

## SUR LA FORMATION DE LA THYROXINE ET DE SES PRÉCURSEURS DANS LES IODOPROTÉINES. III

par

JEAN ROCHE, RAYMOND MICHEL, SERGE LISSITZKY ET  
SABINE MAYER

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

Le mécanisme de formation de la thyroxine aux dépens de la diiodotyrosine par ioduration des protéines dans le corps thyroïde et *in vitro*, demeure mal défini<sup>1,2,3</sup>; aussi a-t-on cherché à l'étudier à partir de substrats plus simples. Des traces de thyroxine prennent naissance dans des solutions faiblement alcalines de diiodotyrosine conservées à 37° pendant plusieurs semaines<sup>4</sup>. Le rendement de ce processus, dans lequel la libération de traces d'iode paraît jouer un rôle important, augmente sous l'influence de catalyseurs d'oxydation<sup>5,6</sup> et peut atteindre 4 % en présence d'eau oxygénée dans des conditions particulières (chauffage à 100°, extraction continue du milieu par le butanol)<sup>5</sup>. Il est plus élevé encore pour la formation de dérivés de la thyroxine à partir de certains peptides de la diiodotyrosine<sup>3,7</sup> et atteint 27 % dans le cas de l'acide N-acétyldiiodotyrosylglutamique (condensation en acide N-acétylthyroxylglutamique)<sup>3</sup>. Le rendement de la transformation de la diiodotyrosine en thyroxine est très variable dans les protéines<sup>8,9,10,11</sup>. Deux éléments principaux de la structure de celles-ci paraissent intervenir: la position des restes de tyrosine dans les chaînes peptidiques et la nature des combinaisons dans lesquelles ils sont engagés (participation de -COOH, de -NH<sub>2</sub> ou des deux à des liaisons -CONH-). Nous nous sommes proposés de fixer dans des protéines des restes de diiodotyrosine dont -COOH et -NH<sub>2</sub> seraient bloqués et d'étudier leur comportement dans des conditions où l'incubation de l'acide aminé et de ses peptides simples conduit à la formation de thyroxine. Ce travail nous a paru mériter d'être entrepris dans deux buts. D'une part, il y avait lieu de définir l'influence de la combinaison des restes de diiodotyrosine à une protéine sur leur aptitude à se condenser. D'autre part, la thyroxine ne prenant naissance à partir des protéines qu'en présence d'un certain excès d'halogène, il était possible que cette formation de thyroxine comporte alors le passage par des étapes intermédiaires évoluant dans des milieux de potentiel oxydant élevé. Il convenait de rechercher si une telle réaction a lieu par incubation de protéines substituées par des restes de diiodotyrosine; elle constituerait alors un "modèle" simple de la biogénèse de la thyroxine au sein de la thyroglobuline.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

De la N-acétyldiiodotyrosylgélatine a été préparée selon la technique de GELL, HARINGTON ET PITT-RIVERS<sup>12</sup>, par action de la 2-méthyl-4 (3',5'-diiodo-4-acétoxybenzyl) oxazolone ou du N-acétyl-3,5-diiodotyrosineazide sur un échantillon de gélatine renfermant environ 0.1 % de tyrosine. Le premier et le second réactifs permettent d'obtenir des produits dont les teneurs respectives moyennes en iode sont 6.7 % et 5.1 %, soit 11.4 et 8.7 % de diiodotyrosine. Dans le premier cas, la valeur obtenue correspond au blocage de la totalité des groupements  $\varepsilon$ -aminés de la lysine.

La N-acétyldiiodotyrosylgélatine (en abréviation N-AcDITG) a été incubée à 70° et à pH = 7.5, sous agitation continue et en présence d'oxyde de manganèse colloïdal (5) dans les conditions suivantes: 1.5 g de N-AcDITG sont dissous dans 19.7 ml d'eau distillée et 10 ml de solution tampon de pH = 7.5 ( $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}_{12}\text{O}_6$  M/15 portés à pH = 7.5 par addition d'HCl) et additionnés de 0.3 ml d'une suspension de catalyseur au manganèse. Après contrôle du pH, le mélange est placé dans un ballon immergé dans un thermostat à 70° ( $\pm 0.5^\circ$ ) muni d'un agitateur avec joint au mercure (1,800 tours/minute). On opère trois prélèvements de 10 ml à 24, 48 et 72 heures. Chaque prise d'essai est centrifugée, décantée, acidifiée à pH = 4.0 par l'acide acétique et la protéine est précipitée par l'acétone. Le produit obtenu, purifié par reprecipitations successives, est desséché dans le vide ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) et l'iode total est dosé (LEIPERT). Les teneurs en iode avant et après incubation sont les suivantes:

Préparations*	I% avant incubation	I% après incubation
I	7.0	3.8
II	6.4	3.6
III	7.0	3.2
IV	5.4	2.0
V	4.8	2.3

\* Les préparations I, II et III ont été obtenues par action du N-acétyldiiodotyrosineazide, IV et V à partir de l'oxazolone.

*Caractérisation de la thyroxine*

Nous avons mis en œuvre dans ce but la séparation chromatographique de la thyroxine sur papier et l'activité thyroïdienne des protéines étudiées sur la métamorphose des têtards de *Rana esculenta*.

La chromatographie a été réalisée sur le produit du fractionnement au *n*-butanol de l'hydrolyse barytique des protéines (technique de BLAU<sup>13</sup>), en utilisant l'extrait butanolique des hydrolysats portés à pH = 1.0, lavé par NaOH 4 N renfermant 5%  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ . Le résidu d'évaporation de cet extrait repris par le *n*-butanol neutre ou par l'ammoniaque concentrée a été soumis à la chromatographie sur papier Whatmann No. 1, en prenant comme solvant un mélange de *n*-butanol acétique (butanol: 78 p., acide acétique 5 p. et eau 17 p.) ou du *n*-butanol saturé d'ammoniaque 2 N. Les taches ont été révélées à la ninhydrine (solution à 0.2% dans le *n*-butanol saturé d'eau) ou à l'acide sulfanilique diazoté (réaction de PAULY).

La thyroxine a été mise en évidence dans les hydrolysats des produits incubés, alors qu'elle n'existe pas dans ceux de la N-Ac DITG initiale. Elle est entièrement comprise dans la molécule des premières car l'extrait butanolique de ces protéines non hydrolysées n'en renferme pas. En présence de butanol acétique, les valeurs de  $R_F$  observées sont, 0.90 pour la thyroxine pure et 0.87 pour la tache correspondante de l'hydrolysate en chromatographie descendante, 0.87 pour l'une et l'autre en chromatographie ascendante. En présence de butanol ammoniacal (chromatographie descendante) le  $R_F$  est égal à 0.71 pour le témoin, à 0.70 pour l'hydrolysate et à 0.82 pour la diiodothyronine. La tache de même  $R_F$  que la thyroxine témoin donne la réaction de PAULY. Le taux de l'acide aminé dans la protéine incubée 72 heures déterminé par mesure de la surface de sa tache est d'environ 1.0% après 72 heures d'incubation. Au minimum 12% de la diiodotyrosine sont donc transformés en thyroxine; il n'a pas été possible de doser celle-ci pour diverses raisons techniques.

L'activité des mêmes protéines sur la métamorphose des têtards de *Rana esculenta* a été étudiée<sup>16</sup>. La diminution de longueur allant de pair avec la métamorphose a été mesurée trois jours après l'injection dans le grand sac lymphatique<sup>14</sup> de solutions de protéine incubée ou non et de thyroxine. Les résultats, exprimés en mm de raccourcissement moyen d'un têtard, déterminés sur un lot d'au moins 10 animaux sont les suivants :

Thyroxine (1 $\gamma$ )	N-AcDITG non incubée (100 $\gamma$ )	N-AcDITG incubée				
		24 h (100 $\gamma$ )	48 h (100 $\gamma$ )	72 h		
				(100 $\gamma$ )	(40 $\gamma$ )	(20 $\gamma$ )
4.12	0	3.1	3.4	7.2	2.4	0.7

Le graphique reproduit sur la Fig. 1 traduit la proportionnalité des doses de protéine injectées et de la réponse des têtards.

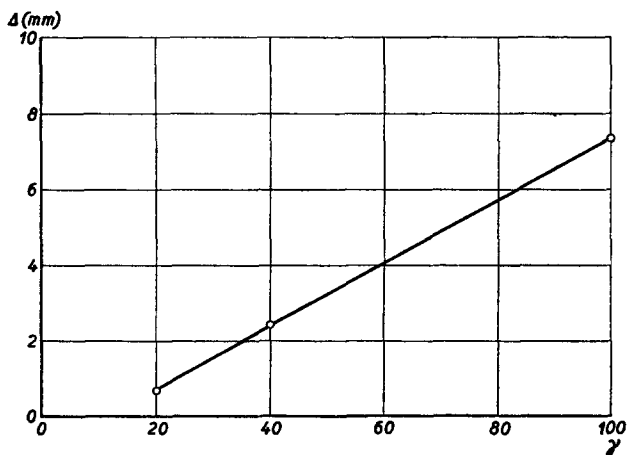


Fig. 1. Activité de la N-acétyldiiodotyrosylgélatine incubée 72 h à 70° et à pH = 7.5 sur la métamorphose de têtard de *Rana esculenta* (injection dans le grand sac lymphatique)  
Abscisse:  $\gamma$  de produit injecté  
Ordonnée:  $\Delta$  = diminution de longueur moyenne (mm) des têtards

L'activité apparaît donc pendant l'incubation de la protéine et elle est proportionnelle à la durée de cette opération. Rapportée à celle de la thyroxine pure, elle correspondrait à une teneur de 2 % en celle-ci du produit chauffé 72 heures, valeur double de celle déterminée par chromatographie. Pareil fait a déjà été observé avec les iodo-protéines et il justifie l'opinion que les dosages biologiques de la thyroxine à l'aide du têtard comme animal réactif ne peuvent conduire qu'à des valeurs relatives. Il en est probablement ainsi en raison de la diffusion de la thyroxine libre injectée aux animaux.

#### DISCUSSION

L'incubation de gélatine N-acétyldiiodotyrosylée à 70° et à pH = 7.5 conduit sans conteste à la formation de thyroxine. Celle-ci demeure combinée à la protéine, car elle ne peut pas être extraite des préparations par le butanol. Elle prend naissance en quantité progressivement croissante en fonction du temps de chauffage et l'iode libéré

aux dépens des restes de diiodotyrosine (50 % environ en 72 heures) paraît jouer dans ce processus un rôle important, comme lors de la formation du même corps par incubation de solutions de diiodotyrosine pure<sup>5</sup>. Le rendement en thyroxine est notablement plus élevé que dans ce dernier cas, mais du même ordre de grandeur qu'avec certains peptides de la tyrosine et l'on peut se demander dans quelle mesure la position "en bout de chaîne" d'un reste de diiodotyrosine ne favorise pas la condensation.

Ces résultats méritent d'être reliés à des faits antérieurement acquis. Il a été signalé à plusieurs reprises<sup>8,9,14</sup> que l'incubation de protéines artificiellement iodées renforce leurs propriétés thyroïdiennes. En fait, dans certaines conditions, l'augmentation de leur activité doit être attribuée à une meilleure assimilation de la thyroxine qu'elles renferment<sup>15,16</sup>; l'utilisation de celle-ci est alors sans doute facilitée par la dégradation de la protéine en milieu oxydant. Néanmoins nos expériences montrent que des restes de diiodotyrosine aptes à se condenser sont susceptibles de le faire lors d'une incubation à 70° des protéines qui les renferment. La réaction donnant naissance à la thyroxine au cours de l'ioduration directe des protéines n'évolue qu'après la fixation de l'halogène au cycle de la tyrosine et sa vitesse n'est pas nécessairement liée à celle du processus qui la précède. Ce fait est susceptible d'expliquer en partie l'action de l'incubation d'iodoprotéines obtenues dans des milieux de potentiel oxydant faible<sup>8</sup> sur leur activité biologique et l'irrégularité d'action des préparations industrielles de ces corps. La difficulté de la mise au point de la fabrication de quantités importantes d'iodoprotéines a suggéré l'hypothèse<sup>17</sup> que, pour des raisons diverses (insolubilisation de caséine brute, agitation moins énergique d'un milieu plus concentré en protéine), les réactions d'ioduration sont alors sensiblement plus lentes que lorsque l'on traite par une même technique au laboratoire une petite quantité de protéine pure en solution. La formation de thyroxine par incubation des produits après addition d'iode au cours d'un temps opératoire initial<sup>14</sup>, négligeable dans le second cas<sup>11</sup>, peut-être notable dans le premier.

De toute manière la preuve du rôle de la diiodotyrosine en tant que précurseur de la thyroxine dans les protéines iodées apportée par nos résultats est plus directe que celles fournies jusqu'ici soit par l'ioduration des protéines, dont les étapes ne peuvent pas être dissociées, soit par l'incubation d'acides aminés ou de peptides iodés. L'analogie du processus étudié dans ce travail et de la biogénèse de la thyroxine au sein de la thyroglobuline apparaît comme assez étroite pour que son mécanisme mérite de susciter des recherches.

### RÉSUMÉ

De la N-acétyldiiodotyrosylgélatine en solution à  $pH = 7.5$  et incubée à 70° s'enrichit progressivement en thyroxine, qu'il a été possible de caractériser par chromatographie sur papier et par étude de son activité sur la métamorphose des têtards de *Rana esculenta*.

Cette observation apporte la preuve directe du fait que la diiodotyrosine est le précurseur de la thyroxine au sein des protéines iodées. Son intérêt pour la préparation de celles-ci est discutée.

### SUMMARY

When a solution of N-acetyl-diiodotyrosine ( $pH = 7.5$ ) on gelatin is incubated at 70°, the amount of thyroxine formed gradually increases; this has been demonstrated by paper-chromatography and by study of its action on the metamorphosis of the tadpoles of *Rana esculenta*.

This observation affords a direct proof for the fact that diiodotyrosine is the precursor of thyroxine in iodinated proteins. The significance of this observation in the preparation of these proteins is discussed.

*Bibliographie p. 450.*

## ZUSAMMENFASSUNG

Wird eine Lösung von N-Acetyldijodtyrosin ( $pH = 7.5$ ) bei  $70^\circ$  inkubiert, so reichert sich darin allmählich Thyroxin an; dieses konnte mit Hilfe der Papierchromatographie und des Studiums seiner Wirkung auf die Metamorphose der Kaulquappen von *Rana esculenta* nachgewiesen werden.

Diese Beobachtung liefert einen direkten Beweis für die Tatsache, dass Dijodtyrosin der Vorläufer des Thyroxins in den jodierten Proteinen ist. Die Bedeutung der genannten Beobachtung für die Herstellung dieser Proteine wird erörtert.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> T. B. JOHNSON ET L. B. TEWKESBURY, *Proc. Natl Acad. Sci. Washington*, 28 (1947) 73.
- <sup>2</sup> C. R. HARRINGTON, *J. Chem. Soc.*, (1944) 193.
- <sup>3</sup> R. PITT-RIVERS, *Biochem. J.*, 43 (1948) 293.
- <sup>4</sup> P. VON MUTZENBECHER, *Z. physiol. Chem.*, 261 (1939) 253.
- <sup>5</sup> C. R. HARRINGTON ET R. PITT-RIVERS, *Biochem. J.*, 39 (1945) 157.
- <sup>6</sup> E. P. REINEKE ET C. W. TURNER, *J. Biol. Chem.*, 162 (1946) 369.
- <sup>7</sup> J. ROCHE ET R. MICHEL, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 144.
- <sup>8</sup> W. LUDWIG ET P. VON MUTZENBECHER, *Z. physiol. Chem.*, 258 (1939) 195.
- <sup>9</sup> E. P. REINEKE ET C. W. TURNER, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 613 et *Ibid.*, 162 (1946) 369.
- <sup>10</sup> J. ROCHE, R. MICHEL ET M. LAFON, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 453.
- <sup>11</sup> J. ROCHE, R. MICHEL, M. LAFON ET D. P. SADHU, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 648.
- <sup>12</sup> P. G. H. GELL, C. R. HARRINGTON ET R. PITT-RIVERS, *Brit. J. Exptl Pathol.*, 27 (1946) 267.
- <sup>13</sup> N. F. BLAU, *J. Biol. Chem.*, 119 (1935) 351.
- <sup>14</sup> E. P. REINEKE, M. B. WILLIAMSON ET C. W. TURNER, *J. Biol. Chem.*, 143 (1942) 285 et *Ibid.*, 147 (1943) 285.
- <sup>15</sup> J. ROCHE, R. MICHEL, G. H. DELTOUR ET S. MAYER, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 658.
- <sup>16</sup> R. COURRIER, J. ROCHE, G. H. DELTOUR, M. MAROIS, R. MICHEL ET F. MOREL, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 1029.
- <sup>17</sup> R. PITT-RIVERS ET S. S. RANDALL, *J. Endocrinol.*, 4 (1945) 221.

Reçu le 26 janvier 1951