

## CARACTÉRISATION DES IODOHISTIDINES DANS LES PROTÉINES IODÉES (THYROGLOBULINE ET IODOGLOBINE)

par

JEAN ROCHE, SERGE LISSITZKY ET RAYMOND MICHEL\*

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

### INTRODUCTION

La tyrosine et l'histidine libres présentent avec l'iode des réactions de substitution donnant successivement naissance à des dérivés mono et dihalogénés nucléaires, tandis que tous les essais d'ioduration directe des autres acides aminés cycliques ou hétérocycliques (phénylalanine, tryptophane, proline) sont demeurés jusqu'ici sans résultat<sup>1</sup>. Or, la présence de monoiodotyrosine<sup>2</sup> et de diiodotyrosine<sup>3</sup> dans les protéines iodées naturelles (thyroglobulines, gorgonines, spongines) et dans celles artificiellement halogénées<sup>4, 5, 6</sup> est aujourd'hui bien établie, mais celle d'iodohistidines dans les mêmes corps n'a pas été mise en évidence. Elle paraît probable dans les protéines ayant réagi avec un excès d'iode, car elles se combinent alors à plus d'halogène que ne permet de l'expliquer leur teneur en tyrosine, et cela proportionnellement à leur taux d'histidine<sup>5</sup>; elle n'a pas été envisagée dans la thyroglobuline. Nous nous sommes proposés de caractériser la mono- et la diiodohistidine dans une protéine riche en imidazolalanine artificiellement halogénée, la globine, et de rechercher si la thyroglobuline en renferme de petites quantités. Le premier objet de ce travail a été envisagé simultanément par FRAENKEL-CONRAT<sup>7</sup>, dont les résultats sont en accord avec les nôtres, mais présentent un caractère moins objectif en raison des techniques employées par cet auteur.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

Nous avons préparé les iodoprotéines indiquées, à partir desquelles nous avons libéré les acides aminés halogénés afin de les caractériser. Cette dernière opération devait nécessairement être réalisée par voie enzymatique, car l'hydrolyse acide désiode les cycles et l'hydrolyse alcaline rompt en outre certains d'entre eux (imidazole). Il convenait de disposer dans ce but d'iodoglobine non dénaturée, ou du moins soluble au pH optimum des protéases employées, ce qui a exigé l'élaboration d'une technique d'ioduration assez différente de celle utilisée dans les travaux antérieurs<sup>5, 6, 8, 9</sup>, alors que la thyroglobuline marquée a été directement extraite du corps thyroïde d'animaux ayant reçu une forte dose d'iodure de sodium radioactif. Les iodohistidines n'ont pas pu être caractérisées directement dans les hydrolysats protéinasiques, mais seulement après adsorption sur gel de silice<sup>10</sup> et concentration chromatographique sur papier des éluats les renfermant. Par ailleurs, leur identification a été réalisée à la fois au moyen de la

\* Avec l'assistance technique de Mlle SIMONE BEURET (C.N.R.S.).

coloration par des réactions appropriées de taches de  $R_F$  caractéristiques et par des mesures de la radioactivité de celles-ci (établissement d'autogrammes et de radiochromatogrammes<sup>11</sup>). Aussi les techniques utilisées doivent-elles être décrites dans le détail.

### A. Etude de l'iodoglobine

1. *Préparation et hydrolyse enzymatique.* 5 g de globine de cheval non dénaturée<sup>12</sup> sont dissous dans 300 ml de NaOH 0.2 *N* et le milieu, placé dans un flacon à trois tubulures immergé dans un bain de glace, est soumis à une agitation mécanique continue. Après addition de 100 ml d'éther de pétrole (fraction dite essence B, distillant entre 65° et 75°), on introduit goutte à goutte 180 ml d'essence B renfermant 1.75 g d'iode, soit 4 atomes I (+ 10%) par molécule de tyrosine et d'histidine présente. L'opération est conduite en 2 heures 30, sans dépasser 5° C. On la fait suivre d'un temps de repos de 30 minutes, après lequel on ajoute goutte à goutte et en agitant 6 ml HCl concentré et 0.24 g  $\text{IO}_3\text{K}$  dissous dans 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  afin de décomposer les iodures. On centrifuge, on décante l'essence B colorée en violet par l'iode et on lave deux fois avec 200 ml de ce solvant. La phase aqueuse, de pH 6.0 environ, laisse déposer en 12 heures à 2° C une première fraction d'iodoglobine que l'on sépare. Après acidification progressive à pH 4.5–5.0 avec de l'acide acétique, il se forme en 60 heures à + 2° C un abondant précipité que l'on réunit au précédent. Après lavage à l'acétone refroidie à 0° C et séchage sous vide, la protéine dépourvue d'iodures minéraux, se présente comme une poudre blanc-jaunâtre. Sa teneur en iode total de 14.0% est voisine de celle de produits dénaturés, insolubles à pH 8.0–8.5 obtenus par d'autres techniques. 200 mg d'iodoglobine sont dissous dans 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  par addition de quelques gouttes NaOH *N* et le milieu est ramené à pH 8.5. On ajoute 20 mg de protéinases pancréatiques non fractionnées (trypsine brute d'Armour Laboratories, Chicago) et quelques gouttes de toluène et le mélange est mis à l'étuve à 38° C pendant 70 heures, en réajustant le pH à des intervalles de 15 à 20 heures.

2. *Séparation et caractérisation chromatographiques de la monoiiodohistidine (MIH) et de la diiodohistidine (DIH)\*.* Après neutralisation à pH 7.0, on fait passer l'hydrolysât sur une colonne adsorbante de gel de silice, dans les conditions décrites par FROMAGEOT, JUTISZ ET LEDERER<sup>10</sup> pour séparer les acides aminés basiques, retenus sur le gel\*. Après lavage de la colonne à l'eau distillée, on élue par 250 ml HCl 0.1 *N*; on concentre sous vide à siccité sans dépasser 50° C et l'on reprend le résidu par 1 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  2 *N*. La solution obtenue (solution ES) est analysée par séparation chromatographique de ses constituants sur papier (Whatman No. 1), selon la technique usuelle<sup>13</sup>.

Les solvants utilisés pour cette opération sont, soit le mélange de *n*-butanol (78 p.), d'acide acétique (5 p.) et d'eau (17 p.), soit le *n*-butanol saturé d'ammoniaque 2 *N*. Les chromatographies ont été réalisées en une et en deux dimensions et les taches révélées soit par une solution à 0.2% de ninhydrine dans le *n*-butanol saturé d'eau, soit par l'acide sulfanilique diazoté (PAULY). Tous les essais ont été faits en double, pour que les deux réactions colorées puissent être opérées sur deux chromatogrammes d'un même milieu. Les  $R_F$  des iodohistidines sont: de 0.10 à 0.14 pour MIH et de 0.38 à 0.41 pour DIH en butanol acétique et de 0.18 à 0.24 pour MIH et de 0.12 à 0.14 pour DIH en butanol ammoniacal. Elles donnent avec la ninhydrine une coloration brun-violet claire et avec l'acide sulfanilique diazoté une teinte jaune-orangé pour MIH et rose orangé pour DIH. Ces données sont en accord avec celles obtenues indépendamment par FRAENKEL-CONRAT<sup>7</sup>.

Après un essai d'orientation en une dimension, on opère un premier fractionnement par chromatographie sur papier en butanol acétique, en prenant comme indicateur de la position des deux iodohistidines la radioactivité de deux taches témoins de celles-ci marquées par  $^{131}\text{I}$ . Pour cela, 0.5 ml de la solution ES est déposé sur un front de 25 cm,

\* Des opérations de contrôle ont permis de s'assurer que la mono- et la diiodohistidine sont retenues par le gel de silice et éluées dans les conditions adoptées et que le dérivé dihalogéné, dont l'adsorption est incomplète, ne donne pas alors naissance au produit monosubstitué.

sur la ligne de départ du chromatogramme et l'on place à 4 cm de part et d'autre une microgoutte calibrée du même milieu additionné de MIH et de DIH marquées. Après développement, les bandes correspondant à ces deux chromatogrammes sont découpées, séchées et révélées et l'on y contrôle la position des bandes de MIH et de DIH par des mesures de radioactivité. On découpe ensuite, dans la partie centrale des feuilles de papier filtre (20 cm), deux bandes horizontales correspondant aux spots des iodo-histidines. On élue MIH par l'eau distillée et DIH par  $\text{NH}_4\text{OH}$  N, on concentre à siccité sous vide et l'on reprend le résidu de MIH par 0.5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (solution EPM) et celui de DIH par 0.5 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  (solution EPD). On réalise avec les deux solutions des chromatogrammes en une et en deux dimensions dans chaque solvant sur une microgoutte (10 à 20  $\mu\text{l}$ ) additionnée d'une trace de MIH et de DIH marquées (quantité non décelable par des réactions colorées, mais seulement par des mesures de radioactivité).

Tous les chromatogrammes en une ou en deux dimensions de la solution EPM présentent une tache de monoiiodohistidine caractérisée par son  $R_F$ , par ses réactions, colorées et par le fait que la radioactivité de l'acide aminé témoin est strictement localisée à son niveau. Ceux de la solution EPD présentent en outre, plus faiblement, une tache de diiodohistidine répondant aux mêmes critères d'identification. Des résultats concordants ont été obtenus à cet égard en butanol acétique comme en butanol ammoniacal. La mono- et la diiodohistidine sont donc des constituants de l'iodoglobine étudiée.

L'adsorption des iodo-histidines sur gel de silice n'est pas quantitative dans le cas du dérivé dihalogéné, en sorte que la caractérisation de celui-ci a été particulièrement laborieuse. Elle a néanmoins seule permis d'obtenir les résultats acquis, car la protéolyse enzymatique de l'iodoglobine a comporté la libération de divers peptides, parmi lesquels seuls certains, renfermant un acide aminé basique avec un groupement aminé libre en bout de chaîne, ont été adsorbés avec les acides aminés basiques. Des peptides des iodo-histidines accompagnaient probablement celles-ci, car les chromatogrammes en deux dimensions présentaient, en dehors de celles de MIH et de DIH, des taches donnant faiblement la réaction de PAULY et celle à la ninhydrine (coloration brun-violet). La mise en oeuvre des deux iodo-histidines radioactives comme indicateurs a permis de les différencier des acides aminés libres avec certitude et, par ailleurs, de contrôler que la monoiiodohistidine caractérisée au cours de nos expériences ne provient pas de la dégradation du dérivé diodé.

## B. Etude de la thyroglobuline

1. *Préparation et hydrolyse enzymatique.* Six rats mâles de 150 à 200 grammes reçoivent en injection sous-cutanée 1.5 millicurie  $^{131}\text{I}$  sans entraîneur à l'état de NaI et sont sacrifiés 24 heures après. Leurs corps thyroïdes sont congelés, broyés et traités à deux reprises par 1 ml de solution à 0.9% de ClNa. L'extrait obtenu est soumis pendant 72 heures à pH 8.5 et à 38° C à l'action des protéinases pancréatiques (trypsine brute des Armour Laboratories, Chicago), afin de libérer les acides aminés dont on se proposait de mettre en évidence l'existence dans la protéine. Des essais successifs, de résultats concordants, ont été poursuivis sur deux lots de rats et sur des chiens.

2. *Caractérisation de la monoiiodohistidine.* L'hydrolysate porté à 10 ml est fractionné par passage sur colonne de gel de silice<sup>10</sup> et l'éluat ( $\text{HCl}$  0.1 N), concentré sous vide à siccité et repris par 0.5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (solution A), est soumis à la chromatographie de partage sur papier dans les conditions indiquées au paragraphe précédent. Après repérage d'une tache pouvant correspondre à la monoiiodohistidine ( $R_F$  0.09–0.11 en butanol acétique et 0.20–0.24 en butanol ammoniacal), on fractionne par chromatographie sur papier deux prises d'essai de 0.2 ml de solution A déposées sur une ligne de départ de 15 cm de largeur et l'on découpe la bande transversale sur laquelle se localise la tache radioactive de  $R_F$  pouvant correspondre à celui de MIH\* en utilisant comme solvant le butanol

\* Aucune tache présentant les caractères de la diiodohistidine ne se manifeste dans les chromatogrammes des hydrolysats de thyroglobuline marquée.

acétique dans un cas, le butanol alcalin dans l'autre. Après élution et concentration de ces taches par l'eau distillée on dispose de deux solutions purifiées de MIH (B, provenant des chromatogrammes en butanol acétique et C de ceux en butanol ammoniacal), que l'on analyse par chromatographie en une et en deux dimensions.

On réalise pour cela une opération en quelque sorte inverse de celle décrite à propos de la caractérisation de MIH dans l'iodoglobuline. Les petites quantités de monoiodohistidine marquée provenant de la thyroglobuline sont fractionnées après addition comme substance d'entraînement de 2. iodohistidine pure préparée par une modification de la méthode de BRUNINGS<sup>14</sup>. Des chromatogrammes en 1 et 2 dimensions ont été obtenus à partir des solutions B et C, et l'on y a repéré l'acide aminé au moyen de son  $R_F$  (coloration à la ninhydrine). Leur radioactivité a été mesurée par ailleurs; elle se localise bien sur la tache correspondant à celui-ci parmi d'autres. Des chromatogrammes en deux

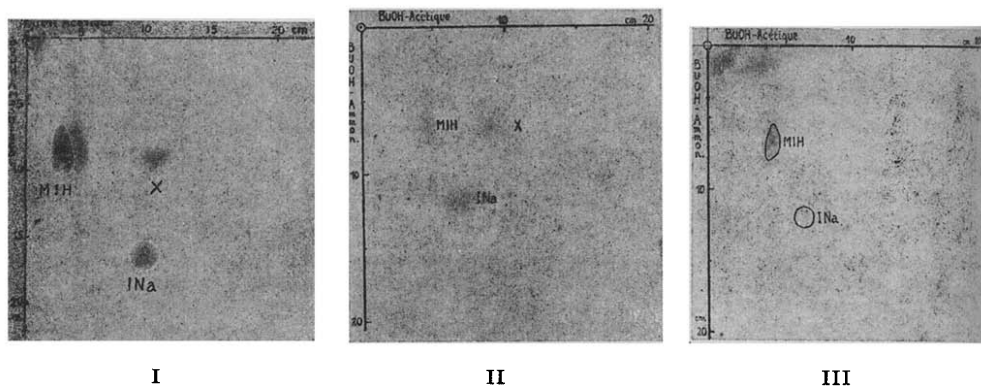


Fig. 1. Radioautogrammes d'une fraction (solutions B et C) de l'hydrolysate protéinase de la thyroglobuline marquée de Rat et chromatographie de référence. MIH = monoiodohistidine, I = iodures minéraux, X = corps inconnu

- I. Radioautogramme (chromatographie en deux dimensions de la solution B).
- II. Chromatogramme en deux dimensions de la solution C (révélation à la ninhydrine de MIH et à l'amidon de INa).
- III. Radioautogramme du chromatogramme reproduit en II.

dimensions ont été utilisés pour l'établissement de radio-autogrammes (film X ray no screen, Kodak), dont ceux (solution B et C) reproduits sur la Fig. 1 illustrent la présence de monoiodohistidine. La tache de l'acide aminé entraîneur colorée à la ninhydrine y est exactement superposable au plus important des spots radioactifs, parmi lesquels l'un est caractéristique des iodures minéraux et un autre correspond à un corps inconnu. Des radiochromatogrammes des solutions A, B et C ont, par ailleurs, permis de caractériser la monoiodohistidine à des étapes successives de son fractionnement, comme en rend compte l'examen de la Fig. 2. En effet, ceux de la solution A présentent des sommets correspondant à des taches radioactives dont le  $R_F$  est celui de MIH (0.09-0.11 en butanol acétique et 0.22-0.24 en butanol ammoniacal) avec d'autres, moins importants. Une partie de ces dernières a été éliminée par les opérations ayant permis de préparer les solutions B et C dont les radiochromatogrammes (une dimension) ne présentent plus que trois (butanol acétique) ou deux taches (butanol ammoniacal). L'une d'elles correspond à MIH, avec une sélectivité particulière sur les documents établis en butanol acétique.

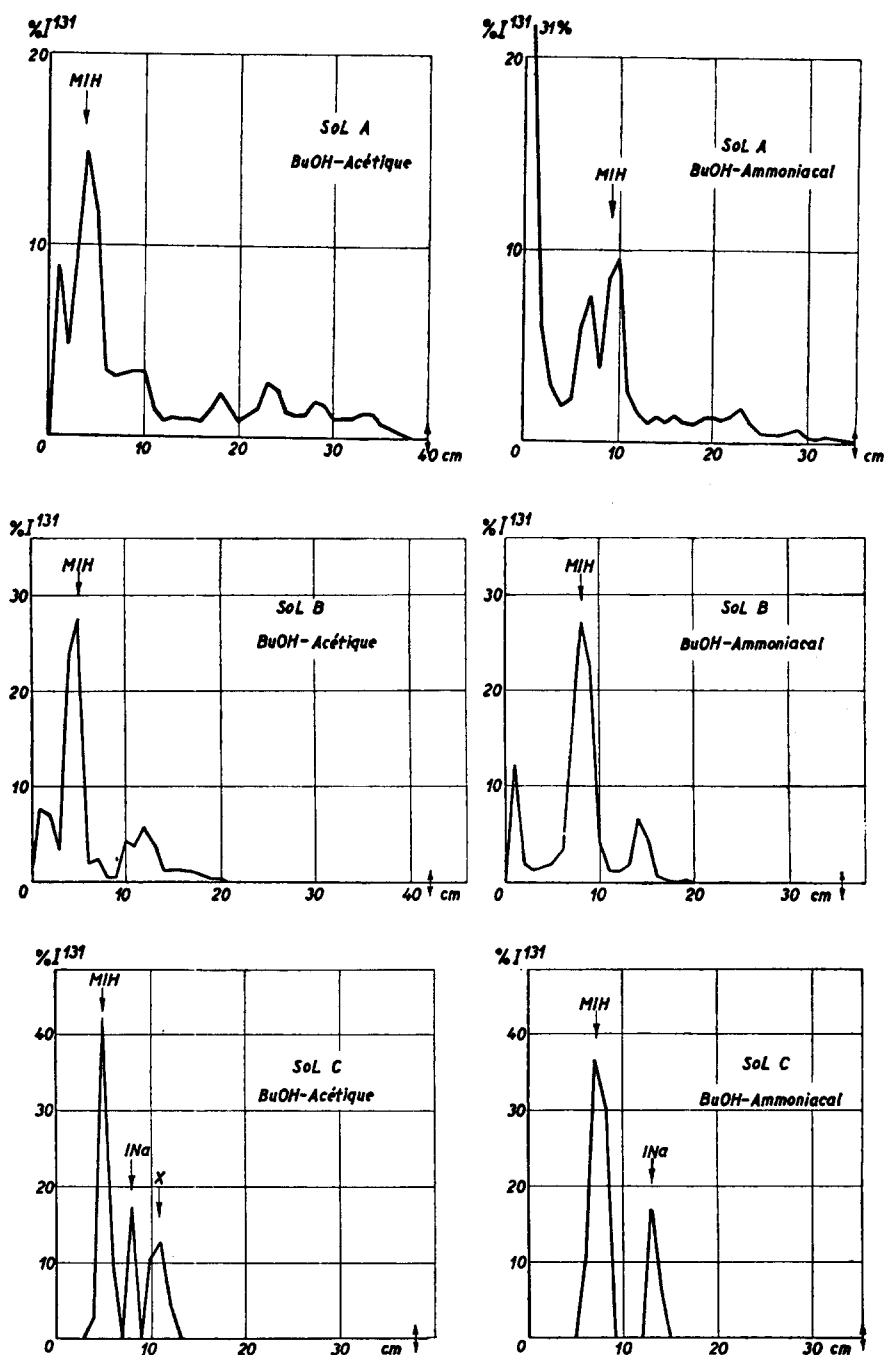


Fig. 2. Radiochromatogrammes des produits de fractionnements successifs (solutions A, B et C) de l'hydrolysate protéinasique de thyroglobuline marquée de Rat. Abscisses = distance (en cm) de l'origine du chromatogramme; Ordonnées = % de la radioactivité totale; Indications du solvant employé reportées sur la figure avec celles des positions des taches de référence connus:

MIH = monoiodohistidine, INa = iodure de sodium, et de produits inconnus = X.

La protéolyse enzymatique peut libérer des peptides d'iodotyrosine marquée de caractère basique adsorbables sur silice dont le  $R_F$  serait identique à celui de MIH. Il y avait donc lieu de s'assurer qu'aucun d'eux n'était susceptible de gêner l'interprétation des résultats obtenus. Pour cela, l'éluat du gel de silice (solution A) a été, après concentration sous vide, adsorbé sur colonne d'Activit 50  $\times$  P, qui fixe les acides aminés aromatiques et leurs peptides<sup>10</sup>. Les radiochromatogrammes de la fraction non adsorbée n'ont pas présenté de modification notable en ce qui concerne l'existence et la position de la tache radioactive de MIH. De même, ceux des solutions B et C après extraction à pH 1.0 au *n*-butanol, laquelle élimine les iodotyrosines et divers de leurs peptides.

La thyroglobuline renferme donc de la monoiodohistidine, dans laquelle on retrouve au maximum 2% de l'iode radioactif total de la glande.

#### DISCUSSION

Les résultats obtenus sur l'iodoglobine et sur la thyroglobuline méritent d'être brièvement commentés, en ce qui concerne les acides aminés caractérisés, dans le cadre général du mécanisme de l'ioduration des protéines.

La formation des deux iodohistidines par halogénéation directe de la globine doit être considérée comme certaine à la suite de nos recherches et de celles de FRAENKEL-CONRAT<sup>7</sup>. La faible réactivité du cycle imidazolique vis à vis de l'iode<sup>16</sup> explique qu'une fraction importante de l'histidine ne s'iode qu'après saturation de la tyrosine, comme l'ont suggéré BAUER ET STRAUSS<sup>5</sup>, et aussi que l'on trouve encore le dérivé monohalogéné avec la diiodohistidine dans des produits très riches en iode (14.0% I). La présence du premier comme constituant naturel de la thyroglobuline n'avait pas été envisagée jusqu'ici. Elle témoigne du fait que l'iode libéré dans le corps thyroïde à partir des iodures se répartit sur les deux cycles des acides aminés de la thyroglobuline susceptibles de le fixer, selon des modalités tenant à la réactivité propre à chacun. Celle-ci est, comme on l'a déjà signalé, beaucoup plus faible pour l'histidine que pour la tyrosine<sup>1,15,16</sup>, et, par ailleurs, le dérivé monosubstitué prend seul naissance lorsque l'acide aminé réagit avec de petites quantités d'halogène<sup>1</sup>. Aussi 2% au plus de l'iode thyroïdien marqué sont-ils retrouvés dans la monoiodohistidine, que nous avons par ailleurs caractérisée à l'état libre dans des glandes non autolysées (radiochromatographie de l'extrait aqueux d'organes d'animaux traités par des iodures marqués). La présence de ce corps relève uniquement du mécanisme chimique de l'ioduration de la protéine thyroïdienne; elle paraît sans relation directe avec la biosynthèse de la thyroxine.

#### RÉSUMÉ

1. La globine (Cheval) artificiellement iodée par une technique appropriée renferme de la monoiodohistidine et de la diiodohistidine. Ces deux acides aminés ont été séparés de l'hydrolysât enzymatique de l'iodoprotéine par adsorption sur gel de silice et caractérisés par chromatographie sur papier.

2. La thyroglobuline (Rat, Chien) renferme de la monoiodohistidine (au plus 2% de I total). Cet acide aminé a été caractérisé par radiochromatographie dans l'hydrolysât enzymatique de la protéine marquée après diverses opérations de fractionnement. La présence de monoiodohistidine à côté de quantités beaucoup plus importantes d'iodotyrosines est indépendante du cycle de la thyroxinogénèse.

3. L'utilisation d'iodohistidines marquées pour la caractérisation chromatographique de ces corps (obtention d'autogrammes et de radiochromatogrammes) a été réalisée selon des modalités techniques pouvant être appliquées à d'autres recherches du même type.

## SUMMARY

1. The globin (horse) artificially iodinated by an appropriate technique contains moniodohistidine and diiodohistidine. These two amino acids have been separated from the enzymatic protein hydrolysate by adsorption on silica gel and characterised by paper chromatography.

2. The thyroglobulin (rat and dog) contains moniodohistidine (no more than 2% of the total I). This amino acid has been characterised by radiochromatography in the enzymatic hydrolysate of the marked protein after different fractionation operations. The presence of moniodohistidine along side more important quantities of iodotyrosine is independent of the thyroxinogenesis cycle.

3. The use of marked iodohistidines for the chromatographic characterisation of these substances (obtained by autograms and radiochromatograms) has been followed according to techniques applied in other researches of the same type.

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Künstlich, mit Hilfe einer geeigneten Technik jodiertes Globin (Pferd) enthält Monojodhistidin und Dijodhistidin. Diese beiden Aminosäuren wurden vom enzymatischen Hydrolysat des Jodproteins durch Adsorption an Silicagel getrennt und durch Papier-Chromatographie charakterisiert.

2. Thyroglobulin (Ratte, Hund) enthält Monojodhistidin (maximal 2% des Gesamtgehaltes an Jod). Diese Aminosäure wurde durch Radiochromatographie im enzymatischen Hydrolysat des nach vielen Fraktionierungs-Operationen markierten Proteins charakterisiert. Das Vorkommen von Monojodhistidin neben viel grösseren Mengen Jodtyrosinen ist von dem Cyclus der Thyroxinogenese unabhängig.

3. Bei der Verwendung markierter Jodhistidine zum chromatographischen Nachweis dieser Substanzen (Herstellung von Autogrammen und Radiochromatogrammen) wurden Verfahren gebraucht, die auch für andere Untersuchungen dieser Art Anwendung finden können.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> J. ROCHE, S. LISSITZKY, O. MICHEL ET R. MICHEL, *Compt. rend.*, 232 (1951) 357.
- <sup>2</sup> R. M. FINK, C. E. DENT ET K. FINK, *Nature*, 160 (1947) 801;  
A. TAUROG, W. TONG ET I. L. CHAIKOFF, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 83;  
J. GROSS, C. P. LEBLOND, A. E. FRANKLIN ET J. H. QUASTEL, *Science*, 111 (1950) 605;  
J. ROCHE ET M. LAFON, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 147.
- <sup>3</sup> E. DRECHSEL, *Z. Biol.*, 33 (1895) 85;  
M. HENZE, *Z. physiol. Chem.*, 38 (1903) 60;  
C. R. HARRINGTON ET S. S. RANDALL, *Biochem. J.*, 25 (1931) 1032.
- <sup>4</sup> W. LUDWIG ET P. VON MUTZENBECHER, *Z. physiol. Chem.*, 258 (1939) 195.
- <sup>5</sup> E. BAUER ET H. STRAUSS, *Biochem. Z.*, 284 (1936) 197 et 231.
- <sup>6</sup> J. ROCHE, R. MICHEL ET M. LAFON, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 453.
- <sup>7</sup> H. FRAENKEL-CONRAT, *Arch. Biochem.*, 27 (1950) 109.
- <sup>8</sup> F. BLUM ET E. STRAUSS, *Z. physiol. Chem.*, 112 (1921) 111 et *Ibid.*, 127 (1923) 199.
- <sup>9</sup> E. P. REINEKE, *Vitamins and Hormones*, 4 (1947) 207.
- <sup>10</sup> C. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- <sup>11</sup> J. ROCHE, M. JUTISZ, S. LISSITZKY ET R. MICHEL, *Compt. rend.*, 131 (1950) 723.
- <sup>12</sup> M. L. ANSON ET A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 13 (1930) 469.
- <sup>13</sup> R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
- <sup>14</sup> K. J. BRUNINGS, *J. Am. Chem. Soc.*, 69 (1947) 205.
- <sup>15</sup> H. PAULY, *Ber.*, 43 (1910) 2243 et H. PAULY ET K. GUNDERMANN, *Ber.*, 41 (1908) 3999.
- <sup>16</sup> C. H. LI, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 1147; *Ibid.*, 66 (1944) 225 et 228.

Reçu le 3 Juin 1951