

CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE  
DES ACIDES AMINÉS IODÉS RADIOACTIFS DE LA  
THYROGLOBULINE MARQUÉE

par

JEAN ROCHE, MARIAN JUTISZ\*, SERGE LISSITZKY ET RAYMOND MICHEL

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

Les acides aminés radioactifs marqués par  $^{131}\text{I}$  ont été caractérisés dans les extraits thyroïdiens et dans leurs hydrolysats par séparation chromatographique sur papier suivie de l'obtention de radioautogrammes, et le dosage approximatif de ces corps dans les taches ainsi individualisées a été réalisé par celui de l'iode total qu'elles renferment<sup>1,2,3</sup>. Les principaux résultats acquis par cette méthode sont, d'une part, la caractérisation de la 3-monoiodotyrosine en tant que précurseur de la 3,5-diiodotyrosine et de la thyroxine dans les protéines thyroïdiennes<sup>1,2</sup> et, d'autre part, celle de traces des trois mêmes corps à l'état libre dans les extraits glandulaires<sup>3</sup>. Néanmoins, l'hydrolyse alcaline de très petites quantités de thyroglobuline marquée mise en œuvre pour libérer ces acides aminés entraîne la désioduration d'une partie importante de ceux-ci, processus dont il n'est pas certain qu'il ne conduise pas à la formation du dérivé monoiodé; il en est de même de l'action d'enzymes thyroïdiens sur des traces de diiodotyrosine. Par ailleurs, les radioautogrammes publiés jusqu'ici offrent un degré de complication assez grand, dû à la présence d'un mélange de produits iodés dont certains sont mal définis. Aussi y avait-il lieu d'étendre les recherches en cours sur l'existence de la 3-monoiodotyrosine comme constituant de la thyroglobuline et sur les produits de la protéolyse physiologique de cette protéine. Il convenait pour cela de disposer d'une technique plus simple et, si possible, plus précise que la radioautographie. Le but de ce mémoire est de décrire celle, basée sur un principe déjà mis en œuvre par KESTON, UDENFRIEND ET LEVY<sup>4</sup>, que nous avons élaborée pour séparer et doser les acides aminés et les peptides iodés radioactifs dans leurs mélanges.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les travaux antérieurs sur la chromatographie de la thyroxine, de ses dérivés et de ses précurseurs<sup>5,6,7</sup> et sur le repérage radioautographique des mêmes corps marqués ainsi séparés<sup>1,2,3</sup> ont servi de point de départ à nos recherches. Celles-ci, poursuivies sur de la thyroglobuline radioactive renfermant  $^{131}\text{I}$ , ont comporté, d'une part, la mise au point de la séparation de traces d'acides aminés iodés marqués à partir d'hydrolysats protéiques et, d'autre part, celle d'une technique de chromatographie quantitative basée sur la radioactivité de ces corps.

\* Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, Paris.

### *1. Matériel d'étude, préparation et fractionnement des hydrolysats.*

La thyroglobuline marquée a été préparée à partir de corps thyroïde de chiens ayant reçu 24 heures avant le prélèvement de l'organe 0.5-1.0 millicurie  $^{131}\text{I}$  à l'état d'iodure de sodium, sans entraîneur\*, selon une technique décrite par certains d'entre nous<sup>8</sup>. Les préparations se prêtant le mieux à l'étude projetée présentaient une radioactivité de 0.5 à 1.0.  $10^6$  impulsions/min/mg N. La protéine marquée a été soumise, par portions de 50 mg, à l'action de divers agents d'hydrolyse, afin d'en libérer quantitativement les acides aminés iodés.

Cette opération ne peut pas être réalisée au moyen de réactifs acides, lesquels provoquent une déshalogénération assez rapide des iodotyrosines. Elle l'a été tout d'abord par la soude ou la baryte, selon une technique adoptée dans des travaux antérieurs<sup>1,2</sup>. Les quantités d'iode apparaissant alors à l'état d'iodures sont très importantes; aussi nous sommes-nous arrêtés par la suite à l'hydrolyse trypsique pour éviter toute modification des acides aminés iodés, les produits identifiés pouvant, dans ces conditions, être considérés à coup sûr comme des constituants de la thyroglobuline. Des échantillons de 50 mg de thyroglobuline marquée dissous dans 1 ml d'eau ont été hydrolysés pendant 13 heures à 100° en tube scellé, les uns par 1 ml NaOH 2 N, les autres par 1 ml Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O à 8%. D'autres ont été traités par 7 mg d'une préparation purifiée de trypsine (mélange de protéinases pancréatiques Armour, Chicago) à pH = 8.4 et à 38° pendant 48 heures, sous toluène.

Il était nécessaire, l'hydrolyse une fois terminée, de séparer quantitativement les acides aminés iodés pour les soumettre à la chromatographie. Nous y sommes parvenus en traitant par le n-butanol les hydrolysats portés à pH = 1.0. Ce solvant extrait la thyroxine des milieux acides ou alcalins<sup>9,10</sup> et nous avons établi que la diiodotyrosine et la monoiodotyrosine ne sont extraites quantitativement par lui qu'à pH = 1.0-2.0, des pertes importantes étant enregistrées aux pH supérieurs à 3.0.

Les hydrolysats de thyroglobuline, d'un volume de 2 ml, ont été additionnés de 0.2 mg de monoiodotyrosine, de 0.2 mg de diiodotyrosine, de 0.2 mg de thyroxine et, dans certains cas, de 0.3 mg de INa, servant de substances d'entraînement pour les traces de dérivés marqués présentes, puis de 0.5 ml d'acide chlorhydrique concentré. Après avoir complété à 6 ml par de l'eau distillée on a extrait 3 fois par 6 ml de butanol préalablement agité au contact de ClH 0.1 N. Les solutions butanoliques ont été rassemblées, centrifugées pour éliminer complètement la phase aqueuse, puis concentrées sous vide à une température inférieure à 50°. Après reprise du résidu sec par quelques ml d'eau distillée, on a séché à nouveau sous vide afin d'éliminer l'acide chlorhydrique libre et dissous dans 1 ml NH<sub>4</sub>OH N le résidu obtenu, lequel renferme la totalité des acides aminés iodés, des iodures et, éventuellement, des peptides iodés.

### *2. Chromatographie quantitative et établissement des diagrammes de radioactivité (radio-chromatogrammes)*

*Principe.* On prépare un chromatogramme sur papier de la solution à étudier et d'une solution de référence renfermant des corps iodés connus. On y révèle par des réactifs appropriés les constituants iodés afin de les repérer avec précision par rapport aux corps de référence et de les identifier. Le chromatogramme (50 cm de long) est alors découpé en lanières de 1 cm de large et l'on mesure au compteur de GEIGER-MÜLLER la radioactivité de chacune de celles-ci. Les résultats sont exprimés graphiquement (voir Fig. 1), en courbes qui traduisent la radioactivité du chromatogramme en fonction de la distance à partir de l'origine. La dénomination de radiochromatogramme nous paraît

\* Nous remercions le laboratoire d'Harwell (Angleterre) de nous avoir fourni l'iode radioactif utilisé dans ce travail, grâce à l'obligeant intermédiaire du C.N.R.S. (Paris).

appropriée pour désigner ces courbes. Elles présentent une succession de clochers dont la position caractérise divers constituants iodés du mélange étudié identiques à ceux repérés sur le chromatogramme de référence ou inconnus. L'aire des surfaces correspondant à la radioactivité de chacune des taches définit le taux relatif de chaque corps marqué présent.

*Justification et mode opératoire.* Le mélange butanol-acide acétique-eau a été adopté pour la séparation des trois acides aminés iodés (mono-, diiodotyrosine et thyroxine) et des iodures, la révélation des taches du chromatogramme par la ninhydrine étant plus satisfaisante que si l'on emploie l'ammoniaque comme phase stationnaire<sup>6, 7</sup>.

Des essais préliminaires ont été poursuivis sur quatre solutions renfermant respectivement, par ml, 1,5 mg de monoiodotyrosine, 2,3 mg de diiodotyrosine, 3,0 mg de thyroxine et 1,0 mg de INa dans NH<sub>4</sub>OH 2 N et sur leur mélange. Des volumes égaux de ces solutions ont été déposés au moyen d'un capillaire jaugé sur une feuille de papier Whatmann No 1. Le chromatogramme a été développé dans un mélange butanol 78, acide acétique 5, eau 17, la phase aqueuse étant constituée par 5 ml de la phase solvant additionnés de 50 ml d'eau. Les acides aminés ont été révélés à chaud par une solution à 0,2% de ninhydrine renfermant 2% d'acide acétique. La technique au nitrate d'argent proposée<sup>7</sup> pour révéler la tache d'iodure minéral ne nous a pas donné entière satisfaction. Nous avons employé dans le même but un réactif à l'amidon, préparé extemporanément, par mélange de deux parties d'empois d'amidon à 1%, d'une partie de IO<sub>3</sub>K à 1% et d'une partie de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>N. La libération de l'iode par l'action de ce réactif se manifeste, à froid, par une coloration bleu foncé de la tache correspondante, disparaissant lentement à la température du laboratoire et rapidement à chaud. Il y a donc lieu de marquer l'emplacement de la coloration bleue aussitôt qu'elle a été mise en évidence. La ninhydrine ne colore plus les taches d'acides aminés sur papier traité au réactif à l'amidon; il convient donc d'arrêter l'application de celui-ci à la hauteur de celle propre aux iodures, de sécher la feuille et de continuer la révélation avec la solution de ninhydrine. Cette opération ne présente aucune difficulté, étant donnés les Rf très différents des iodures et des acides aminés iodés. Les valeurs de Rf enregistrées dans de nombreux essais ont été: INa 0,20-0,22, monoiodotyrosine 0,41-0,44, diiodotyrosine 0,54-0,56, thyroxine 0,72-0,80. En employant comme agent de développement le mélange de PARTRIDGE<sup>11</sup> on enregistre des valeurs de Rf égales à 0,20-0,22 pour INa, 0,50-0,55 pour la monoiodotyrosine, 0,62-0,67 pour la diiodotyrosine et 0,80-0,85 pour la thyroxine.

Nous avons soumis à l'analyse chromatographique les hydrolysats alcalins et trypsiques de thyroglobuline marquée, selon la même technique et en juxtaposant sur la même feuille de papier filtre 1 goutte calibrée des solutions à étudier, d'une radioactivité égale à 10-20 000 impulsions/min, et 1 goutte calibrée de chacune des solutions témoin. Après révélation des taches à la ninhydrine et à l'amidon et repérage par comparaison avec celles des corps de référence (définition de leur position et délimitation de leur surface par un trait de crayon) le chromatogramme est découpé en bandes correspondant à chaque hydrolysat. Chaque bande est divisée en sections rectangulaires d'1 cm de haut, entre la ligne de départ (dépôt de la goutte) et le front du solvant, et l'on détermine la radioactivité de ces fractions successives du chromatogramme. Pour cela, chaque section est collée au moyen de cellophane gommée sur un rectangle de papier que l'on a enroulé sur un cylindre de diamètre légèrement supérieur à celui du compteur de GEIGER-MÜLLER CEA cylindrique, utilisé comme appareil de mesure.

La radioactivité de chaque chromatogramme, au total 10 à 20 000 impulsions/min, est déterminée sur cinquante sections et l'on mesure d'autre part, sur un échantillon témoin, celle d'une goutte calibrée de la solution soumise à l'analyse. Il est possible à partir des données obtenues d'établir la courbe de radioactivité relative du chromatogramme (radiochromatogramme) en portant en abscisses les distances, en centimètres, à partir de l'origine (lieu de dépôt de la goutte) et en ordonnées le pourcentage de la radioactivité totale propre à chacune des sections successives.

### 3. Résultats expérimentaux

Les radiochromatogrammes de la Fig. 1 fournissent un exemple de ceux-ci. Ils illustrent la caractérisation des taches radioactives correspondant aux iodures (I) à la monoiodotyrosine (II), à la diiodotyrosine (III) et à la thyroxine (IV) et l'intensité relative de leur radioactivité. La première, opérée grâce au chromatogramme de référence, et la seconde, déterminée par des mesures directes, permettent l'établissement de documents reproductibles, que nous avons réalisé sur environ trente préparations sans rencontrer de difficultés techniques particulières.

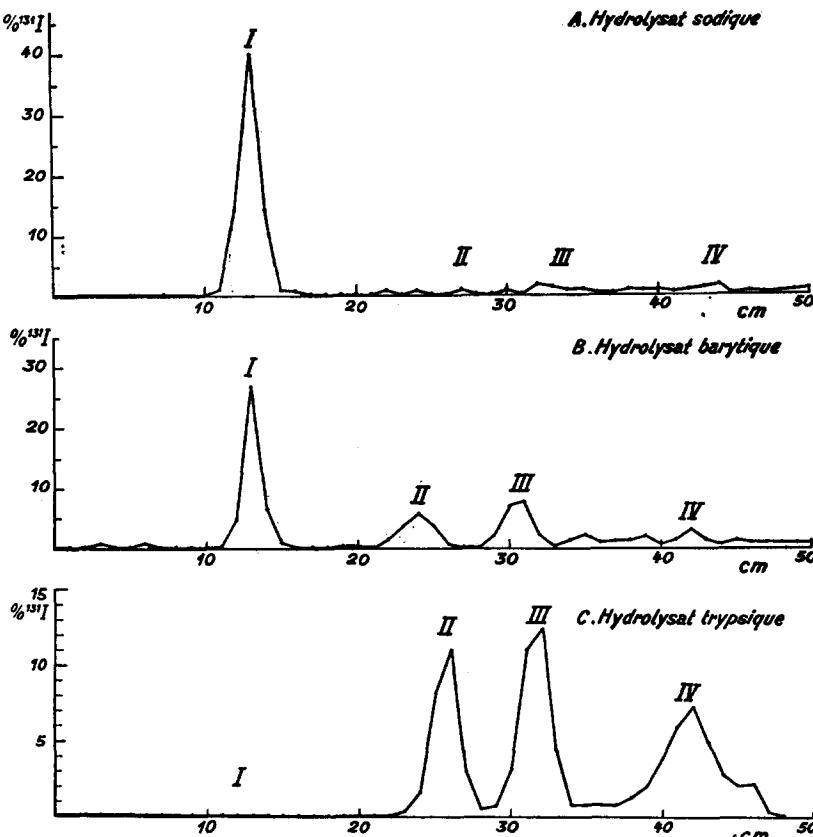


Fig. 1. Radiochromatogrammes des fractions solubles dans le *n*-butanol des hydrolysats sodique (A), barytique (B) et trypsinique (C) de thyroglobuline de Chien marquée. I. Iodures, II. Monoiodotyrosine, III. Diiodotyrosine, IV. Thyroxine (conditions d'hydrolyse décrites dans le texte).

Abscisses: % de  $^{131}\text{I}$  total de la prise d'essai

Ordonnées: distance (cm) de l'origine du chromatogramme.

### DISCUSSION DES RÉSULTATS

Il n'y a lieu d'ajouter qu'une très brève discussion à l'exposé des techniques décrites, afin de préciser la signification des résultats. La méthode proposée réalise avec une précision satisfaisante la chromatographie quantitative des corps iodés radioactifs étudiés. Chacun de ceux-ci étant au préalable localisé par rapport à un chromatogramme

*Bibliographie p. 262.*

de référence, la mesure de l'intensité de la radioactivité des taches correspondantes permet d'apprécier la répartition de l'iode radioactif entre celles-ci. L'individualisation des maxima correspondant aux taches d'iodures (I), de monoiodotyrosine (II), de diiodotyrosine (III) et de thyroxine (IV) est réalisée sans aucune ambiguïté sur les radiochromatogrammes et il va de soi que l'existence éventuelle d'autres maxima traduira celle d'autres combinaisons iodées, en particulier de peptides. L'interprétation de résultats obtenus au cours de l'hydrolyse partielle de la thyroglobuline sous l'action de diverses protéinases sera examinée dans un prochain mémoire.

L'expression quantitative de la répartition de la radioactivité sur les chromatogrammes ne saurait être très rigoureuse. Toutefois, l'addition de corps non marqués servant d'entraîneurs permet une localisation assez rigoureuse des corps marqués sur les taches dans lesquelles ils sont associés aux premiers. La technique décrite, susceptible d'être appliquée à d'autres corps radioactifs, peut donc rendre de multiples services.

Une conclusion particulière mérite d'être tirée des résultats obtenus, en ce qui concerne les constituants iodés de la thyroglobuline et leur stabilité en présence de divers agents d'hydrolyse. Le traitement de la protéine par la soude ou la baryte conduit à la libération de quantités importantes d'iodures, tandis qu'il n'en est pas de même de l'hydrolyse trypsique. Dans l'exemple ayant servi à l'établissement de la Fig. 1(C), on retrouve après action de la trypsine 93 % de la radioactivité initiale, dont 33 % dans la monoiodotyrosine, 33 % dans la diiodotyrosine et 27 % dans la thyroxine libres\*. L'hydrolysat trypsique est pratiquement dépourvu d'iodures minéraux, tandis que ceux-ci renferment 70 % d'<sup>131</sup>I après action de la soude et 39 % après traitement de la protéine à la baryte, dans le cas des diagrammes A et B de la Fig. 1\*\*. Il en découle que ces deux réactifs réalisent une désioduration très importante des acides aminés de la thyroglobuline et que leur emploi pour libérer la monoiodotyrosine peut constituer une cause d'erreur importante dans la mise en évidence et, a fortiori, dans le dosage de celle-ci. Par contre, le fait que la monoiodotyrosine est libérée par l'hydrolyse trypsique établit de manière irréfutable que cet acide aminé est un constituant de la thyroglobuline, comme des gorgonines, où il a été également caractérisé par deux d'entre nous, FRO-MAGEOT ET LAFON<sup>12\*\*\*</sup>.

## RÉSUMÉ

1. Une technique de chromatographie quantitative sur papier de corps radioactifs a été élaborée et appliquée à l'étude des constituants iodés de la thyroglobuline marquée. Elle est basée sur l'identification, au moyen d'un chromatogramme témoin, des combinaisons halogénées marquées localisées sur les taches du chromatogramme de la solution inconnue et sur la mesure de la radioactivité de

\* Les valeurs correspondant au taux d'<sup>131</sup>I présent dans chacun des acides aminés n'ont de signification que pour l'exemple choisi (Fig. 1). La monoiodotyrosine donnant naissance à la diiodotyrosine et une partie de celle-ci à la thyroxine, la teneur en chacun de ces acides aminés marqués est nécessairement variable; elle est fonction du temps auquel le corps thyroïde a été prélevé après l'administration d'iode marqué.

\*\* La fraction de l'iode total libéré à l'état d'iodures est très élevée lorsque l'hydrolyse porte sur de très faibles quantités de protéines. La désioduration est beaucoup moins importante si l'on opère sur de plus grandes quantités de protéines, en particulier dans le but de doser la diiodotyrosine ou la thyroxine par des méthodes chimiques; elle atteint rarement 10 % d'I total avec les techniques usuelles.

\*\*\* On ne saurait tirer des taux relatifs d'<sup>131</sup>I présent dans la monoiodotyrosine une conclusion en ce qui concerne la teneur de la protéine en cet acide aminé; il conviendrait pour cela de connaître la teneur en iode total (<sup>127</sup>I + <sup>131</sup>I) de la tache dans laquelle il est localisé<sup>4</sup>.

celles-ci. L'expression graphique des résultats est une courbe (radiochromatogramme) sur laquelle la présence de chaque constituant radioactif se manifeste par un maximum correspondant à une aire proportionnelle à la quantité d'<sup>131</sup>I qu'il apporte.

2. De la monoiodotyrosine est libérée par l'hydrolyse trypsique de la thyroglobuline radioactive avec de la diiodotyrosine et de la thyroxine marquées, et cela sans que des iodures apparaissent simultanément, comme lors des hydrolyses sodique ou barytique de la protéine. Ce fait, joint à des observations antérieures, établit avec certitude la présence de la monoiodotyrosine parmi les constituants naturels de la thyroglobuline.

### SUMMARY

1. A procedure for the quantitative paper chromatography of radioactive substances has been worked out and applied to the investigation of the ionized constituents of marked thyroglobulin. It is based on the identification (with the help of a comparison chromatogram) of marked halogen compounds localized in the spots of the chromatogram of the unknown solution and on the measurement of their radioactivity. The graphical expression of the results is a curve (radiochromatogram) in which the presence of each radioactive constituent is shown by a maximum, corresponding to an area which is proportional to the amount of <sup>131</sup>I.

2. Monoiodotyrosine is liberated by tryptic hydrolysis of radioactive thyroglobulin, along with diiodotyrosine and marked thyroxine. This occurs without the simultaneous appearance of iodides, as is the case during hydrolysis of the protein with soda or baryta. This fact and previous observations establish with certainty the presence of monoiodotyrosine among the natural constituents of thyroglobulin.

### ZUSAMMENFASSUNG

1. Eine Arbeitstechnik für die quantitative Papierchromatographie von radioaktiven Stoffen wurde ausgearbeitet und auf die Untersuchung der jodhaltigen Bestandteile des markierten Thyroglobulins angewendet. Sie gründet sich auf die Identifizierung (mit Hilfe eines Vergleichschromatogramms) der markierten Halogenverbindungen, welche auf den Flecken des Chromatogramms der unbekannten Lösung lokalisiert sind und auf die Messung der Radioaktivität dieser Verbindungen. Der graphische Ausdruck der Ergebnisse ist eine Kurve (Radiochromatogramm) auf der sich das Vorhandensein jedes radioaktiven Bestandteils durch ein Maximum zu erkennen gibt; dieses Maximum entspricht einer Oberfläche, die der <sup>131</sup>I-Menge proportional ist.

2. Bei der Hydrolyse vom radioaktiven Thyroglobulin mit Hilfe von Trypsin wird Monojodtyrosin zusammen mit markiertem Dijodtyrosin und Thyroxin frei und zwar ohne dass gleichzeitig Jodide auftreten, so wie bei der Hydrolyse des Proteins mit Natronlauge oder Baryt. Diese Tatsache stellt, zusammen mit früheren Beobachtungen, mit Sicherheit fest, dass Monojodtyrosin zu den natürlichen Bestandteilen des Thyroglobulins gehört.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> R. FINK, C. E. DENT ET K. FINK, *Nature*, 160 (1947) 801;  
R. M. FINK ET K. FINK, *Science*, 108 (1948) 358.
- <sup>2</sup> A. TAUROG, W. TONG ET J. L. CHAIKOFF, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 83.
- <sup>3</sup> J. GROSS, C. T. LEBLOND, A. E. FRANKLIN ET J. H. QUASTEL, *Science*, 111 (1950) 605.
- <sup>4</sup> A. S. KESTON, S. UDENFRIEND ET M. LEVY, *J. Am. Chem. Soc.*, 69 (1947) 3151 et 72 (1950) 748.
- <sup>5</sup> F. J. R. HIRD ET W. M. TRIKOJUS, *Austral. J. Sc.*, 10 (1948) 185.
- <sup>6</sup> A. TAUROG, W. TAUROG ET J. L. CHAIKOFF, *Nature*, 164 (1949) 181.
- <sup>7</sup> J. C. LAIDLAW, *Nature*, 164 (1949) 927.
- <sup>8</sup> J. ROCHE, R. MICHEL, O. MICHEL, G. H. DELTOUR ET S. LISSITZKY, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1951) 572.
- <sup>9</sup> J. LELAND ET G. L. FOSTER, *J. Biol. Chem.*, 95 (1932) 165.
- <sup>10</sup> N. F. BLAU, *J. Biol. Chem.*, 102 (1933) 269 et 110 (1935) 351.
- <sup>11</sup> S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.*, 42 (1948) 238.
- <sup>12</sup> C. FROMAGEOT, M. JUTISZ, M. LAFON ET J. ROCHE, *Compt. rend. soc. biol.*, 142 (1948) 785.

Reçu le 27 novembre 1950