

SUR LA PRÉSENCE DE LA TRIIODOTHYRONINE DANS LA THYROGLOBULINE ET SUR SA BIOSYNTHÈSE

par

JEAN ROCHE, SERGE LISSITZKY ET RAYMOND MICHEL

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

L'halogénéation du cycle benzénique de la tyrosine comporte la formation successive de dérivés 3-mono et 3:5-disubstitués¹ et, par ailleurs, celle de la 3:5-diiodothyronine conduit à la thyroxine par l'intermédiaire de la 3:5:3'-triiodothyronine². Or, la thyroglobuline renferme de la 3-monoiodotyrosine associée à de la 3:5-diiodotyrosine³⁻⁶ et l'on admet que l'étape terminale de la thyroxinogénèse comporte la condensation de deux molécules de 3:5-diiodotyrosine⁷. Il était dès lors légitime d'envisager que de la 3:5:3'-triiodothyronine prenne naissance au sein de la thyroglobuline, si cette dernière réaction a également lieu entre une molécule de 3-monoiodotyrosine et une du dérivé diiodé du même acide aminé. Nous avons poursuivi des recherches sur l'existence de la triiodothyronine dans la thyroglobuline et sur sa formation éventuelle au sein de celle-ci. Les mêmes problèmes ont été étudiés indépendamment de nos premières recherches⁸ par GROSS ET PITTRIVERS⁹, dont les résultats ont fait l'objet de notes préliminaires publiées simultanément aux nôtres.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Mise en évidence de la triiodothyronine dans la thyroglobuline

Des lots de rats mâles (180-200 g) ont reçu, à l'état d'I¹³¹ Na sans entraîneur, de l'iode radioactif (I¹³¹) à la dose de 150 μ C par groupe de trois animaux, en deux injections intrapéritonéales (temps 0 et 24 heures), et ont été sacrifiés 24 heures après la dernière. La thyroglobuline a été extraite du corps thyroïde broyé, par macération de celui-ci dans une solution de chlorure de sodium à 0.9%¹⁰ et hydrolysée par voie enzymatique (trypsine non fractionnée des Laboratoires Armour, Chicago). Les acides aminés iodés marqués libérés ont été extraits par le *n*-butanol à pH = 1.0. Les solutions obtenues à partir du résidu sec de l'extrait renfermaient 90% au moins des produits radioactifs mis en oeuvre et étaient pratiquement dépourvues d'iодures; elles ont été analysées par radiochromatographie⁶.

Des prises d'essai de 50 μ l, additionnées de diiodothyronine, de triiodothyronine et de thyroxine servant d'entraîneurs, ont été déposées sur des feuilles de papier Whatman n° 1 en vue de la séparation chromatographique de leurs constituants. Celle-ci a été opérée en deux dimensions, en utilisant comme solvant, dans la première direction, le *n*-butanol saturé d'ammoniaque 2 N et, dans la seconde, l'isopentanol saturé d'ammoniaque 6 N. Les taches d'acides aminés ont été révélées à la ninhydrine et des radioautogrammes ont été établis afin de confronter les positions respectives des taches colorées et de celles présentant une radioactivité. La Fig. 1 reproduit les résultats obtenus au cours d'une expérience de ce type*.

* La triiodothyronine a été par ailleurs identifiée sur des chromatogrammes à une dimension par son *R*_F (0.27) en présence d'isopentanol saturé d'ammoniaque 6 N.

Bibliographie p. 226.

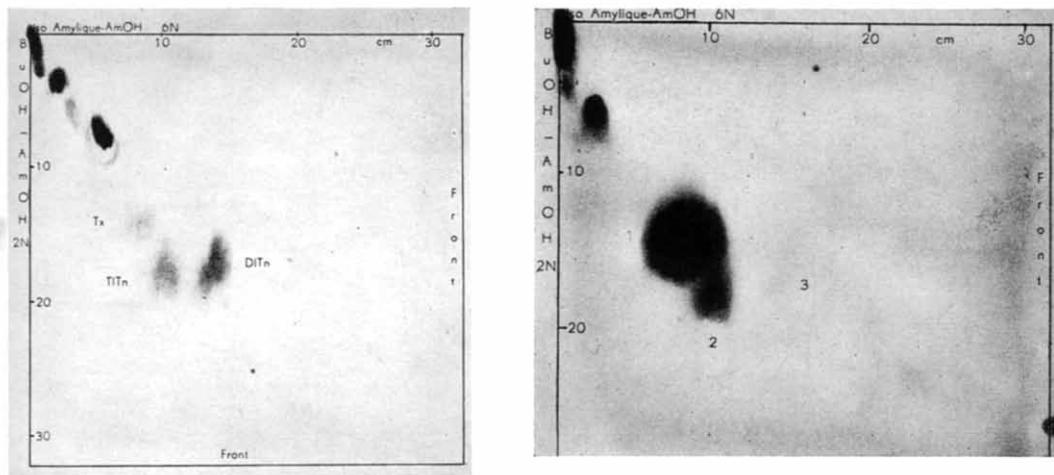


Fig. 1. Partie droite: chromatogramme à deux dimensions (*n*-butanol saturé d'ammoniaque 2 N et isopentanol saturé d'ammoniaque 6 N) de l'extrait *n*-butanolique, additionné de diiodothyronine, de triiodothyronine (entraîneurs), de l'hydrolysat enzymatique de thyroglobuline radioactive (révélation à la ninhydrine). Partie gauche: radioautogramme du document reproduit sur la partie droite. Les signes 1, 2 et 3 désignent respectivement la thyroxine (Tx), la triiodothyronine (TITn) et la diiodothyronine (DITn).

Les radioautogrammes ont présenté dans tous les cas une tache importante correspondant à la thyroxine¹, à laquelle est associée une autre, moins sombre, occupant la position propre à la triiodothyronine². Une troisième, beaucoup plus discrète³, centrée sur la tache de la diiodothyronine développée à la ninhydrine est en général présente (Fig. 1), mais a fait défaut dans certains cas. L'existence des deux dérivés de la thyronine dans la thyroglobuline devait, dès lors, être considérée comme probable. Elle a été établie par le contrôle suivant qui a permis d'autre part d'exclure une confusion avec des peptides d'acides aminés iodés.

L'extrait *n*-butanolique du corps thyroïde de trois rats ayant reçu 250 μ C ^{131}I (400 ml) a été évaporé à sec sous vide au dessous de 50°, repris par le *n*-butanol et fractionné dans sa totalité par chromatographie sur papier, en prenant comme solvant l'isopentanol saturé d'ammoniaque 6 N. Les bandes correspondant à la position des témoins de diiodothyronine ($R_F = 0.38$) et de triiodothyronine ($R_F = 0.27$) ont été élues par l'ammoniaque 2 N et les éluats concentrés sous vide et repris par 1 ml d'ammoniaque 2 N. On les a soumis ensuite à l'action d'un excès d'iode marqué, dans les conditions où la thyroxine prend naissance à partir des dérivés di- et trihalogénés de la thyronine² et l'on a procédé à l'étude radiochromatographique des produits formés.

La transformation en thyroxine ($R_F = 0.15$) du constituant radioactif de $R_F = 0.27$, souillé d'une petite quantité de cette dernière, est donc quantitative, en sorte que le premier doit être considéré comme étant la triiodothyronine. L'élution et l'ioduration de la tache du dérivé diiodé ($R_F = 0.38$) ont conduit à des résultats identiques, bien que portant sur des radioactivités très sensiblement moindres car le produit étudié n'est alors présent qu'à de beaucoup plus faibles taux. Dans ces essais, environ 5 à 10% de la radioactivité totale étaient fixés à la triiodothyronine et de 0 à 2% à la diiodothyronine*. La première est seule un constituant constant de la rotéine et, par ailleurs, comme GROSS ET PITT-RIVERS⁴, nous l'avons régulièrement retrouvée dans les chromatogrammes de l'extrait butanolique du plasma sanguin.

* Il n'est pas encore possible de préciser si celle-ci est iodée en position 3 et 5 ou en 3 et 3'.

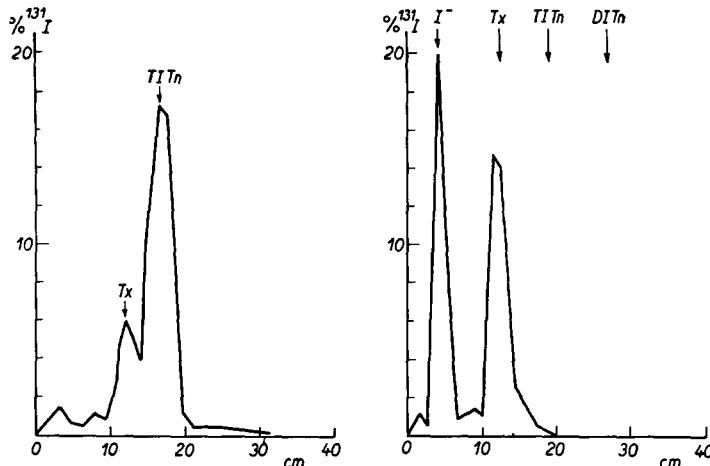


Fig. 2. Partie gauche: radiochromatogramme de la tache de triiodothyronine (souillure de thyroxine) provenant de l'extrait *n*-butanolique de l'hydrolysat enzymatique de la thyroglobuline marquée du rat. Partie droite: radiochromatogramme des produits de l'ioduration de l'éluat de la même tache (solvent: isopentanol saturé d'ammoniaque 6 N); I⁻ = iodures; Tx = thyroxine, TITn = triiodothyronine, DITn = diiodothyronine.

Abscisses: longueur de chromatogramme (cm)

Ordonnées: % de la radioactivité totale.

Biosynthèse thyroïdienne de la triiodothyronine

La formation de la thyroxine à partir de la diiodotyrosine a été mise en évidence en suivant l'évolution dans le temps de la teneur du corps thyroïde en l'un et en l'autre acide aminé marqués chez des animaux ayant reçu de l'iode radioactif^{4, 11}. Nous nous sommes proposés de reprendre cette étude sur un plan plus large en l'étendant au dosage de la monoiodotyrosine et à celui de la triiodothyronine et en utilisant la séparation chromatographique des constituants iodés de la thyroglobuline. Par ailleurs, comme la possibilité d'une formation périphérique de triiodothyronine par déshalogénéation de la thyroxine a été envisagée par GROSS ET PITT-RIVERS⁵, nous avons recherché si les proportions de ces deux dérivés présentent ou non des variations de même sens dans le plasma et dans le corps thyroïde à des temps successifs après l'injection d'iodures marqués.

Huit rats mâles (180-200 g) ayant reçu en injection intraperitoneale 50 μ C ¹³¹I, à l'état d'I³¹Na sans entraîneur ont été sacrifiés deux par deux, après 10, 24, 48 et 72 heures. Leurs corps thyroïdes congelés ont été broyés et traités par 2 ml de chlorure de sodium à 0.9%. La solution protéique obtenue a été soumise à l'action de la trypsine non fractionnée (Laboratoires Armour, Chicago) à pH: 8.5 pendant 72 heures à 38°C et extraite par 5 ml de *n*-butanol saturé d'HCl 0.1 N, puis par 5 ml de *n*-butanol neutre. Après évaporation sous vide et reprise par 0.3 ml du dernier, on a analysé les constituants de la solution par radiochromatographie sur papier en présence de deux solvants: a. mélange de *n*-butanol: 78 p. d'acide acétique: 5 p. d'eau: 17 p. et b. isopentanol saturé d'ammoniaque 6 N. Le premier de ces milieux permet une séparation satisfaisante des mono- et diiodotyrosine⁶, le second celle de la triiodothyronine et de la thyroxine¹. L'extrait *n*-butanolique de 3 ml de plasma sanguin a été préparé et étudié dans des conditions identiques.

On trouvera dans le Tableau I les résultats obtenus (radioactivité déterminée sur les chromatogrammes établis en présence de *n*-butanol acétique pour la mono et la diiodotyrosine (MIT et DIT) et en présence d'isopentanol saturé d'ammoniaque 6 N pour la triiodothyronine et la thyroxine (TITn et Tx). Ceux relatifs au corps thyroïde

correspondent au pourcentage d' ^{131}I total de l'organe tandis que'il n'en est pas de même de ceux relatifs au plasma sanguin. Dans ces dernier cas, les pourcentages indiqués sont ceux de la radioactivité injectée retrouvés dans une prise d'essai (3 ml de plasma); néanmoins, comme celle-ci a toujours été équivalente à un même volume de plasma, les rapports, calculés à partir de ces données, entre les concentrations de divers corps dans la glande et dans le plasma nous ont paru devoir être significatifs (Tableau II).

TABLEAU I

RÉPARTITION D' ^{131}I ENTRE LA MONOIODOTYROSINE (MIT), LA DIIODOTYROSINE (DIT), LA TRIIODOTHYRONINE (TITn) ET LA THYROXINE (Tx) DANS LE CORPS THYROÏDE ET LE PLASMA À DES TEMPS DIVERS APRÈS L'INJECTION D'UNE DOSE TRACEUSE D' $\text{I}^* \text{Na}$ AU RAT

Temps après l'injection (heures)	% d' ^{131}I présent dans le corps thyroïde à l'état de				% d' ^{131}I du plasma présent à l'état de	
	MIT	DIT	TITn	Tx	TITn	Tx
10	37.4	41.2	2.0	6.0	10.0	18.4
24	33.4	31.5	3.0	12.0	8.0	24.1
48	25.7	31.9	4.0	20.0	9.0	42.4
72	29.4	27.4	5.0	22.0	5.0	22.6

La triiodothyronine ne renferme donc qu'une fraction assez faible de l'iode marqué. Celle-ci est néanmoins égale, pendant les trois jours qui suivent l'injection, à 20-25 pour 100 de celle présente dans la thyroxine, proportion atteinte plus tardivement dans le plasma.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

La présence de triiodothyronine dans la thyroglobuline du rat doit être considérée comme établie par les faits exposés plus haut, que des expériences poursuivies sur de la thyroglobuline marquée de porc ont confirmé. Il est probable, pour des raisons examinées à propos de la synthèse de cet acide aminé², que le produit naturel est la L-3:5:3'-triiodothyronine; telle est également l'opinion de GROSS ET PITTRIVERS⁹. La 3:5:3'-triiodothyronine est associée à la thyroxine en quantité appréciable; elle renferme en général du cinquième au quart de l'iode radioactif thyroxinien dans la glande, tandis que la diiodothyronine ne l'accompagne qu'à l'état de traces. Ces faits posent le problème de la nature des produits hormonaux libérés par la protéolyse thyroïdienne, l'activité biologique de la triiodothyronine étant la plus élevée^{9,12}. En l'état actuel de nos connaissances, l'hormone secrétée par la glande apparaît comme un mélange de thyroxine et de L-3:5:3'-triiodothyronine, avec forte prédominance de la première. Il est par ailleurs possible qu'une fraction du dérivé triiodé circulant dans le sang ait une origine périphérique et provienne d'une désioduration partielle de la thyroxine au niveau des tissus⁹. Le problème de son origine dans le corps thyroïde est à cet égard distinct de celui de l'origine plasmatique du même corps.

Les problèmes posés par la biosynthèse de la 3:5:3'-triiodothyronine méritent d'être brièvement discutés à partir des données rassemblées dans le Tableau I et des rapports qu'elles ont permis de calculer (Tableau II).

Deux hypothèses peuvent être formulées au sujet de l'origine de la triiodothyronine. Cet acide aminé peut provenir de la condensation molécule à molécule de la mono- et

TABLEAU II

RAPPORTS DE RÉPARTITION D'¹³¹I ENTRE DIVERS ACIDES AMINÉS IODÉS
DANS LE CORPS THYROÏDE ET LE PLASMA DU RAT À DES TEMPS SUCCESSIFS APRÈS
L'INJECTION D'I¹³¹Na (MÊME SYMBOLES D'ABRÉVIAISON QUE DANS LE TABLEAU I)

Temps après l'injection (heures)	Rapports de répartition				
	dans le corps thyroïde				dans le plasma
	MIT TITn	MIT Tx	DIT Tx	Tx TITn	
10	17.7	6.3	6.8	3.0	1.8
24	11.1	2.7	2.6	4.0	3.0
48	6.2	1.3	1.6	5.0	4.6
72	5.9	1.3	1.2	4.4	4.5

de la diiodotyrosine, par une réaction calquée sur celle donnant naissance à la thyroxine à partir de deux molécules de diiodotyrosine⁷. Il peut, au contraire, être un produit de désioduration de la thyroxine. Cette seconde manière de voir a été adoptée par GROSS ET PITT-RIVERS⁹ en ce qui concerne la triiodothyronine circulant dans le plasma. Il ne semble pas qu'elle puisse l'être pour cet acide aminé en tant que constituant de la thyroglobuline.

En effet, nous avons constaté que la désiodase thyroïdienne est, dans les conditions où elle est active sur les iodotyrosines^{13,7}, inefficace vis à vis des dérivés de la thyroxine (di- et triiodothyronine et thyroxine), que ceux-ci soient à l'état libre ou fixés à la thyroglobuline. La triiodothyronine se forme donc primitivement au cours de l'ioduration de celle-ci et le rapport: Tx/TITn tend à augmenter dans les 24 heures qui suivent l'injection d'iode marqué, alors que le contraire devrait se manifester si elle était un dérivé de la thyroxine. Le fait que le même rapport tende à une valeur identique dans la thyroglobuline et dans le plasma (4.5-5.0) est, par ailleurs, favorable à l'hypothèse que le produit de la protéolyse thyroïdienne prédomine dans le dernier, l'apport éventuel de triiodothyronine d'origine périphérique étant faible ou nul. La connaissance de l'activité spécifique des divers acides aminés iodés thyroïdiens et plasmatiques à des temps successifs après l'injection d'¹³¹I est nécessaire pour formuler sur ces divers points une opinion plus ferme.

Enfin, l'existence de la triiodothyronine au sein de la protéine thyroïdienne conduit à envisager sa formation dans le cadre de l'ioduration de la thyroglobuline et de la thyroxinogénèse. La triiodothyronine, produit primitif de l'halogénéation de la protéine, paraît présenter dans la glande une évolution à certains égards analogues à celle de la monoiodotyrosine, en raison de la possibilité de substitution en 5 par l'halogène de l'un de ses cycles. Les valeurs des rapports: MIT/Tx et DIT/Tx aux divers temps des expériences sont très voisines les unes des autres, mais très différentes de celles de: MIT/TITn. Nous avons par ailleurs observé, à plusieurs reprises que la teneur de la protéine en monoiodotyrosine marquée demeure très élevée longtemps après l'injection d'iodures radioactifs, en sorte que le rôle de cet acide aminé ne paraît pas être seulement celui de précurseur immédiat de son homologue diiodé. En outre, le processus d'ioduration évoluant dans le corps thyroïde doit nécessairement porter sur tous les cycles benzéniques monohalogénés présents (MIT et TITn) et cela avec une intensité fonction de la réactivité de chacun. Aussi considérons-nous comme plausible que la triiodothyronine

soit un des précurseurs de la thyroxine au sein de la protéine thyroïdienne, la fraction que l'on retrouve dans celle-ci ayant seule échappé à l'halogénéation totale. Le fait que les valeurs du rapport: MIT/TITn sont nettement plus élevées que celles des rapports: MIT/Tx en est sans doute un témoignage.

Cette conception est en accord avec l'ensemble de nos connaissances sur l'ioduration des protéines¹⁴. Elle n'est, par ailleurs, en rien défavorable à l'hypothèse d'une formation périphérique de triiodothyronine aux dépens de la thyroxine*, considérée par certains comme indispensable à l'action hormonale au niveau des cellules⁹. L'existence de ce processus devrait en effet être indépendante de la biosynthèse thyroïdienne du premier corps, laquelle ne saurait être mise en doute. De nouvelles recherches sont nécessaires pour préciser dans quelle mesure il constitue soit une réaction secondaire dans le cycle de la thyroxinogénèse, soit l'une des deux voies importantes de celle-ci (condensation de deux molécules de diiodotyrosine et condensation molécule à molécule de la mono- et de la diiodotyrosine suivie de l'halogénéation de la triiodothyronine).

RÉSUMÉ

1. La 3:5:3'-triiodothyronine est un constituant de la thyroglobuline, dans l'hydrolysat enzymatique de laquelle sa caractérisation a été réalisée par radiochromatographie et transformation en thyroxine. Dans les conditions où nous nous sommes placés, sa radioactivité correspond au quart environ de celle de la thyroxine et est, en général, voisine de 5 % de la radioactivité totale de la protéine. La diiodothyronine n'est présente qu'à l'état de traces. Les produits hormonaux résultant de la protéolyse de la thyroglobuline sont constitués par un mélange de thyroxine et de triiodothyronine avec forte prédominance de la première.

2. La biosynthèse de la 3:5:3'-triiodothyronine au sein de la thyroglobuline a été étudiée dans le corps thyroïde à des temps successifs pendant 3 jours après l'injection d'iodures radioactifs, en suivant l'évolution de ce corps, des mono- et diiodotyrosine et de la thyroxine marquées. L'hypothèse de la formation de la 3:5:3'-triiodothyronine à partir de la condensation molécule à molécule de mono- et de diiodotyrosine a été dégagée des faits observés et l'on a pu envisager que ce corps soit le précurseur d'une partie de la thyroxine présente dans la glande.

SUMMARY

1. 3:5:3'-triiodothyronine is a constituent of thyroglobulin. It has been characterized in the enzymic hydrolysate of this protein, by radiochromatography and transformation into thyroxine. Under the experimental conditions adopted, the radioactivity of 3:5:3'-triiodothyronine is about the fourth of that of thyroxine and nearly 5 % of that of the protein. Only traces of diiodothyronine are simultaneously present. The hormone resulting from endothyroidal proteolysis of thyroglobulin is a mixture of thyroxine and triiodothyroxine, with a high percentage of the former.

2. The biosynthesis of 3:5:3'-triiodothyronine in thyroglobulin has been studied in the thyroid gland by the evolution of the radioactivity of this amino acid, of mono- and di-iodotyrosine and of thyroxine, during 3 days after injection of tracer doses of ¹³¹I. The hypothesis of 3:5:3'-triiodothyrosine formation from mono- and di-iodotyrosine is proposed and the rôle of the first as precursor of a part of thyroxine of the gland is discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

1. 3:5:3'-Triiodthyronin ist ein Bestandteil des Thyroglobulins, in dessen Enzymhydrolysat es durch Radiochromatographie und Überführung in Thyroxin charakterisiert wurde. Unter den festgelegten experimentellen Bedingungen ist die Radioaktivität des 3:5:3'-Triiodthyronins ungefähr $\frac{1}{4}$ der des Thyroxins und beträgt im allgemeinen ungefähr 5 % der gesamten Radioaktivität des Proteins. Dijodthyronin ist nur in Spuren anwesend. Die aus Thyroglobulin durch Proteolyse erhaltenen hormonalen Produkte sind aus einer Mischung von Thyroxin und Triiodthyronin zusammengesetzt, wobei das erstere stark überwiegt.

* La 3:5:3'-triiodothyronine, marquée en 3:5 ou en 3' et la thyroxine marquée en 3:5 ou en 3':5' sont métabolisées avec excretion urinaire d'une partie de leur iodé à l'état d'iodures¹⁵.

2. Die Biosynthese des 3:5:3'-Trijodthyronins im Thyroglobulin wurde in der Schilddrüse nach Injektion von radioaktiven Jodiden in aufeinanderfolgenden Abständen durch Verfolgung der Entwicklung der Radioaktivität des 3:5:3'-Trijodthyronins, des Mono- und des Dijodtyrosins und des Thyroxins untersucht. Die Hypothese der Bildung des 3:5:3'-Trijodthyronins beginnend mit der Kondensation je eines Moleküls Mono- und Dijodtyrosins wurde vorgeschlagen und die Rolle des ersten als Vorläufer eines Teiles des in der Drüse vorhandenen Thyroxins wurde besprochen.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. ROCHE, S. LISSITZKY, O. MICHEL ET R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 439.
- ² J. ROCHE, S. LISSITZKY ET R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 215.
- ³ K. FINK ET R. M. FINK, *Science*, 108 (1948) 358.
- ⁴ A. TAUROG, W. TONG ET I. L. CHAIKOFF, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 83.
- ⁵ J. GROSS, C. P. LEBLOND, A. E. FRANKLIN ET J. M. QUASTEL, *Science*, III (1950) 605.
- ⁶ J. ROCHE, M. JUTISZ, S. LISSITZKY ET R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 257.
- ⁷ C. R. HARRINGTON, *Proc. Roy. Soc., B*, 132 (1944) 223.
- ⁸ J. ROCHE, S. LISSITZKY ET R. MICHEL, *Compt. rend.*, 234 (1952) 997 et 2047.
- ⁹ J. GROSS ET R. PITT-RIVERS, *Lancet*, 262 (1952) 349.
- ¹⁰ Y. DERRIEN, R. MICHEL ET J. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 454.
- ¹¹ A. TAUROG ET I. L. CHAIKOFF, *J. Biol. Chem.*, 165 (1946) 217.
- ¹² C. R. HARRINGTON, J. LERMAN ET J. H. MEANS, *J. Clinic. Endocrinol.*, (1952).
- ¹³ J. ROCHE, O. MICHEL, R. MICHEL ET S. LISSITZKY, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 161.
- ¹⁴ J. ROCHE ET R. MICHEL, *Advances in Protein Chem.*, 6 (1951) 253.
- ¹⁵ R. MICHEL, J. ROCHE ET J. TATA, *C. R. Soc. Biol.*, 146 (1952) 1003;
J. ROCHE, S. LISSITZKY ET R. MICHEL, *C. R. Soc. Biol.*, 146 (1952) 1474.

Reçu le 9 janvier 1953