (présence de protéines sanguines diverses précipitant au delà de [45]), renferme de la thyroglobuline marquée dont la précipitation s'opère à peu près complètement entre [38] et [43]. La séparation entre les limites de solubilité choisies, soit [36] et [45], conduit, de ce fait, à la purification du produit marqué. Dans les conditions de dilution où nous avons opéré, celui-ci n'est alors souillé que de quantités minimes des globulines sanguines présentes dans l'extrait initial et constituant une partie des fractions de queue de celui-ci. Sa précipitation s'opère alors sans une adsorption notable à d'autres protéines qui, comme nous l'avons signalé, peut parfois modifier sensiblement une partie de sa courbe de solubilité.

L'étude de la caractérisation de la thyroglobuline dans un milieu protéique complexe dont elle ne représente qu'une fraction assez faible a été poursuivie de la manière

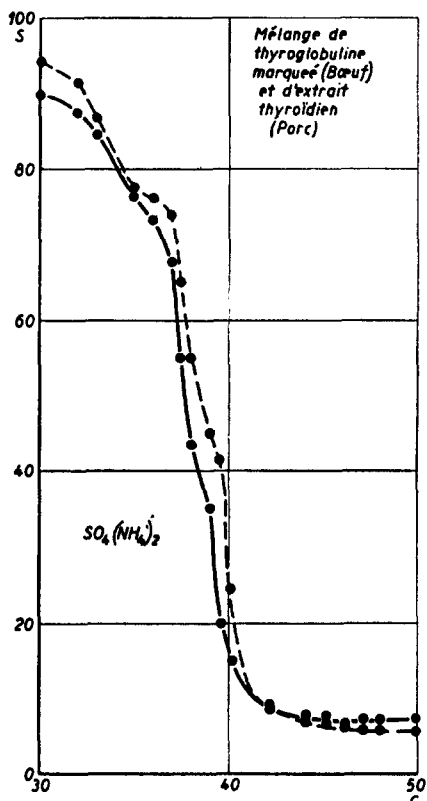


Fig. 2. Courbes de solubilité de la thyroglobuline marquée de Bœuf (0.8 mg/ml; $0.4 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml) additionnée d'un excès d'extrait thyroïdien (Porc) non fractionné (7.0 mg N protéique/ml) ($p_H = 6.6$, 23°, temps d'équilibration: 24 heures).

Abscisses: C concentration en sulfate d'ammonium % de la saturation.

Ordonnées: tracé continu (—) S = % de protéine en solution; tracé discontinue (-----) S = % de la radioactivité dans la solution.

* La thyroglobuline purifiée radioactive paraît légèrement plus soluble que celle de l'extrait thyroïdien brut, en raison de l'abondance dans celui-ci des fractions de tête adsorbant l'iodoprotéine.

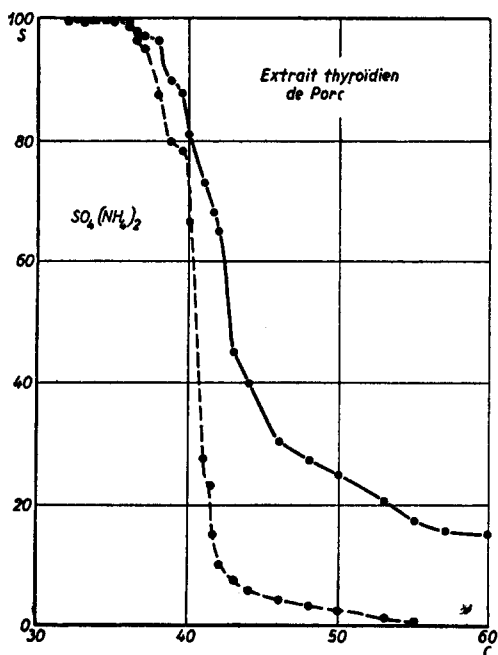


Fig. 3. Courbes de solubilité des protéines totales et des fractions marquées de l'extrait thyroïdien de Porc normal (0.81 mg N/ml; $2.85 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml) en fonction de concentrations croissantes en sulfate d'ammonium ($pH = 6.6$, 23° , temps d'équilibration: 24 heures).

Abscisses: C = concentration en sulfate d'ammonium en % de la saturation.

Ordonnées: tracé continu (—) S = % des protéines en solution; tracé discontinu (----) S = % de la radioactivité dans la solution.

suivante. Du sérum de Bœuf a été additionné de la protéine marquée de manière à constituer un mélange renfermant, par ml, 6.25 mg N protéique, dont 0.95 mg apporté par le produit iodé. La courbe de solubilité des protéines et celle de leur radioactivité

à diverses concentrations en sulfate d'ammonium ont été reproduites sur la Fig. 5.

Le repérage de la thyroglobuline marquée y est objectivé par le même critère que dans les solutions de la protéine purifiée (Fig. 1, courbe de radioactivité). La persistance de l'hétérogénéité propre à celle-ci est manifeste et la position des points d'inflexion des courbes demeure très voisine, le relargage des deux fractions les moins solubles traduisant un très faible entraînement par les protéines du sérum précipitant dans la même zone de concentration saline (décalage léger des fractions de tête vers les plus faibles teneurs en sel). Les caractères de la protéine thyroïdienne ne sont donc pas modifiés par la présence en quantité importante des protéines d'un autre type apportées par le sérum. Il va de soi que cette observation ne saurait être généralisée sans contrôle. Son intérêt dans le cadre de la séparation d'un constituant protéique à partir d'un mélange, manifeste dans le cas de la thyroglobuline (Figs. 3 et 4) sera discuté plus bas.

Bibliographie p. 588.

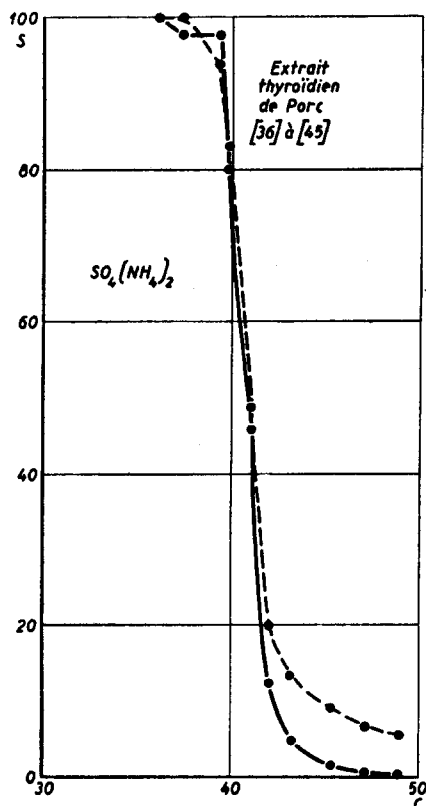


Fig. 4. Courbes de solubilité de la thyroglobuline marquée de Porc (0.45 mg N/ml; $0.56 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml) fractionnée entre [36] et [45] en sulfate d'ammonium ($pH = 6.6$, 23° , temps d'équilibration: 24 heures).

Abscisses: C = concentration en sulfate d'ammonium en % de la saturation.

Ordonnées: tracé continu (—) S = % de protéines en solution; tracé discontinu (----) S = % de la radioactivité dans la solution.

B. Thyroglobuline marquée d'animaux normaux (Chien et Porc) et d'animaux traités par la thyrostimuline ou par des dérivés du thiouracile

Le but des expériences décrites dans ce paragraphe est d'étendre l'étude de la caractérisation de la thyroglobuline dans les extraits glandulaires, afin de préciser si le processus d'ioduration porte sur un substrat protéique toujours identique, quelles que soient les conditions dans lesquelles il évolue. Une forte hyperactivité glandulaire due à la thyrostimuline et la gêne prolongée apportée à la fonction de l'organe par l'administration d'agents antithyroïdiens ont été retenues comme étant les plus favorables à mettre en œuvre. Nous nous sommes proposé de rechercher si les protéines iodées radioactives se formant dans l'un et l'autre cas sont ou non identiques à la thyroglobuline des animaux normaux.

1. Traitement des animaux et préparation des extraits thyroïdiens

Huit chiens normaux ont reçu, en une injection intraveineuse, de 0.5 à 1.0 millicuries I^{131} à l'état d'iodeure (sans entraineur) et ont été sacrifiés 24 ou 48 heures après saignée totale (après injection de 50 mg d'héparine). Trois animaux ont été traités de même, mais après avoir reçu au préalable 1.000 unités HEYL-LAQUEUR de thyrostimuline*, à la dose de 100 unités par jour pendant 10 jours. Enfin, trois chiens ont été mis en expérience après avoir reçu, chacun des deux premiers 4 g de propylthiouracile administrés en 10 injections sous-cutanées de 0.4 g (suspension dans une solution de phosphate disodique ajustée à $pH = 8.5$) et le troisième 7 g de benzylthiouracile en 14 doses orales quotidiennes de 0.5 g.

Le corps thyroïde des animaux a été prélevé après saignée, sous héparine (50 mg) congelé, coupé au rasoir en tranches minces et extrait par $ClNa$ 0.9%. Le dosage de l'azote protéique, de l'iode radioactif total et thyroxinien a été opéré sur le produit obtenu, la thyroxine étant séparée des produits de l'hydrolysat barytique par extraction au butanol¹⁰. Comme les quantités de protéines recueillies à partir de chaque organe étaient assez faibles, on a étudié les caractères de la thyroglobuline dans l'extrait total, sauf dans un petit nombre de cas où la purification de la protéine a été réalisée. Les essais résumés antérieurement ayant montré que l'on peut repérer la protéine marquée dans un mélange, la solubilité des fractions radioactives de l'extrait devait permettre de l'identifier et de comparer les produits formés par l'organe dans les diverses conditions réalisées. Par ailleurs, il a déjà été signalé que l'extrait thyroïdien d'un porc normal (140 kg) ayant reçu en injection dans la veine marginale de l'oreille 1 millicurie I^{131} et sacrifié 24 heures après, a été préparé et étudié. Dans tous les cas, un contrôle histologique de l'état de la glande a été opéré. Aucune particularité n'a été constatée dans les organes d'animaux normaux (Chien 1, 16 kg, poids de la glande thyroïde = 1.71 g; Chien 2, 27 kg, p. gl. t. = 1.55 g; Chien A, 22 kg, p. gl. t. = 1.77 g; Chien D, 9 kg, p. gl. t. = 0.92 g; Chien E, 7.5 kg, p. gl. t. = 0.66 g; Chien H, 11 kg, p. gl. t. = 1.67 g; Chien M, 10 kg,

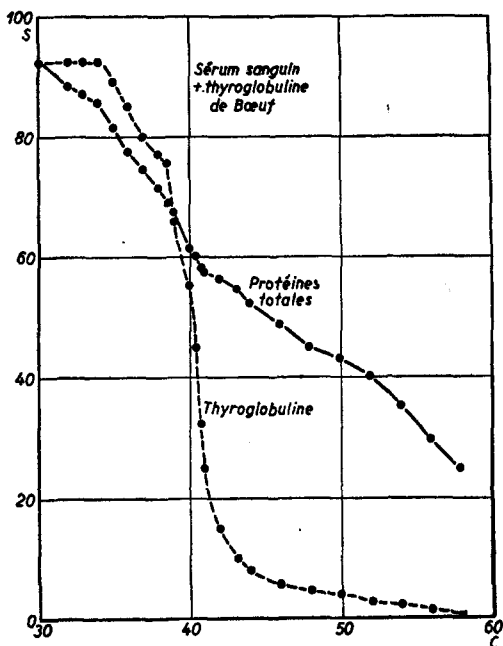


Fig. 5. Courbes de solubilité de la thyroglobuline marquée de Bœuf (0.95 mg N/ml; $0.32 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml) mélangée à des protéines du sérum total (5.25 mg N/ml) en fonction de concentrations croissantes en sulfate d'ammonium ($pH = 6.6$, 23° , temps d'équilibration: 24 heures).

Abscisses: C = concentration en sulfate d'ammonium en % de la saturation.

Ordonnées: tracé continu (—) S = % des protéines totales en solution; tracé discontinu (---) % de la radioactivité dans la solution.

* Nous remercions les Laboratoires de l'Endopancrine d'avoir mis à notre disposition ce produit, les laboratoires Theraplix de nous avoir fourni les dérivés du thiouracile utilisés dans ce travail et les laboratoires Fournier, l'héparine employée.

p.g.l.t. = 0.95 g; Chien N, 9.3 kg, t.g.l.t. = 1.48 g; Porc, 140 kg, p.g.l.t. = 15.5 g). Chez les chiens normaux, environ 10% de la radioactivité totale de l'extrait thyroïdien ont été retrouvés dans la thyroxine 24 heures après l'injection d' ^{131}I , (par exemple: $2.4 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml pour I* thyroxinien et $22.6 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml pour I* total). Chez le porc normal, 19% d' ^{131}I total étaient présents dans la thyroxine ($2.88 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml pour I* total et $0.53 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml pour I* thyroxinien). La glande des chiens traités à la thyroestimuline présentait l'aspect typique de l'organe en forte hyperactivité (épithélium bordant les vésicules turgescent et forte augmentation de la hauteur des cellules) (Chien B, 16.5 kg, poids de la glande thyroïde = 1.21 g; Chien J, 6.0 kg, p.g.l.t. = 0.71 g; Chien L, 7.2 kg, p.g.l.t. = 1.33 g). Chez ces animaux, environ 30% de la radioactivité totale des extraits était liée à la thyroxine 24 heures après administration d' ^{131}I , ce qui montre l'accélération de la synthèse de l'hormone par la thyroestimuline (par exemple: $2.5 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml pour I* thyroxinien et $8.6 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml pour I* total). Le traitement au propylthiouracile et au benzylthiouracile a provoqué des modifications histologiques typiques traduisant leur réduction d'activité, en particulier une diminution importante du volume des vésicules colloïdes; il n'a toutefois pas été assez long pour permettre la constitution de goîtres (Chien C traité au propylthiouracile, 12.5 kg, poids de la thyroïde 1.60 g; Chien I, traité au propylthiouracile, 12.0 kg, p.g.l.t. = 1.71 g; Chien K, traité au benzylthiouracile, 8.5 kg, p.g.l.t. = 0.59 g). Le traitement par les antithyroïdiens ralentit fortement la formation de la thyroxine radioactive, car celle-ci ne renferme qu'une fraction minime, trop faible pour être mesurée avec précision, d' ^{131}I total des extraits 24 heures après l'injection d'iodures marqués (par exemple: environ 10 200 impulsions/min/ml pour I* thyroxinien et $175 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml pour I* total).

Nous n'avons disposé dans tous ces essais que de quantités assez faibles de protéines; aussi, les courbes de solubilité n'ont-elles été établies pour ceux-ci qu'au moyen d'un nombre de points relativement restreints. Elles sont, de ce fait, sensiblement moins précises que celles présentées dans les paragraphes précédents et ne sauraient être discutées avec sécurité en ce qui concerne l'hétérogénéité de la thyroglobuline. Elles permettent néanmoins la comparaison que nous nous proposons de faire et sont significatives en ce qui concerne les limites de précipitation des protéines marquées.

2. Thyroglobuline marquée de Porc et de Chien (animaux normaux)

Nous avons observé au cours d'un travail antérieur¹ que la solubilité des thyroglobulines de Chien et de Porc dans des milieux de concentrations croissantes en mélange équimoléculaire de phosphates mono- et dipotassique sont pratiquement identiques. Il y avait lieu de reprendre avec plus de précision cette étude, n'ayant porté que sur une préparation, et de l'étendre au cas du sulfate d'ammonium comme agent de précipitation. On trouvera dans la Fig. 6 les graphiques obtenus à partir des extraits d'organes de deux chiens normaux, étudiés en mettant en œuvre comme sel neutre soit le sulfate d'ammonium à $p_H = 6.6$, soit le mélange équimoléculaire de phosphates mono- et dipotassique $p_H = 6.5$. Nous leur avons adjoint (Fig. 7) un document établi à partir d'une thyroglobuline de Porc normal, n'ayant pas reçu ^{131}I , et ceux fournis par l'étude d'un extrait thyroïdien radioactif de Chien en présence du mélange de phosphate mono- et dipotassique de $p_H = 6.5$. Par ailleurs, l'examen des Figs. 3 et 4 rend compte de la solubilité de la thyroglobuline de Porc en présence de sulfate d'ammonium. La validité de la comparaison réalisée dans ce dernier cas ne saurait être mise en doute, puisque les solubilités des thyroglobulines marquées et non marquées de même origine sont identiques*.

L'examen des Figs. 4 et 6 illustre la différence de solubilité des thyroglobulines de Porc et de Chien en présence de sulfate d'ammonium, différence que les mêmes protéines ne manifestent pas notablement dans leur précipitation par les phosphates alcalins (Fig. 7). Dans le cas du sulfate d'ammonium, les deux thyroglobulines précipitent à peu près complètement, celle de Porc entre [34] et [42] (Figs. 3 et 4), celle de Chien

* Toutes les courbes relatives à l'extrait thyroïdien ont été établies compte tenu de la présence dans ceux-ci d'azote non protéique. Les quantités de celui-ci présentes (N soluble à [90]) ont été déduites de N total quand les dosages ont été opérés par microkjeldahl.

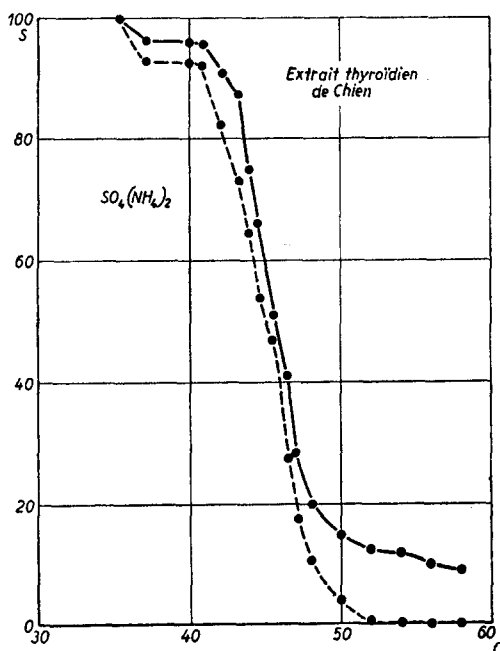


Fig. 6. Courbes de solubilité des protéines totales et des protéines marquées de l'extrait thyroïdien du Chien normal 2 (2.9 mg N/ml; $22.6 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml) en fonction de concentrations croissantes en sulfate d'ammonium ($p_H = 6.6$, 23° , temps d'équilibration: 24 heures).

Abscisses: C = concentration en sulfate d'ammonium en % de la saturation.

Ordonnées: tracé continu (—) S = % des protéines en solution; tracé discontinu (---) S = % de la radioactivité dans la solution.

entre [41] et [48] (Fig. 6). Dans le cas des phosphates alcalins l'un et l'autre s'insolubilisent entre [43] et [50] (Fig. 7), celle de Chien paraissant sur certaines de nos courbes, non reproduites ici, très légèrement plus soluble que celle de Porc (début de précipitation à [44-45], fin de précipitation à [48]).

L'identification de la thyroglobuline, seule protéine iodée présente, est facilement réalisée par la technique employée dans les extraits de la glande où elle constitue à l'état normal la plus grande partie des protéines. En effet, la radioactivité n'est entraînée qu'avec une protéine dont la solubilité et l'hétérogénéité en milieu salin sont caractéristiques de la thyroglobuline, à une faible adsorption des fractions les moins solubles près. La courbe des variations de la radioactivité en fonction de C ne s'écarte plus ou moins de celle de l'azote protéique total qu'à ses deux extrémités, ce qui tient à l'existence dans les extraits de 10 à 15% de protéines autres que la thyroglobuline (fractions de tête moins solubles et fractions de queue plus solubles). Les résultats obtenus permettent

Bibliographie p. 588.

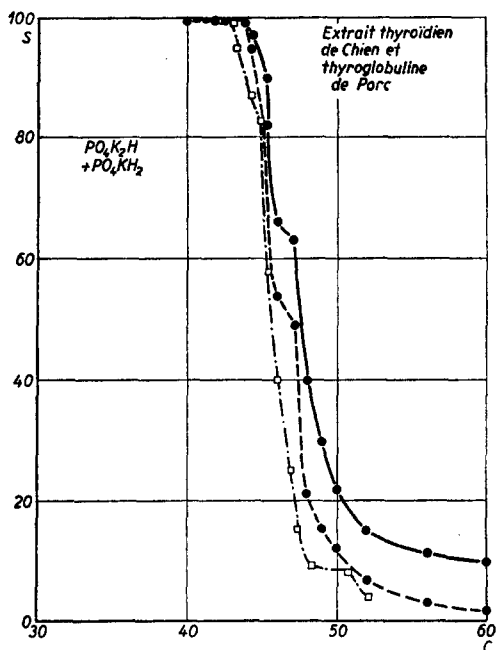


Fig. 7. Courbes de solubilité: 1. des protéines totales de l'extrait thyroïdien et des fractions protéiques marquées du Chien normal 3 (0.95 mg N/ml; $22.6 \cdot 10^6$ impulsions/min/ml); 2. de la thyroglobuline purifiée (non radioactive) d'un Porc normal (1.15 mg N/ml) en fonction de concentrations croissantes en mélange équimoléculaire de phosphates mono- et dipotassique ($p_H = 6.5$, 23° , temps d'équilibration: 24 heures).

Abscisses: C = concentrations en mélange équimoléculaire $PO_4KH_2 + PO_4K_2H$ 3.5 M (en volume). Ordonnées: tracé continu (—) S = % des protéines de l'extrait thyroïdien de Chien en solution; tracé discontinu 1 (---) S = % de la radioactivité des protéines de l'extrait thyroïdien de Chien dans la solution; tracé discontinu 2 (-·-·-·-) S = % de la thyroglobuline de Porc en solution.

donc à la fois d'identifier cette dernière dans un extrait thyroïdien, de préciser si des protéines iodées de caractères aberrants y sont présentes et de définir, avec un certain degré d'approximation, la proportion de thyroglobuline en % de protéines totales.

3. Thyroglobuline marquée de chiens traités à la thyroostimuline

Les protéines de l'extrait thyroïdien des trois chiens traités par la thyroostimuline dans les conditions indiquées plus haut ont fait l'objet d'une étude dont les résultats sont illustrés par un exemple à partir duquel la Fig. 8 a été établie.

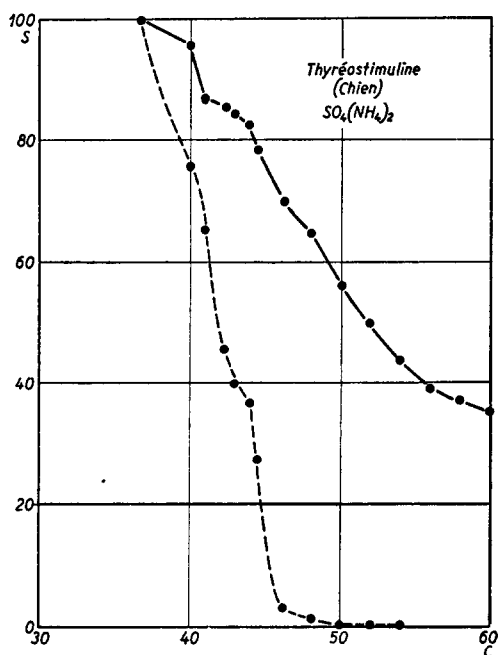


Fig. 8. Courbes de solubilité des protéines totales et des fractions protéiques marquées de l'extrait thyroïdien du Chien J traité par 1000 unités HEYL-LAGUEUR de thyroostimuline (10 injections quotidiennes de 100 unités) (1.0 mg N/ml; $8.6 \cdot 10^8$ impulsions/min/ml), en fonction de concentrations croissantes en sulfate d'ammonium (pH = 6.6, 23°, temps d'équilibration: 24 heures).

Abscisses: C = concentration en sulfate d'ammonium en % de la saturation.
Ordonnées: tracé continu (—) S = % des protéines en solution; tracé discontinu (---) S = % de la radioactivité dans la solution.

Le décalage des courbes de solubilité (protéines totales) et de radioactivité est manifeste dans les extraits de l'organe soumis à une hyperactivité prolongée par administration de thyroostimuline à doses répétées. Dans l'exemple cité, la totalité de la protéine radioactive est précipitée à [46] en sulfate d'ammonium comme dans les préparations provenant d'animaux normaux, mais 60% environ des protéines demeurent alors en solution, au lieu de 10 à 15%. Deux autres expériences du même type ont donné lieu à des observations analogues, la radioactivité précipitant totalement à [46] avec 40 à 50% des protéines. La thyroglobuline ne constitue donc qu'une fraction beaucoup plus faible des protéines totales des extraits après traitement à la thyroostimuline, mais elle conserve alors ses caractères de solubilité. Elle ne présente, à cet égard, aucune différence avec la protéine se formant physiologiquement en dehors de toute hyperactivité de la glande provoquée par injection de l'hormone hypophysaire. La signification de ces faits sera examinée plus bas.

4. Thyroglobuline marquée de chiens traités au propyl- ou au benzylthiouracile

Les extraits thyroïdiens de trois animaux, dont deux traités au propylthiouracile et un au benzylthiouracile, ont permis des observations assez homogènes pour que nous nous bornions à en présenter un exemple dans la Fig. 9.

Toutes les courbes obtenues sont nettement différentes de celles déterminées sur des extraits de glandes provenant d'animaux normaux ou traités par la thyroostimuline. Elles comportent un groupe de fractions protéiques précipitant entre [42] et [48] en sulfate d'ammonium, entraînant dans leur insolubilisation une radioactivité uniforme et présentant, de ce fait, les mêmes caractères que la thyroglobuline des animaux normaux. Mais, contrairement à ce qui a lieu dans les extraits thyroïdiens des chiens

normaux ou traités par la thyroestimuline, d'autres protéines, précipitant à des taux plus élevés en sels, sont radioactives. Il en découle qu'après l'administration des dérivés étudiés du thiouracile, réalisée dans les conditions où nous nous sommes placés, les extraits thyroïdiens renferment, en dehors de la thyroglobuline (50 à 70% des protéines totales), une ou plusieurs autres iodoprotéines différentes de celle-ci (30 à 50% des protéines totales). La première ne peut pas être distinguée de celle des animaux normaux par sa solubilité, tandis que les secondes n'existent pas chez ceux-ci. L'interprétation de ces faits en ce qui concerne les dérèglements expérimentaux ou pathologiques de la formation de la thyroglobuline sera développée plus bas.

C. Thyroglobuline iodée sans dénaturation

La fixation de l'iode sur les protéines ne conduit à des produits non dénaturés que si elle est réalisée dans des conditions fort éloignées de celles adoptées par de nombreux

auteurs se proposant d'obtenir des produits de teneur aussi élevée que possible en thyroxine. Par contre, la sérualbumine a été iodée sans dénaturation par HUGHES ET STRAESSLE¹² et sans doute aussi par BONOT¹³. Il est probable qu'il en est de même de l'insuline iodée par HARRINGTON ET NEUBERGER¹⁴, puisque l'activité biologique de celle-ci peut être partiellement restaurée par déshalogénéation. Toutefois, aucune indication précise ne peut être retenue des recherches antérieures en ce qui concerne la thyroglobuline, car la dénaturation de cette protéine en milieu faiblement acide ou par l'alcool évolue avec une facilité exceptionnelle. Nous nous sommes proposé de l'ioder en prenant comme critère de sa dénaturation la diminution de sa solubilité en présence de sels neutres. La modification de solubilité par dénaturation que présentent les protéines a été établie par de nombreux travaux. Il convenait, non seulement de contrôler son absence, mais aussi de rechercher si l'ioduration de la thyroglobuline exerce une influence sur ses courbes de solubilité en fonction de concentrations croissantes en un sel neutre. En particulier, nous nous sommes proposé d'étudier si le taux de certaines des fractions mises en évidence sur les graphiques traduisant la solubilité du produit naturel aux diverses concentrations en sel n'augmente pas au dépens d'autres après halogénéation.

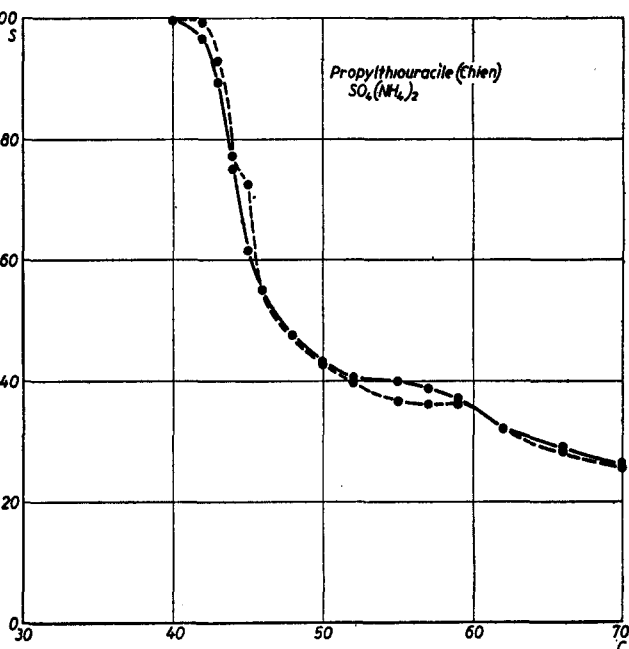


Fig. 9. Courbes de solubilité des protéines totales et des fractions protéiques marquées de l'extrait thyroïdien du Chien I traité au propylthiouracile (1.70 mg N/ml; $17.5 \cdot 10^8$ impulsions mg/ml) en fonction de concentrations croissantes en sulfate d'ammonium (pH = 6.6, 23°, temps d'équilibration: 24 heures). Abscisses: C = concentration en sulfate d'ammonium en % de la saturation.

Ordonnées: tracé continu (—) S = % des protéines en solution; tracé discontinu (----) S = % de la radioactivité dans la solution.

Un premier lot important de thyroglobuline pure de Porc, renfermant 0.81% I dont 0.22% I thyroxinien, a été préparé à partir de glandes normales¹. 150 ml de solution de cette protéine (1.52 mg N et 0.38 mg tyrosine/ml) ont été additionnés de 1.5 g CO_2NaH ce qui a amené le p_H à 7.2 (électrode de verre, 15°). Après refroidissement à 0°, on a versé, en une demi-heure et goutte à goutte, 150 ml d'une solution d'iode $N/500$ ($I = 0.254 \text{ g} + IK = 0.508 \text{ g p. 1000 ml}$), soit 1 atome-gramme par molécule-gramme de tyrosine contenue dans la protéine. Le p_H du milieu a été contrôlé à de fréquentes reprises et maintenu à 7.2 par des additions successives de petites quantités de CO_2NaH . Après un temps de repos de 15 minutes à 0°, la solution a été dialysée à 0° contre eau distillée jusqu'à élimination d' I^- , ce qui a provoqué sa dilution. Elle renfermait en fin d'opération 0.59 mg N/ml et la thyroglobuline présente contenait 1.79% I total dont 0.29% I thyroxinien. L'enrichissement en halogène était donc dû à peu près uniquement à une augmentation du taux des iodotyrosines. Un second lot de thyroglobuline a été préparé à partir d'autres glandes de Porc. Elle renfermait 0.50% I, 0.21% de thyroxine et 0.58% de diiodotyrosine. Son ioduration réalisée avec 1.25 atome-gramme I par molécule-gramme de tyrosine a conduit à une protéine contenant 1.63% I, 0.27% de thyroxine et 0.73% de diiodotyrosine; l'enrichissement en iode a donc porté principalement sur la monoiodotyrosine, dont le dosage ne peut pas être réalisé avec précision à de faibles taux.

Des courbes de solubilité en présence de phosphates mono- et dipotassique à concentration croissante ont été établies dans des milieux renfermant environ 1 mg N protéique par ml: 1. sur les solutions des thyroglobulines; 2. sur des solutions des produits iodés; 3. sur des mélanges en proportion diverses des unes et des autres. Dans une première série d'essais, poursuivie à $p_H = 6.5$, le mélange salin employé a été constitué par une solution 3.5 M de phosphates mono- et dipotassique en proportion équimoléculaire. Dans une seconde, réalisée à $p_H = 7.8$, nous avons mis en œuvre une solution 3.5 M de phosphate dipotassique additionnée de la quantité de solution 3.5 M de phosphate monopotassique nécessaire pour obtenir ce p_H (contrôle électrométrique). L'électrophorèse de ces divers milieux a été systématiquement opérée, afin de déceler l'apparition éventuelle d'une hétérogénéité, que ne présente pas la thyroglobuline à $p_H = 6.2^{2*}$.

Il n'y a pas lieu de faire figurer ici le détail des résultats obtenus, car ceux-ci présentent une très grande uniformité. Ni les thyroglobulines naturelles, ni les produits iodés, ni leurs mélanges n'ont pu être distingués les uns des autres par leurs courbes de solubilité ou par leur comportement électrophorétique à $p_H = 6.5$ et 7.8. Les premiers présentent les points d'inflexion décrits dans notre travail antérieur¹ et individualisant trois fractions aux deux p_H étudiés et aucune hétérogénéité décelable à l'électrophorèse n'apparaît après ioduration ménagée. La mobilité électrophorétique n'est pas modifiée par celle-ci.

Comme la thyroglobuline pure de Porc précipite entre des limites de concentration en sels très étroites, de [42] à [48] en présence de mélange tampon de phosphates 3.5 M à $p_H = 6.5$ et de [38] à [43] $p_H = 7.8$. Une modification de la solubilité d'une de ses fractions aurait pu être difficile à mettre directement en évidence; c'est pourquoi, nous avons complété nos recherches par l'essai suivant. Un mélange du produit naturel et du produit iodé (première préparation), dont les protéines renfermaient 1.24% I, a été fractionné à [44], [45] et [46] au mélange équimoléculaire de phosphates mono- et dipotassique de $p_H = 6.5$ (23°, temps d'équilibration: 24 heures), en se plaçant dans des conditions identiques de concentration en protéines ($N = 0.302 \text{ mg/ml}$) et l'on a déterminé la teneur en iode des produits ainsi séparés. Celle-ci est égale à 1.25% I pour les protéines solubles à [44] à 1.24% pour celles solubles à [45] et à 1.27% I pour celles en solution à [46]. Pareil résultat avait déjà été obtenu avec le produit naturel¹, en sorte que les diverses fractions de thyroglobuline n'ont pas pu être séparées, quel que soit le degré d'ioduration de la protéine.

* Nous remercions M. DEMANDE (Centre d'Electrophorèse du C.N.R.S., Paris) d'avoir opéré les déterminations électrophorétiques dont il est fait état dans ce travail.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

1. *Sur l'hétérogénéité de la thyroglobuline et sur sa caractérisation dans un mélange*

Les buts initiaux de notre travail étaient, d'une part de contrôler l'existence de cette hétérogénéité, et, d'autre part de préciser dans quelle mesure elle peut être rattachée à la présence de fractions diversement iodées d'une même protéine. Des résultats significatifs ont été obtenus. En effet, la solubilité de la protéine marquée par l'iode radioactif, identique à celle du produit naturel, a permis à cet égard un contrôle, dont l'examen des figures reproduites plus haut a rendu compte. Dans tous les cas, l'insolubilisation de la protéine radioactive en fonction de concentrations croissantes en sels neutres traduit son hétérogénéité; trois fractions thyroglobuliniques sont en général identifiées, tant dans les préparations purifiées que dans les extraits bruts des glandes provenant d'animaux normaux. L'hypothèse selon laquelle ces fractions pourraient correspondre à des produits diversement iodés ne doit pas être envisagée, car la solubilité de la thyroglobuline artificiellement enrichie en iodotyrosines sans dénaturation est à tous égards identique à celle de la protéine naturelle. Par ailleurs, le mélange de l'une et de l'autre ne conduit à aucune modification de cette propriété. Des différences dans les teneurs en iode total, ou dans la valeur du rapport: $I_{\text{total}}/I_{\text{thyroxinien}}$, ne se sont pas montrées susceptibles d'expliquer l'hétérogénéité observée et la question de la formation d'agrégats dans les milieux riches en sels neutres doit être posée. L'ultra-centrifugation des solutions diluées de thyroglobuline en milieu pauvre en ceux-ci y révèle l'existence de particules d'une seule taille à $p_H = 6.6$ (2.15), mais de nouvelles recherches sont nécessaires pour établir s'il en est bien ainsi dans les conditions où notre étude a été poursuivie.

Le fait qu'il est possible d'étudier la thyroglobuline marquée en mettant en œuvre sa radioactivité confère aux résultats des recherches basées sur celle-ci une grande objectivité. Le repérage de la thyroglobuline marquée dans un mélange de protéines tel qu'il peut être réalisé à partir de la Fig. 5 illustre quelle peut être l'efficacité du fractionnement de mélanges au moyen des sels neutres, dans le cas où le produit que l'on se propose de séparer n'est pas adsorbé ou combiné à d'autres protéines*. Son application aux extraits thyroïdiens (Figs. 3 et 4) permet de contrôler la validité de la méthode de préparation de la thyroglobuline que nous avons proposée dans un travail antérieur¹. Par ailleurs, les observations faites sur des mélanges protéiques renfermant un constituant marqué reposent sur un principe dont l'intérêt dépasse l'étude des thyroglobulines. Elles apportent une contribution nouvelle à l'étude du fractionnement des protéines que l'un de nous poursuit avec Y. DERRIEN.

2. *Sur la thyroglobuline des animaux normaux et sur les caractères des protéines iodées d'extraits thyroïdiens obtenus dans des conditions expérimentales diverses*

Plusieurs faits méritent d'être sommairement discutés, à savoir la spécificité des thyroglobulines de Porc et de Chien et les modifications de composition des extraits glandulaires après administration de thyroestimuline ou d'antithyroïdiens.

Les thyroglobulines de Porc et de Chien marquées présentent des caractères de solubilité pratiquement identiques dans des milieux de concentrations croissantes en

* Cette réserve est importante à formuler car, dans le cas des mélanges de thyroglobulines de solubilité différente en présence de sulfate d'ammonium (Chien et Porc), l'insolubilisation d'un des constituants du mélange entraîne celle de l'autre.

phosphates alcalins, mais non dans ceux renfermant du sulfate d'ammonium où la seconde est soluble à des concentrations en sels plus élevées que la première. Des différences du même ordre ont été mises en évidence dans le cas de nombreuses hémoglobines sanguines de divers animaux, étudiées par l'un de nous, et traduisant la spécificité de ces pigments. La signification de celles observées au cours du travail actuel est la même. De faibles écarts entre les teneurs en tyrosine des thyroglobulines de Porc (3.10%) et de Chien (3.46%) ont déjà été signalés² et leur différence de solubilité démontrent plus nettement encore qu'elles ne sont pas identiques.

Les résultats acquis par l'étude des extraits thyroïdiens doivent être examinés de divers points de vue. Il y a lieu de le faire à partir des graphiques reproduits sur les Figs. 6 à 9 et de l'expression différentielle des courbes qui y sont présentées¹¹, dont trois exemples ont été rassemblés dans la Fig. 10. Ceux-ci traduisent les variations $\Delta S/\Delta C$ en fonction de C , calculées comme il a été indiqué dans un précédent travail¹. Ils permettent de localiser les fractions radioactives parmi les protéines s'insolubilisant aux diverses concentrations en sel*, mais il ne convient pas d'attribuer une signification quantitative aux surfaces des aires correspondant à chacun des constituants.

Chez les animaux normaux, les fractions marquées représentent environ 80% des protéines totales des extraits thyroïdiens** et leurs caractères (limites de concentrations en sels entre lesquelles elles s'insolubilisent, nombre des fractions) sont ceux de la thyroglobuline de l'espèce étudiée. Chez les animaux traités à la thyroestimuline, les produits radioactifs ne constituent plus que 25 à 35% des protéines totales des extraits, mais leurs caractères demeurent ceux propres à la thyroglobuline des sujets normaux de la même espèce. La signification de ce fait paraît être la suivante. La forte stimulation de l'activité thyroïdienne par l'hormone hypophysaire a pour conséquence l'utilisation rapide de la thyroglobuline au fur et à mesure de sa formation, en sorte que la glande devient alors très pauvre en cette protéine; la synthèse de celle-ci est accélérée pour

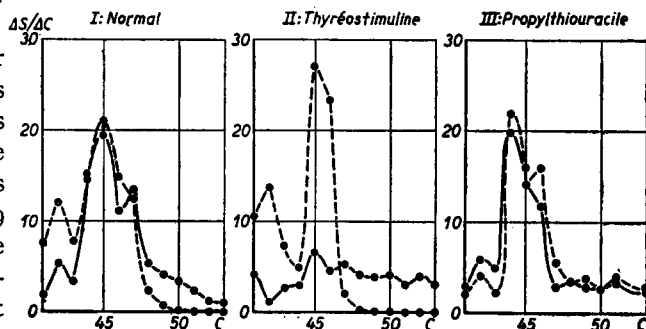


Fig. 10. Variations de $\Delta S/\Delta C$ en fonction de C calculées par différenciation de courbes de solubilité des protéines totales et des fractions protéiques marquées d'extraits thyroïdiens de chiens: I, normal; II, traité par la thyroestimuline; III, traité par le propylthiouracile (pH = 6.6, t 23°, temps d'équilibration: 24 heures).

S = Solubilité des protéines (% des protéines totales) par unité de concentration en sulfate d'ammonium (tracé continu —) et radioactivité des fractions dissoutes par unité de concentration en sel (tracé discontinu - - - -); C = concentration en sulfate d'ammonium en % de la saturation.

* La différenciation des courbes $S = f(C)$ a été opérée à partir du calcul de ΔS (% S précipitant dans chaque intervalle de concentration saline ΔC , égal à 1% de solution saturée de sulfate d'ammonium dans les exemples choisis). Comme dans toutes les figures antérieures, nous avons désigné par S soit le pourcentage des protéines totales (trait continu), soit le pourcentage de la radioactivité (tracé discontinu) en solution à chacune des valeurs de C , concentration en sulfate d'ammonium exprimée en % de la saturation en ce sel.

** Sauf lorsque les animaux ont été mal saignés et lorsque la glande n'a pas été soigneusement disséquée, auquel cas la thyroglobuline peut ne représenter que 60 à 70% des protéines totales.

permettre la formation de thyroxine à un rythme plus rapide (voir p. 14) mais son hydrolyse enzymatique l'est également, puisque la glande s'appauvrit en protéine iodée. Cet aspect particulier de l'action de la thyroestimuline a déjà été envisagé par DZIEMIAN¹⁶, par DE ROBERTIS¹⁷, pour lesquels l'hormone stimule l'activité catheptasique du corps thyroïde. Nos recherches corroborent les résultats obtenus par ces auteurs. L'hydrolyse enzymatique de la thyroglobuline apparaît comme susceptible d'accélérer indirectement la synthèse de cette protéine par rupture d'un équilibre et, de ce fait, de permettre une formation plus rapide de thyroxine.

Chez les chiens normaux ou en hyperactivité sécrétoire, la thyroglobuline est la seule protéine iodée présente dans les extraits glandulaires et ses caractères ne sont pas modifiés par la mise de l'organe en activité "forcée". Il n'en est plus de même lorsque les animaux ont été traités par des dérivés du thiouracile (propyl ou benzyl). Les extraits de la glande renferment alors de 40 à 60% des protéines iodées totales dont les caractères sont ceux de la thyroglobuline de chiens normaux, mais 40 à 60% des protéines iodées y sont différentes de celle-ci. Ces fractions protéiques ne précipitent qu'à des concentrations beaucoup plus élevées en sels neutres et nous en avons constaté l'existence dans les trois cas étudiés. Il en découle que l'action des dérivés du thiouracile ne comporte pas seulement une inhibition de la formation de la thyroxine et de ses précurseurs. De la thyroglobuline, substrat physiologique du processus d'ioduration, est bien encore synthétisée par la glande, mais elle est alors accompagnée d'autres iodoprotéines d'un type différent, absentes de l'organe normal*. Il est prématuré de discuter au sujet de la nature de ces protéines; l'étude de leur fractionnement et celle de leurs constituants iodés (iode "faiblement combiné" ou acides aminés iodés divers), que nous nous proposons d'entreprendre, permettront seules de le faire. Mais on peut dès maintenant remarquer que les travaux consacrés à l'étude des iodoprotéines provenant de corps thyroïdes anormaux^{3, 4} comportent un facteur d'imprécision susceptible d'en diminuer sensiblement l'intérêt. En effet, la séparation de ces protéines ne saurait alors être basée uniquement, comme elle l'a été jusqu'ici, sur l'application des méthodes de fractionnement élaborées pour l'étude des organes normaux^{1, 3}. Ces méthodes isolent la thyroglobuline présente et éliminent les protéines iodées de caractère différent susceptibles de l'accompagner. De premiers essais poursuivis sur des goîtres humains nous ont montré que l'on peut y rencontrer des fractions iodées dont la solubilité diffère de celle des thyroglobulines normales. Aussi l'étude des protéines thyroïdiennes de caractère pathologique, à laquelle nous nous sommes attachés, doit-elle être reprise sur des bases nouvelles.

En définitive, la synthèse de la thyroglobuline paraît donner naissance à une protéine d'un type toujours identique, que l'activité de l'organe soit fortement augmentée par la thyroestimuline ou diminuée par les dérivés du thiouracile; mais, elle va de pair dans ce dernier cas avec la formation d'autres iodoprotéines en même temps qu'avec un ralentissement de la thyroxinogénèse. De nouvelles recherches sont nécessaires pour relier celle-ci à la nature des protéines thyroïdiennes dans lesquelles elle évolue.

* Bien que la solubilité de la thyroglobuline synthétisée par les animaux traités aux dérivés du thiouracile soit identique à celle provenant de chiens normaux, il n'est pas impossible que la composition des unes et des autres diffère.

RÉSUMÉ

1. De la thyroglobuline marquée par l'iode radioactif (^{131}I) a été préparée à partir du corps thyroïde (Bœuf) perfusé avec un milieu renfermant des iodures marqués, ou du même organe (Chien, Porc) provenant d'animaux ayant reçu une injection de ces sels. L'étude de la solubilité de cette protéine en présence de sels neutres à concentration croissante (sulfate d'ammonium, mélange équimoléculaire de phosphates mono- et dipotassique) a été poursuivie en se basant à la fois sur des dosages d'azote protéique et sur des mesures de radioactivité. Ces dernières ont permis d'identifier l'iodoprotéine dans des mélanges complexes, de suivre sélectivement sa précipitation et de contrôler sa purification.

2. Les thyroglobulines de Bœuf et de Porc ne peuvent pas être distinguées l'une de l'autre par leur solubilité dans des milieux de concentration croissante en sulfate d'ammonium ou en phosphates de potassium, tandis que celle de Chien présente à cet égard des caractères spécifiques.

3. L'identification de la thyroglobuline marquée dans un mélange au moyen de sa radioactivité et de sa solubilité a permis d'étudier la composition des extraits thyroïdiens provenant d'animaux normaux (Chien, Porc) et d'animaux (Chien) dont l'activité thyroïdienne a été soit très fortement augmentée par l'administration de thyroestimuline, soit inhibée par celle de benzyl- ou de propylthiouracile. L'injection de doses répétées de thyroestimuline provoque un appauvrissement des extraits en iodoprotéine, mais celle-ci conserve alors les mêmes caractères que chez les animaux normaux. Il en découle que l'hormone hypophysaire, dont il a été antérieurement établi qu'elle accélère la formation de la thyroxine, doit augmenter à la fois la synthèse de la thyroglobuline et l'hydrolyse enzymatique de celle-ci et cela sans modifier la nature de ces processus.

Les extraits des glandes d'animaux ayant reçu des dérivés du thiouracile renferment non seulement de la thyroglobuline de même solubilité que celle des sujets normaux, mais aussi des iodoprotéines différentes de celle-ci. Ces corps n'ont pas pour seule action une réduction de l'activité thyroïdienne, mais ils provoquent aussi la formation d'iodoprotéines différentes de la thyroglobuline en même temps qu'ils ralentissent celle de cette dernière; leur action comporte donc sans doute une certaine déréglement de la synthèse des protéines thyroïdiennes.

4. La thyroglobuline marquée présente la même hétérogénéité que la protéine non radioactive et sa solubilité à des concentrations croissantes en sels neutres traduit au général l'existence de trois fractions. L'ioduration artificielle de la thyroglobuline à un degré plus ou moins grand, sans dénaturation, ne modifie ni ses caractères de solubilité, ni son homogénéité électrophorétique. L'hétérogénéité de cette protéine au regard des tests de solubilité ne traduit donc pas l'existence de fractions plus ou moins iodées; sa nature demeure à établir.

SUMMARY

1. Thyroglobulin marked with radioactive iodine (^{131}I) has been prepared from thyroid gland (ox) by perfusion with a solution containing marked iodides, or from the same gland (dog, pig) of animals which received an injection of the same salts. The study of the solubility of this protein in the presence of neutral salts (ammonium sulphate, equimolecular mixture of mono- and dipotassium phosphates) has been continued, based on the determination of the protein-nitrogen and on the measurements of the radioactivity. These latter measurements have allowed the identification of the iodoprotein in complex mixtures, the following of its selective precipitation, and the controlling of its purification.

2. Ox and pig thyroglobulins cannot be distinguished from each other by their solubility in solutions of increasing ammonium sulphate and potassium phosphates concentration, while the preparation from the dog possesses specific properties in this respect.

3. The identification of marked thyroglobulin in mixtures with the help of its radioactivity and of its solubility has made possible the investigation of thyroid extracts from normal animals (dog, pig) and from those animals (dog) the thyroid activity of which was considerably increased by administration of thyroestimulin or which was inhibited by benzyl- or propylthiouracil. Repeated injections of thyroestimulin caused a decrease of iodoprotein in the extracts, but they still had the same properties as those of normal animals. From this it follows that the hypophysis hormone, of which it has already been established that it accelerates the formation of thyroxine, must increase simultaneously the synthesis of thyroglobulin and its enzymatic hydrolysis and that without altering the nature of these processes.

Gland extracts of animals treated with derivatives of thiouracil contain not only thyroglobulin of the same solubility as that of normal animals, but also other iodoproteins. These thiouracil derivatives not only decrease the activity of the thyroid gland but also cause the formation of iodoproteins different from thyroglobulin, while at the same time slowing down the formation of the latter. Their action thus no doubt consists in some disturbance of the synthesis of thyroid proteins.

4. The marked thyroglobulin shows the same heterogeneity as the non-radioactive protein and its solubility at various concentrations of neutral salts in general indicates the presence of three

fractions. Artificial iodination to a more or less considerable degree without denaturation alters neither the solubility properties nor the electrophoretic homogeneity of the thyroglobulin. The fact that this protein appears in solubility investigations to be heterogeneous does thus not prove the presence of fractions iodinated to a greater or lesser extent; its nature remains to be established.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit radioaktivem Jod (^{131}I) markiertes Thyroglobulin wurde aus Schilddrüse (Ochs), die mit einer, markierte Jodide enthaltenden Lösung durchströmt war, oder aus Schilddrüse (Hund, Schwein) von Tieren, die eine Injektion von solchen Salzen erhalten hatten, hergestellt. Die Löslichkeit dieses Eiweißstoffes in Gegenwart von Neutralsalzen (Amoniumsulfat, äquimolekuläre Mischung von primärem und sekundärem Kaliumphosphat) wurde durch Bestimmung des Protein-Stickstoffes und Messung der Radioaktivität fortgesetzt. Die Radioaktivitätsmessungen haben erlaubt, das Jodoprotein in komplexen Gemischen zu identifizieren, seine Fällung selektiv zu verfolgen und seine Reinigung zu kontrollieren.

2. Die Thyroglobuline vom Ochsen und vom Schwein können durch ihre Löslichkeit in Medien von steigender Amoniumsulfat- und Kaliumphosphatkonzentration nicht unterschieden werden, während das Thyroglobulin vom Hund in dieser Hinsicht spezifische Eigenschaften besitzt.

3. Die Identifizierung von markiertem Thyroglobulin in Gemischen mit Hilfe seiner Radioaktivität und seiner Löslichkeit hat es ermöglicht, die Zusammensetzung von Schilddrüse-Extrakten von normalen Tieren (Hund, Schwein) und von solchen Tieren (Hund) zu untersuchen, deren Schilddrüsen-Aktivität entweder durch Zufuhr von Thyreostimulin stark erhöht war, oder durch Benzyl- oder Propylthiouracilzufuhr gehemmt war. Wiederholte Thyreostimulin-Injektionen bewirken eine Abnahme des Jodoproteingehaltes der Extrakte, aber das Jodoprotein behält dieselben Eigenschaften, wie bei normalen Tieren. Hieraus folgt, dass das Hypophysenhormon, von dem früher festgestellt worden war, dass es die Thyroxinbildung beschleunigt, die Synthese und die enzymatische Hydrolyse des Thyroglobulins gleichzeitig verstärken muss und zwar ohne die Natur dieser Vorgänge zu verändern.

Drüsenextrakte von mit Thiouracilderivaten vorbehandelten Tieren enthalten nicht nur Thyroglobulin von gleicher Löslichkeit wie dasjenige von normalen Tieren, sondern auch andere Jodoproteine. Die Thiouracilderivate vermindern nicht nur die Aktivität der Schilddrüse sondern sie bewirken auch die Bildung von Jodoproteinen, die vom Thyroglobulin verschieden sind, während sie die Bildung des letzteren verlangsamen; sie greifen also zweifellos in die Synthese der Schilddrüsenproteine ein.

4. Markiertes Thyroglobulin ist ebenso heterogen wie das nicht radioaktive Eiweiß und seine Löslichkeit bei verschiedenen Neutralsalzkonzentrationen lässt im allgemeinen das Vorhanden von drei Fraktionen erkennen. Künstliche, mehr oder weniger starke Jodierung ohne Denaturierung verändert weder die Löslichkeitseigenschaften noch die elektrophoretische Einheitlichkeit des Thyroglobulins. Die Tatsache, dass dieses Protein in den Löslichkeitsversuchen heterogen erscheint, beweist also nicht das Vorhandensein von mehr oder weniger jodierten Fraktionen; sie harret noch ihrer Aufklärung.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ Y. DERRIEN, R. MICHEL ET J. ROCHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 454.
- ² Y. DERRIEN, R. MICHEL, K. O. PEDERSEN ET J. ROCHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 436.
- ³ J. W. CAVETT, *J. Biol. Chem.*, 114 (1936) 65.
- ⁴ J. W. CAVETT, C. O. RICE, AND J. F. MAC CLENDON, *J. Biol. Chem.*, 110 (1935) 673.
- ⁵ R. RAWSON, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 50 (1949) 491 (revue générale).
- ⁶ E. B. ASTWOOD, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 50 (1949) (revue générale).
- ⁷ A. TAUBOG, I. L. CHAIKOFF, AND D. D. FELLER, *J. Biol. Chem.*, 171 (1947) 189.
- ⁸ J. ROCHE, R. MICHEL ET M. LAFON, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 453.
- ⁹ J. W. CAVETT AND S. E. SELJESKOG, *J. Biol. Chem.*, 100 (1933) xxiv.
- ¹⁰ N. F. BLAU, *J. Biol. Chem.*, 110 (1935) 351.
- ¹¹ Y. DERRIEN, *Svensk. Kem. Tidshr.*, 59 (1947) 139.
- ¹² W. L. HUGHES JR AND R. STRAESSLE, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 452.
- ¹³ A. BONOT, *Bull. soc. chim. biol.*, 21 (1939) 1417.
- ¹⁴ C. R. HARRINGTON AND A. NEUBERGER, *Biochem. J.*, 30 (1936) 809.
- ¹⁵ M. HEIDELBERGER AND K. O. PEDERSEN, *J. Gen. Physiol.*, 19 (1935) 95.
- ¹⁶ A. J. DZIEMIAN, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 21 (1943) 339.
- ¹⁷ E. DE ROBERTIS, *Anat. Rec.*, 80 (1941) 219.

Reçu le 22 juillet 1950