

ÉTUDE RADIOCHROMATOGRAPHIQUE DES ÉTAPES DE L'IODURATION DE LA TYROSINE ET DE L'HISTIDINE

par

JEAN ROCHE, SERGE LISSITZKY, ODETTE MICHEL ET
RAYMOND MICHEL

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

La cinétique de l'ioduration de la tyrosine^{1,2,3} et de l'histidine⁴ a conduit LI à admettre que, lors de la réaction: $RH_2 + 2I_2 = RI_2 + 2HI$, la formation du dérivé dihalogéné est précédée de celle de la combinaison monosubstituée de l'acide aminé. L'évolution de cette étape initiale du processus déterminerait la vitesse de la dihalogénéation, car "le second atome d'iode réagit instantanément dès que le premier s'est fixé au cycle" (*loc. cit.*¹ p. 1151). S'il en est ainsi, la monoiodotyrosine et la monoiodohistidine devraient disparaître aussitôt formées en présence d'un excès d'halogène. Il nous a paru que les travaux de LI, basés uniquement sur le dosage de l'iode présent dans les milieux réactionnels et non sur celui des dérivés de substitution des acides aminés, méritaient d'être repris. En effet, des protéines artificiellement iodées à des degrés divers^{5,6,7} et des gorgonines⁸ renferment de la monoiodotyrosine et de la diiodotyrosine en abondance et les mêmes corps sont simultanément présents, en quantité beaucoup moindre, dans les thyroglobulines^{9,10,11}. D'autre part, la monoiodohistidine et la diiodohistidine ont été préparées par halogénéation directe¹² et il est probable que des iodoglobines renferment l'une et l'autre¹³. La formation de dérivés monosubstitués ne paraît donc pas être une étape nécessairement transitoire de celle des corps disubstitués.

Nous avons étudié l'ioduration de la tyrosine et de l'histidine par l'iode marqué réagissant avec ces acides aminés dans des proportions stoechiométriques diverses. La séparation et le dosage des combinaisons mono- et dihalogénées par radiochromatographie¹⁰ ont permis d'acquérir dans ce domaine les résultats à l'exposé desquels est consacré ce mémoire.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Nous avons fait réagir de 0.4 à 15 atomes d'iode marqué (¹²⁷I et traces d'¹³¹I) sur 1 molécule de tyrosine ou d'histidine dans une série d'essais, le processus de monosubstitution ($RH_2 + I_2 = RHI + HI$) exigeant théoriquement deux atomes I et celui de disubstitution ($RH_2 + 2I_2 = RI_2 + 2HI$) quatre. Les produits obtenus ont été fractionnés par chromatographie sur papier et identifiés par comparaison de leur R_F

avec celui de dérivés halogénés purs. La mesure de la radioactivité répartie entre les taches des divers produits marqués a permis de calculer la proportion de ceux-ci dans les échantillons analysés. Connaissant la quantité d'halogène total mis en œuvre par molécule d'acide aminé, on a calculé le nombre d'atomes d'iode fixés dans les dérivés mono- et disubstitués.

Mode opératoire

Des solutions 0.01 *M* de L-tyrosine (1.81 mg par ml) et de chlorhydrate de L-histidine (1.91 mg par ml) dans l'ammoniaque concentrée ont été traitées par des solutions éthérées d'iode ($^{127}\text{I} + ^{131}\text{I}$)^{*} préparées de la manière suivante (14): 75 mg INa pur dissous dans 4 ml H_2O ont été additionnés d'1 ml d'une solution renfermant des traces d'INa marqué (sans entraîner, radioactivité d'environ $2 \cdot 10^7$ impulsions/min), de 25 ml d'éther, de 0.4 ml HCl et d'1.3 ml de perhydrol (Merck) au cinquantième. Après deux heures de contact au cours desquelles le mélange a été fréquemment agité, la phase aqueuse a été éliminée par décantation; la totalité de l'iode libéré était alors en solution dans l'éther.

On a placé dans une série de tubes 1 ml de solution 0.01 *M* de tyrosine ou d'histidine, puis un volume de la solution éthérée d'iode correspondant à des rapports divers du nombre d'atomes I par molécule d'acide aminé (0.43, 0.86, 1.29, 1.73, 2.16, 2.59, 3.02, 3.45, 4.32, 6.05 et 8.65 atomes I/molécule de tyrosine et 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00, 3.50, 4.00, 5.00, 7.00, 10.00, 12.00 et 15.00 atomes I/molécule d'histidine) et l'on a complété à 7.5 ml le volume de la phase éthérée. Les tubes ont été bouchés (émeri) et agités énergiquement pendant 30 minutes à 20°.

Une microgoutte calibrée (8 μl), séparée au moyen d'une pipette effilée de la phase aqueuse de chaque essai (radioactivité voisine de 5000 impulsions/min pour 1 atome I/mol acide aminé), a été déposée sur une feuille de papier filtre Whatmann No. 1 en vue de la séparation chromatographique de ses constituants. Des produits purs, synthétisés au laboratoire, à savoir la 3-monoiodo-L-tyrosine¹⁵, la 3,5-diiodo-L-tyrosine¹⁶, les 2-monoiodo-L-histidine et 2,5-diiodo-L-histidine¹², et de l'iodure de sodium ont servi de corps de référence dans des essais témoins. Les chromatogrammes ont été développés dans un mélange de *n*-butanol (78 p.), d'acide acétique (5 p.) et d'eau (17 p.) pendant 24 heures et les taches d'acides aminés ont été révélées avec une solution à 0.2% de ninhydrine dans le *n*-butanol saturé d'eau. Les valeurs de R_F sont: 0.38 pour la monoiodotyrosine, 0.53 pour la diiodotyrosine¹⁰, 0.10 pour la monoiodohistidine et 0.37 pour la diiodohistidine. Les iodures ont été révélés par réaction à l'amidon¹⁰. On a ainsi obtenu, sur une même feuille de papier filtre, les séries de chromatogrammes correspondant à des stades successifs de l'ioduration de chaque acide aminé dont les Fig. 1 et 2 reproduisent la photographie.

Les bandes de papier sur lesquelles la séparation des constituants de chaque goutte a été réalisée ont été découpées en sections de 0.5 cm de haut au niveau des taches, de 1 cm en dehors de celles-ci, montées sur un moule s'adaptant au compteur circulaire de GEIGER-MÜLLER et leur radioactivité mesurée à l'aide de celui-ci. L'identification des taches une fois réalisée grâce au chromatogramme témoin, la radioactivité totale de chaque microgoutte étudiée et celle de ses constituants a été déterminée. Comme la répartition d' ^{127}I et celle d' ^{131}I sont identiques, on peut alors, connaissant le nombre d'atomes d'iode ayant réagi avec une molécule d'acide aminé, calculer le nombre d'atomes d'halogène fixé dans les dérivés mono- et disubstitués présents dans chaque série d'essais.

Résultats

Nous nous bornerons à présenter la reproduction de deux séries de chromatogrammes (Fig. 1 et 2) et les graphiques établis à partir de l'étude de leur radioactivité (Fig. 3 et 4). Il ne nous a pas paru utile d'y joindre la série des radiochromatogrammes correspondants, ni les valeurs numériques à partir desquelles ceux-ci ont été établis, ni les résultats du dosage des iodures formés.

La caractérisation des dérivés mono- et diiodé a été réalisée de manière satisfaisante. En dehors du dosage de ces corps, signalons que l'élution de leurs taches nous a permis de préparer à l'état pur de petites quantités de ces combinaisons marquées par ^{131}I suffisantes pour divers essais biologiques. Ce fait présente un intérêt particulier pour la L-monoiodotyrosine qui n'a pu être obtenue jusqu'ici que par voie indirecte¹⁵. Signalons

^{*} ^{131}I a été fourni par le Laboratoire d'Harwell (Angleterre) grâce à l'obligeance du C.N.R.S. et du Haut Commissariat à l'Energie atomique (Paris). Nous remercions ces organismes d'avoir ainsi permis notre travail.

que, dans le cas de l'histidine on trouve, à partir de l'action de 3 atomes I par molécule d'acide aminé, une tache non radioactive discrète (révélée par la ninhydrine) de R_F intermédiaire à ceux de la mono- et diiodohistidine. Il est probable qu'elle correspond à un produit de dégradation de l'acide aminé. On trouvera dans les Fig. 3 et 4 les résultats obtenus à partir de la radioactivité des chromatogrammes.

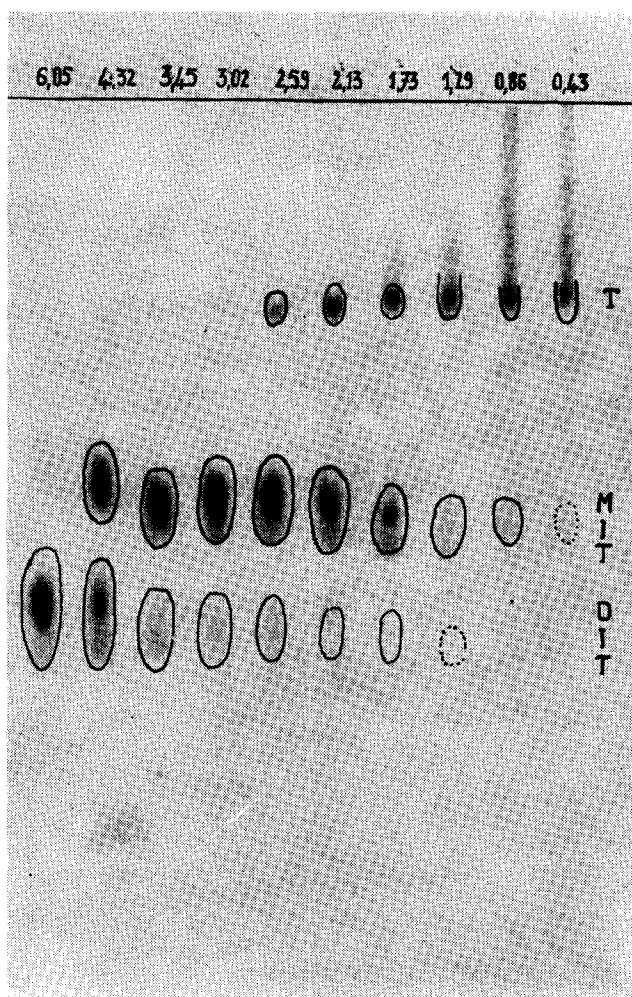


Fig. 1. Chromatogrammes de solution de L-tyrosine traitée par des quantités diverses d'iode (de 0.43 à 8.65 atomes I par molécule de tyrosine). Les lettres T, MIT et DIT désignent les taches de tyrosine, de monoiodotyrosine et de diiodotyrosine révélées par la ninhydrine. Les chiffres reportés sur la partie supérieure de la figure correspondent au nombre d'atomes I ayant réagi avec 1 molécule de l'acide aminé, soit 0.43, 0.86, 1.29, 1.73, 2.13, 2.59, 3.02, 3.45, 4.32, 6.05 et 6.85.

La Fig. 3 montre d'une façon quantitative ce qui ressort qualitativement de l'examen des chromatogrammes, et la Fig. 4 un autre aspect de la réaction. Son examen montre que la formation d'iodures est, à partir de la mise en œuvre de 3 atomes I, plus im-

portante dans le cas de l'histidine que dans celui de la tyrosine, et cela bien que l'halogénéation de cette dernière soit plus importante. C'est là un fait lié à l'oxydation de l'histidine par l'iode.

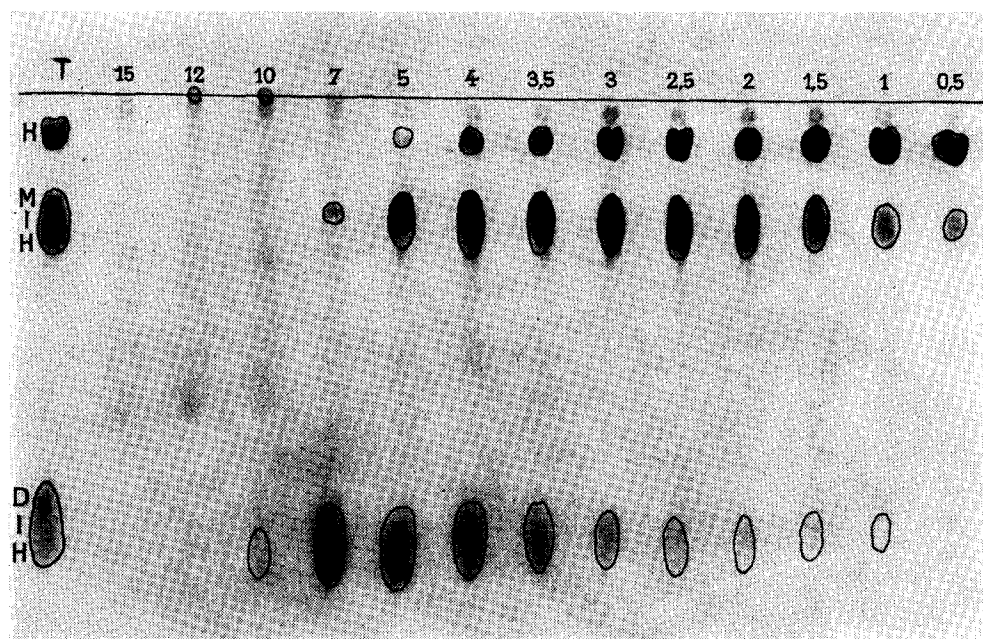


Fig. 2. Chromatogrammes de solution de L-histidine (chlorhydrate) traitée par des quantités diverses d'iode (de 0.50 à 15.0 atomes I par molécule d'histidine). La lettre T indique le chromatogramme témoin sur lequel on repère les taches de l'histidine (H), de la monoiodohistidine (MIH) et de la diiodohistidine (DIH) révélées par la ninhydrine. Les chiffres reportés sur la partie supérieure de la figure correspondent au nombre d'atomes I ayant réagi avec 1 molécule de l'acide aminé soit 0.5, 1.5, 2.0, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 7.0, 10.0, 12.0 et 15.0

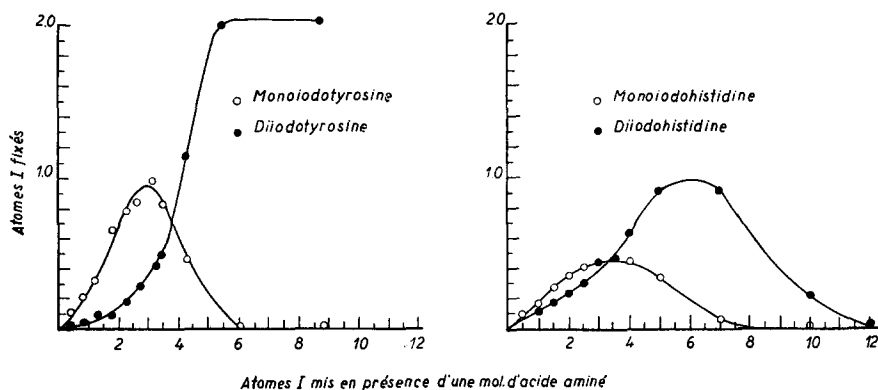


Fig. 3. Quantités d'iode fixées à l'état de dérivés mono- et diiodés de la tyrosine et de l'histidine en fonction du nombre d'atomes I mis en présence d'1 molécule d'acide aminé. Abscisses: Nombre d'atomes I mis en présence d'1 molécule de tyrosine ou d'histidine. Ordonnées: Nombre d'atomes I fixés dans les dérivés mono- et disubstitué formés à partir d'1 molécule d'acide aminé.

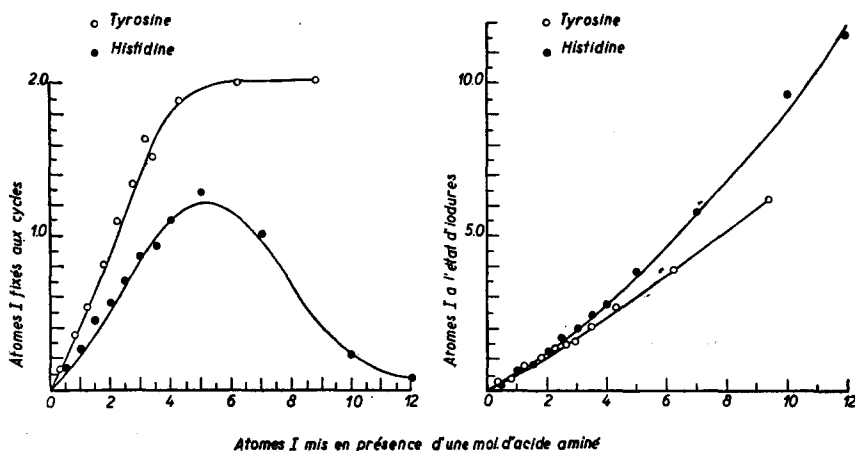


Fig. 4. Quantités d'iode fixées aux cycles (I total des dérivés mono- et disubstitués) de la tyrosine et de l'histidine en fonction du nombre d'atomes I mis en présence d'1 molécule d'acide aminé. Abscisses: Nombre d'atomes I mis en présence d'1 molécule de tyrosine ou d'histidine. Ordonnées: 1. à gauche, Nombre d'atomes I fixés au cycle de la tyrosine ou de l'histidine; 2. à droite, Nombre d'atomes I présents à l'état d'iodures.

DISCUSSION

L'ioduration de la tyrosine conduit à la formation des dérivés mono- et diiodé de celle-ci, en proportions diverses selon la quantité d'halogène employée. La diiodotyrosine est seule présente lorsque 6 atomes I et plus ont été mis en présence d'1 molécule de l'acide aminé. Les carbones 3 et 5 du cycle benzénique sont alors substitués, tandis que le carbone 3 l'est seul auparavant dans une fraction importante de la tyrosine; aussi l'étude de la fixation globale de l'iode (Fig. 4) et, a fortiori, celle de sa disparition^{1, 2, 3, 4} ne peuvent-elles pas conduire à des résultats précis. Dans le cas de l'histidine, le dérivé 2-monoiodé prédomine jusqu'à ce que 4 atomes I soient présents; le dérivé 2,5-diiodé se forme en proportions de plus en plus fortes par la suite et existe pratiquement seul lorsque 7 atomes I sont mis en présence d'1 molécule d'histidine. Mais des différences importantes se manifestent dans le comportement des deux acides aminés. D'une part, comme il est depuis longtemps établi^{4, 13, 17}, la réactivité du cycle benzénique de l'un vis à vis de l'iode est beaucoup plus grande que celle du cycle imidazolique de l'autre. Il en résulte que, dans les conditions où les carbones 3 et 5 de la totalité de la tyrosine sont substitués, la moitié seulement de l'histidine l'est sur ses carbones 2 et 5. D'autre part, le cycle benzénique de la première est stable dans un milieu renfermant un excès d'iode, tandis que le cycle imidazolique de la seconde est alors progressivement détruit (diminution progressive, puis disparition de la tache de la diiodohistidine et apparition d'une tache discrète dont le R_F est intermédiaire de celle de la mono- et de la diiodohistidine sur les chromatogrammes; formation d'iodures en excès). Ce fait est à rapprocher de la dégradation de l'histidine dans diverses conditions où la tyrosine est stable, entre autres par chauffage en milieu alcalin. Il est probable que l'histidine est partiellement détruite même en présence de 3 à 4 atomes d'iode par molécule, car on retrouve alors à l'état d'iodures une fraction de l'halogène plus importante que celle pouvant provenir de réactions nucléaires de substitution.

Les réactions de l'iode avec la tyrosine et l'histidine offrent donc des particularités propres à chacune, mais, dans les conditions où nous nous sommes placés, la formation des dérivés monosubstitués ne présente pas le caractère nécessairement transitoire qui lui a été attribué dans d'autres^{1,2,3,4}. Les résultats obtenus avec la tyrosine sont pratiquement identiques que l'acide aminé soit libre ou compris dans des chaînes peptidiques au sein de molécules protéiques. La même comparaison ne peut pas être faite en ce qui concerne l'histidine, dont l'ioduration dans les protéines n'a pas encore pu être étudiée avec précision. Néanmoins, dans nos expériences, la formation des dérivés monoiodés constitue une étape indépendante de l'ioduration des deux acides aminés au même titre que celle des dérivés disubstitués, comme tel semble être également le cas, au moins pour la tyrosine, dans l'halogénéation biologique des thyroglobulines et des gorgonines.

Il n'y a donc pas lieu de considérer les conclusions de LI comme générales. Il est souhaitable qu'elles soient contrôlées par une étude analogue à la nôtre poursuivie dans les conditions adoptées par cet auteur, la mobilité de l'hydrogène des cycles benzénique et imidazolique paraissant être alors sensiblement plus grande⁷.

RÉSUMÉ

1. L'halogénéation de la tyrosine et de l'histidine par l'iode marqué a été étudiée au moyen de la radiochromatographie des produits formés lors de l'action de 0.4 à 15.0 atomes I sur une molécule de l'acide aminé. La formation de la monoiodotyrosine et de la monoiodohistidine constitue une étape indépendante de la réaction, au même titre que celle des dérivés dihalogénés. Les conclusions de LI, selon lesquelles la vitesse du premier processus régirait celle du second ne paraissent pas devoir être retenues.

2. En dehors de la moindre réactivité de l'histidine vis à vis de l'iode, déjà signalée, il a été établi qu'un excès de réactif détruit le cycle imidazolique de cet acide aminé dans les conditions où la diiodotyrosine est stable.

3. La séparation chromatographique des mono- et diiodotyrosine et histidine marquées par ¹³¹I, obtenues par l'ioduration directe des acides aminés, permet de préparer de petites quantités de ces corps.

SUMMARY

1. The halogenation of tyrosine and histidine with marked iodine has been studied by radiochromatography of the products formed through the action of 0.4 to 15.0 atoms iodine on one molecule of the amino-acid. The formation of monoiodotyrosine and of monoiodohistidine are independent stages of the reaction, just like that of the dihalogen derivatives. LI's conclusion, according to which the rate of the first process determines that of the second, does not appear to be tenable.

2. Besides the lesser reactivity of histidine towards iodine, already mentioned, it has been established that an excess of reagent breaks the imidazole ring of this amino-acid under conditions where diiodotyrosine is stable.

3. The chromatographic separation of ¹³¹I-marked mono- and diiodotyrosine and -histidine, obtained by direct reaction on the amino-acids, makes possible the preparation of small quantities of these substances.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Halogenierung des Tyrosins und des Histidins durch markiertes Jod wurde mit Hilfe der Radiochromatographie der Produkte untersucht, welche bei der Einwirkung von 0.4 bis 15.0 Atomen J auf ein Molekül der Aminosäure entstehen. Die Bildung des Monojodhistidins stellen eine unabhängige Stufe der Reaktion dar, ebenso wie diejenige der Dihalogenderivate. Die Schlüsse von LI, denzufolge die Geschwindigkeit des ersten Prozesses die des zweiten beherrschen sollte, scheinen nicht gültig zu sein.

2. Ausser der bereits erwähnten geringeren Reaktionsfähigkeit des Histidins gegen Jod wurde festgestellt, dass ein Überschuss an Reagens den Imidazolring dieser Aminosäure zerstört und zwar unter Bedingungen, bei denen Dijodtyrosin beständig ist.

Bibliographie p. 445.

3. Die chromatographische Trennung von mit ^{131}J markierten Mono- und Dijodtyrosin und Histidin, welche durch direkte Jodierung der Aminosäuren hergestellt waren, ermöglicht die Herstellung kleiner Mengen dieser Stoffe.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. H. LI, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 1147.
- ² C. H. LI, *J. Am. Chem. Soc.*, 66 (1944) 228 et 230.
- ³ C. H. LI, *J. Am. Chem. Soc.*, 67 (1945) 1065.
- ⁴ C. H. LI, *J. Am. Chem. Soc.*, 66 (1944) 225.
- ⁵ W. LUDWIG ET P. VON MUTZENBECHER, *Z. physiol. Chem.*, 258 (1939) 195.
- ⁶ R. M. HERRIOTT, *J. Gener. Physiol.*, 25 (1941) 185.
- ⁷ J. ROCHE, R. MICHEL ET M. LAFON, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947).
- ⁸ J. ROCHE ET M. LAFON, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 147.
- ⁹ K. FINK ET R. M. FINK, *Science*, 108 (1948) 358.
- ¹⁰ A. TAUROG, W. TONG ET I. L. CHAIKOFF, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 83.
- ¹¹ J. ROCHE, M. JUTISZ, S. LISSITZKY ET R. MICHEL, *Compt. rend.*, 231 (1950) 723.
- ¹² K. J. BRUNING, *J. Am. Chem. Soc.*, 69 (1947) 205.
- ¹³ H. BAUER ET E. STRAUSS, *Biochem. Z.*, 284 (1936) 197 et 237.
- ¹⁴ J. C. CLAYTON, A. A. FREE, J. E. PAGER, C. F. SOMERS ET E. A. WOOLLETT, *Biochem. J.*, 44 (1950) 598.
- ¹⁵ C. R. HARRINGTON ET R. PITT-RIVERS, *Biochem. J.*, 38 (1944) 320.
- ¹⁶ C. R. HARRINGTON, *Biochem. J.*, 22 (1928) 1429.
- ¹⁷ H. PAULY, *Ber.*, 43 (1910) 2243.
- ¹⁸ H. PAULY ET K. GUNDERMANN, *Ber.*, 41 (1909) 3999.

Reçu le 26 janvier 1951