

CULTURE *IN VITRO* DE LA GLANDE THYROÏDE DE JEUNES RATS ET BIOSYNTHÈSE DES HORMONES THYROÏDIENNES

JEAN ROCHE, MIROSLAVA PAVLOVÍČ ET RAYMOND MICHEL

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

Des coupes du corps thyroïde de divers Mammifères immergées dans un milieu isotonique renfermant des iodures marqués opèrent la synthèse des iodotyrosines et de la L-thyroxine¹. Or, la glande de rats de 15 à 20 jours, cultivée pendant plusieurs semaines, demeure apte à concentrer les ions I⁻ et à en intégrer l'halogène dans des combinaisons organiques encore non définies². Il nous a paru que des cultures de corps thyroïde pourraient constituer un matériel mieux adapté que des coupes à l'étude de la biosynthèse des hormones et à celle des facteurs exerçant une influence sur ce processus. La culture de glandes embryonnaires³ a déjà été mise à profit dans le même but. Elle offre toutefois moins de possibilités, car elle ne peut porter que sur de très faibles quantités de tissu; son principal intérêt nous semble être de relier l'évolution morphogénétique du corps thyroïde à l'hormonogénèse.

Nous nous sommes proposés, dans une première série d'essais, d'étudier la formation des hormones et de leurs précurseurs par des cultures de corps thyroïde de jeunes rats, mises en présence d'un milieu isotonique renfermant des iodures marqués par ¹³¹I. Nous espérons, en faisant porter nos recherches sur le tissu glandulaire et sur le liquide au sein duquel il baigne, pouvoir suivre non seulement l'hormonogénèse, mais aussi la sécrétion des produits élaborés par l'organe. Une seconde série d'expériences a été consacrée à la stimulation de l'activité du corps thyroïde par les produits de la sécrétion du lobe antérieur de l'hypophyse, dans des cultures où les deux organes ont été associés. Comme la sécrétion thyroïdienne renferme un mélange de quatre iodothyronines actives à des degrés divers (L-thyroxine ou T₄, L-3:5:3'-et L-3:3':5'-triiodothyronine ou 3:5:3'-T₃ et 3:3':5'-T₃, L-3:3'-diiodothyronine ou T₂), il y avait lieu de rechercher si l'accélération de l'hormonogénèse modifie ou non la proportion dans laquelle ces corps prennent naissance en dehors d'un stimulus pituitaire.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Nos recherches ont comporté la culture de fragments d'organes, suivie de leur incubation dans une solution renfermant des iodures marqués et l'analyse radiochromatographique des produits de l'activité thyroïdienne. L'étude de ceux-ci a été poursuivie à la fois sur la glande et sur le milieu dans lequel elle a été mise en suspension en présence d'¹³¹I Na.

I. Culture du corps thyroïde de jeunes rats

Des glandes de rats âgés de 15 à 20 jours, découpées en gros fragments, ont été mises en cultures, stérilement à 37° C, soit par la technique des verres de montres modifiée¹, soit par celle de WOLFF ET HAFFEN⁵.

Dans le premier cas, le milieu nutritif a été constitué par 10 gouttes de sérum de Rat adulte et 8 gouttes de jus d'embryon de poulet de 10 à 11 jours, dilué à 15%, pour chaque organe, et le repiquage était opéré tous les 8 jours; les conditions adoptées étaient identiques à celles du travail antérieur de l'un de nous² ayant servi de point de départ à ces recherches. Dans le second cas, nous avons employé un milieu standard solide renfermant de la gélose, du liquide de Tyrode et du jus d'embryon de poulet de 8 jours, dilué au demi, selon les modalités adoptées par WOLFF ET HAFFEN. Un contrôle histologique de la structure des glandes a permis de constater que l'organe demeure inaltéré au bout de 25 jours; l'aspect des coupes est pratiquement identique à celui d'un corps thyroïde normal en léger hypofonctionnement (Fig. 1). L'hypophyse (partie antérieure grossièrement séparée ou organe total) a été associée au corps thyroïde des mêmes animaux dans certaines cultures en milieu gélosé.

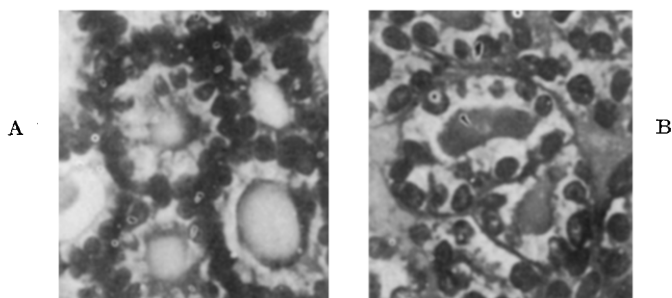


Fig. 1. Coupes de corps thyroïde de rats de 20 jours: A. après 10 jours de culture en milieu solide (méthode de WOLFF ET HAFFEN⁵); B. après 25 jours de culture en milieu liquide (méthode de PAVLOVÍČ²). Grossissement = 980.

II. Incubation en présence d'¹³¹I Na d'organes cultivés et d'organes témoins et analyse chromatographique des produits formés

Les corps thyroïdes en culture ont été lavés dans une solution saline isotonique stérile (liquide de Tyrode ou de Pannett et Compton) et placés, par groupes de 10 (environ 4 mg), dans 0.4 ml du même milieu additionné de 20 ou de 40 μ c d'¹³¹I Na (sans entraîneur). Après incubation de 18 à 24 heures à 37° C, les organes ont été séparés, lavés et soumis à une hydrolyse protéinasique destinée à libérer les acides aminés iodés de la thyroglobuline (action successive des protéinases pancréatiques totales [Laboratoires Armour] et de la papaine). Chaque série d'essais a comporté des témoins, réalisés avec des glandes non cultivées, fraîchement prélevées sur des rats de 15 à 20 jours et placées aussitôt après dans le même milieu d'incubation que les organes mis au préalable en culture.

L'étude radiochromatographique des hydrolysats de la glande et celle des liquides d'incubation ont été poursuivies selon des modalités particulières. En effet, la présence d'un excès d'iodures marqués et de sels divers rend nécessaire leur élimination*. Celle-ci a été réalisée par électrophorèse dans les conditions suivantes: dépôt sur papier Whatman No. 1 (45 \times 20 cm) sur une ligne de 5 à 15 cm, du liquide à analyser, solution tampon de CO₃ (NH₄)₂ 0.2M ajustée

* Les iodures renferment jusqu'à plus de 90% de la radioactivité dans les liquides d'incubation et, souvent, environ 30% de celle-ci dans les hydrolysats; il est dès lors très difficile de les séparer par chromatographie des autres produits iodés. En outre, la présence de sels gêne la migration de ces derniers.

à pH = 9.5, 120-150 volts, 18 milliampères, 120 à 180 minutes⁶. Les iodures migrent alors à 6-8 cm de la ligne de départ, les iodotyrosines de 2.0-2.5 cm, les iodothyronines et les iodures d'azote de 0 à 1 cm. L'élution par NH_4OH à 1% des bandes renfermant les deux groupes d'acides aminés a permis de recueillir des solutions se prêtant bien à l'analyse.

La chromatographie bidimensionnelle a été opérée dans divers solvants: (1) *n*-butanol saturé d' NH_4OH 2 N, (2) *n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17), (3) alcool amylique tertiaire saturé d' NH_4OH 2 N. Lorsque l'éluat renferme à la fois des iodotyrosines et des iodothyronines, on emploie dans une première direction le *n*-butanol ammoniacal, qui sépare efficacement les deux groupes d'acides aminés. On repère ensuite leurs taches par des mesures de radioactivité le long du chromatogramme et l'on découpe celui-ci en deux parties contenant respectivement les iodotyrosines ($R_F = 0.15$) et les iodothyronines ($R_F = 0.60$), associées ou non à des iodures dont l'élimination par l'électrophorèse aurait été incomplète. La bande des iodotyrosines est développée, en deuxième dimension, par du *n*-butanol acétique et celle des iodothyronines par l'alcool amylique tertiaire ammoniacal. Dans un petit nombre de cas, où 3:3':5'- T_3 était assez abondante, le *n*-butanol acétique a été utilement substitué à ce dernier solvant. Les témoins non radioactifs ont été révélés aux réactions à la ninhydrine, de PAULY⁷ et de BOWDEN ET MACLAGAN⁸, et leurs taches ont servi à l'identification des produits radioactifs, révélés par autographie sur film Kodirex sans écran.

III. Biosynthèse in vitro d'hormones et de leurs précurseurs par le corps thyroïde (cultures et organes témoins)

Les recherches ont porté sur l'activité des organes mis en culture pendant 4, 10 et 25 jours et sur celle de témoins constitués par des glandes fraîchement prélevées sur de jeunes rats. Les corps thyroïdes et le liquide renfermant ^{131}I Na dans lequel ils ont été immergés pendant 18-24 heures à 37° C ont été analysés. Nous ne ferons état ici que des résultats obtenus après le temps de culture le plus long, sur des lots de 10 glandes incubées en présence de 20 à 40 μC ^{131}I ; ils sont illustrés par quelques radioautochromatogrammes bidimensionnels reproduits sur les Figs. 2 et 3.

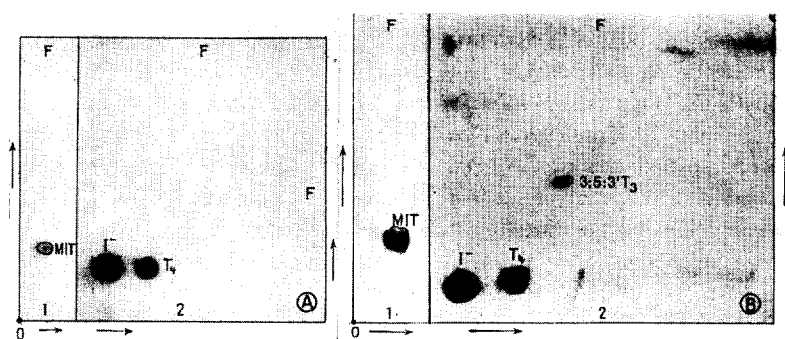


Fig. 2. Radioautochromatogrammes bidimensionnels des constituants iodés marqués du liquide d'incubation de corps thyroïdes de rats de 20 jours ayant subi 25 jours de culture (A) et d'organes témoins fraîchement prélevés après 24 heures de contact à 37° C avec du liquide de Tyrode renfermant 20 μC ^{131}I Na par 10 glandes. Partie 1 des clichés A et B: chromatographie bidimensionnelle en *n*-butanol saturé d' NH_4OH 2 N (de gauche à droite) et en *n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17) (de bas en haut). Partie 2 des clichés A et B: chromatographie bidimensionnelle en *n*-butanol saturé d' NH_4OH 2 N (de gauche à droite) et en alcool amylique tertiaire saturé d' NH_4OH 2 N (de bas en haut). I^- = iodures; MIT = 3-monoiodotyrosine; T_4 = thyroxine; 3:5:3'- T_3 = 3:5:3'-triiodothyronine; O = origine; F = front.

Aucune différence qualitative importante n'a été enregistrée entre les glandes fraîches témoins et celles ayant été mises en culture, ce qui traduit la persistance de l'activité hormonogène dans les secondes, toutefois avec une intensité moindre après 25 jours de survie *in vitro*. Des différences importantes se manifestent, par

contre, dans les deux cas, entre les constituants iodés des glandes et ceux de leur milieu d'incubation. Le liquide dans lequel baignent les premières renferme des combinaisons radioactives, élaborées par l'organe aux dépens des iodures qu'il concentre et éliminées après hydrolyse protéinasique de la thyroglobuline. On y trouve toujours de la 3-monoiodotyrosine (MIT), de la 3:5-diiodotyrosine (DIT) et des hormones, à savoir T_4 associée, surtout dans le cas des organes témoins non cultivés, à de petites quantités de 3:5:3'- T_3 (Fig. 2A et B). La glande renferme MIT et DIT, associée à un produit inconnu, probablement peptidique (corps P), mais pas d'iodothyronine (Fig. 3); DIT y est alors notablement plus abondante que dans le liquide d'incubation. Des traces d'iodure d'azote (N) ne constituent sans doute qu'un artefact. La signification de ces faits sera discutée plus bas.

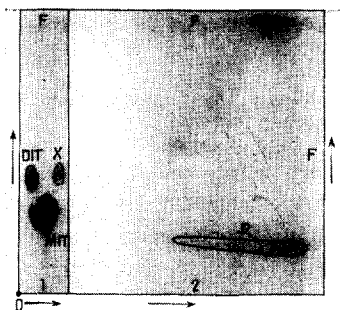


Fig. 3. Radioautochromatogramme bidimensionnel des constituants iodés marqués d'un hydrolysate protéinasique de corps thyroïde de jeunes rats en culture de plus de 25 jours, après 24 heures de contact à 37° C avec un liquide isotonique renfermant 20 μ C 131 I Na par 10 glandes (mêmes conditions d'obtention et de présentation que pour les documents reproduits dans la Fig. 2). DIT = 3:5-diiodotyrosine; X = inconnu; P = peptides; N = iodure d'azote.

IV. Action de l'antéhypophyse sur l'activité hormonogène du corps thyroïde *in vitro* (cultures et organes témoins)

Les expériences ont porté sur des cultures de 4 jours (méthode de WOLFF ET HAFEN), dans lesquelles le corps thyroïde a été associé à l'antéhypophyse. Plusieurs témoins ont été institués pour l'essai d'incubation en milieu isotonique renfermant 131 I Na (40 μ C dans 0.4 ml de liquide de Tyrode par 10 organes). Ils portaient sur l'activité hormonogène soit de glandes cultivées pendant 4 jours en l'absence d'hypophyse, soit de glandes fraîchement prélevées, associées ou non à celle-ci. Les Figs. 4, 5, 6 et 7 reproduisent des exemples caractéristiques de nos résultats.

Dans le cas des cultures (4 jours) réalisées sans antéhypophyse, le liquide d'incubation du corps thyroïde renferme MIT, des traces de DIT, 3:5:3'- T_3 et de l'iodure d'azote (NI_3 et $NI_3 \cdot NH_3$) (Fig. 4A). En présence d'organes cultivés avec antéhypophyse, MIT est associée à des quantités importantes de DIT, à 3:5:3'- T_3 et à 3:3':5'- T_3 ; celle-ci est alors présente à des taux assez élevés (Fig. 4B). Le tissu glandulaire ne renferme que MIT et DIT, mais en quantité beaucoup plus grande—surtout DIT—après culture en parabiose. La Fig. 5 est à cet égard d'autant plus caractéristique que l'autogramme B a été établi à partir d'un volume de liquide moitié moindre que celui mis en oeuvre pour obtenir l'autogramme A. L'activation *in vitro* de l'hormonogénèse thyroïdienne par l'antéhypophyse, comme il avait été établi *in vivo*^{9, 10, 11}, est donc manifeste dans le liquide d'incubation où se déverse la sécrétion glandulaire.

Pareille activation a également lieu avec des corps thyroïdes fraîchement prélevés, dont les liquides d'incubation contiennent, en dehors de MIT et de DIT et de traces de 3:5:3'- T_3 , des quantités assez importantes de 3:3':5'- T_3 lorsque la glande y a été associée à l'hypophyse des mêmes animaux (Fig. 6).

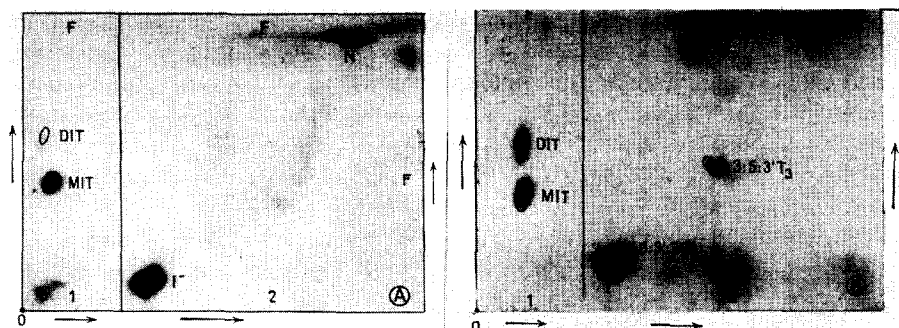


Fig. 4. Radioautochromatogrammes bidimensionnels des constituants iodés marqués du liquide d'incubation de corps thyroïde de jeunes rats (20 jours) mis en culture pendant 4 jours *en l'absence* (A) ou *en la présence* (B) du lobe antérieur de l'hypophyse des mêmes animaux (18 heures à 37° C avec du liquide de Tyrode renfermant 40 μ C ^{131}I Na par lot de 10 glandes). Partie 1 des clichés A et B: chromatographie bidimensionnelle en *n*-butanol saturé d' NH_4OH 2 N (de gauche à droite) et en *n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17) (de bas en haut). Partie 2 des clichés A et B: chromatographie bidimensionnelle en *n*-butanol saturé d' NH_4OH 2 N (de gauche à droite) et en alcool amylique tertiaire saturé d' NH_4OH 2 N (de bas en haut). I⁻ = iodures; MIT = 3-monoiodotyrosine; DIT = 3,5-diiodotyrosine; 3,5:3'-T₃ et 3:3':5'-T₃ = 3,5:3'- et 3:3':5'-triiodothyronine.

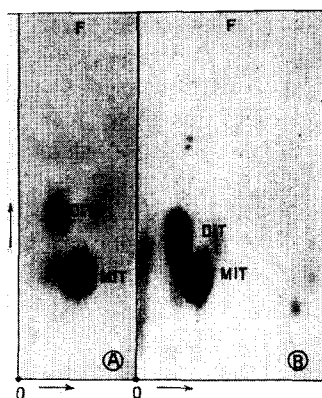


Fig. 5. Radioautochromatogrammes bidimensionnels partiels des constituants iodés marqués d'hydrolysats protéinasiqes totaux de corps thyroïde de jeunes rats mis en culture pendant 4 jours *en l'absence* (A) ou *en la présence* (B) du lobe antérieur de l'hypophyse des mêmes animaux. (Mêmes conditions d'obtention et de présentation que pour les documents reproduits sur la partie 1 de la Fig. 4.)

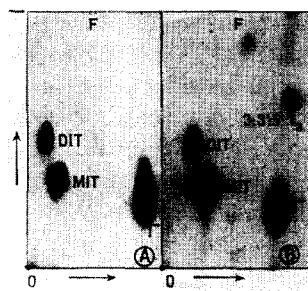


Fig. 6. Radioautochromatogrammes bidimensionnels partiels des constituants iodés marqués, du liquide d'incubation de corps thyroïdes fraîchement prélevés de jeunes rats (20 jours), placés pendant 18 heures à 37° C, *en l'absence* (A) ou *en la présence* (B) de l'hypophyse des mêmes animaux, dans du liquide de Tyrode renfermant 40 μ C ^{131}I Na par lot de 10 glandes. (Mêmes conditions d'obtention et de présentation que pour les documents reproduits sur la partie 1 de la Fig. 4.)

DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

La signification biologique et biochimique des faits observés mérite d'être discutée. Ils présentent un intérêt en ce qui concerne la valeur fonctionnelle des glandes en culture, l'élaboration des hormones et leur sécrétion.

La formation d'hormones thyroïdiennes par des glandes cultivées pendant 25 jours, puis incubées en présence d'iodures, est le critère de la conservation de leur fonction endocrinienne. Celle-ci se traduit à la fois par la concentration des iodures

et la formation d'iodotyrosines et d'iodothyronines et par la sélectivité relative de la sécrétion des secondes. Toutefois, la comparaison des résultats obtenus avec des organes cultivés ou non traduit une diminution sensible de l'intensité de la biosynthèse des hormones dans les premiers. Les essais réalisés en présence d'hypophyse ont tous été de courte durée (4 jours de culture); ils ont montré que la sensibilité du corps thyroïde aux produits d'origine pituitaire, probablement à l'hormone thyrotrope, demeure intense dans les conditions expérimentales adoptées.

Du point de vue biochimique, il y a lieu de signaler que des fragments de corps thyroïde mis en culture constituent un matériel d'étude excellent, très supérieur aux coupes, seules employées jusqu'ici, pour l'étude de la biosynthèse des hormones *in vitro*¹. Non seulement la glande totale concentre et métabolise activement les iodures, mais encore elle sécrète assez sélectivement les iodothyronines et conserve une grande sensibilité vis-à-vis de la sécrétion hypophysaire, lorsqu'elle est incubée en présence de la glande pituitaire ou du lobe antérieur de celle-ci. Les fragments de glande du jeune rat paraissent pouvoir constituer un réactif biologique pour étudier *in vitro* l'action de facteurs divers sur la biosynthèse des hormones thyroïdiennes.

Le mécanisme biochimique de celle-ci dans l'organe intact, préalablement mis en culture ou non, paraît relever du processus de condensation des iodotyrosines envisagé initialement par HARINGTON¹². Il est toutefois remarquable que les deux T_3 isomères se forment préférentiellement à T_4 dans des organes dont l'activité a été stimulée par la présence de l'antéhypophyse. $3:5:3'-T_3$ existe alors toujours en quantité relativement faible par rapport à $3:3':5'-T_3$, mais l'on peut se demander si une partie de cette dernière ne provient pas de l'ioduration en 5' de $3:3'-T_2$ qui se formerait initialement. De toute manière, une stimulation de la biosynthèse des hormones conduit à une orientation de celle-ci vers la formation des deux T_3 plutôt que vers celle de thyroxine. L'accélération de l'augmentation du taux de MIT et de DIT, et non la formation d'un excès de MIT, doit probablement être mise en cause alors, car on observe, paradoxalement semble-t-il, la présence de DIT en quantité très notablement supérieure dans les cas où T_3 prédomine sur T_4 .

Un bref commentaire de la différence de composition des dérivés iodés organiques existant dans les glandes et dans les liquides d'immersion mérite d'être fait. Les organes sont pratiquement dépourvus d'hormones et ne renferment que les précurseurs de celles-ci (MIT et DIT), à l'état de constituants protéiques libérables par hydrolyse protéinasique. Par contre, on trouve à l'état libre dans le liquide d'incubation des glandes, les hormones élaborées par celles-ci et, accessoirement, MIT, associée ou non à DIT. Or, *in vivo*, les premières seules sont sécrétées par le corps thyroïde¹³, en raison de la désioduration sélective des secondes^{14,15} après libération de tous les constituants iodés de la thyroglobuline par la catheptase thyroïdienne¹⁶. L'interprétation la plus simple des faits observés au cours de notre travail est qu'*in vitro* une partie des iodotyrosines échappe à la désioduration, probablement en raison de leur diffusion rapide dans le liquide où est immergé l'organe, tandis que, comme *in vivo*, la totalité des iodothyronines abandonne celui-ci aussitôt qu'elles sont libérées par la protéolyse. A cet égard, le passage quasi-immédiat des hormones de la glande au liquide d'immersion après leur formation mérite d'être relevé; il implique une protéolyse rapide de la thyroglobuline au fur et à mesure de leur biosynthèse au sein de cette protéine.

RÉSUMÉ

1. Le corps thyroïde de jeunes rats (20 jours après la naissance) cultivé pendant 25 jours *in vitro* conserve la propriété de réaliser la synthèse des hormones thyroïdiennes (iodothyronines), à partir d'un milieu isotonique renfermant des iodures marqués en présence duquel on le fait incuber (18-24 heures à 37°).

2. Le mécanisme de la synthèse des iodothyronines ne paraît pas modifié par la culture. La formation des hormones est toutefois plus intense dans les organes témoins, non cultivés, lesquels semblent constituer, comme les cultures, un excellent matériel pour étudier le métabolisme thyroïdien de l'iode.

3. La culture des glandes en présence d'antéhypophyse ou l'adjonction de celle-ci aux organes témoins stimule intensément la biosynthèse des hormones et de leurs précurseurs *in vitro*. Dans ces conditions, les deux triiodothyronines isomères (3:5:3'-T₃ et 3:3':5'-T₃) se forment préférentiellement à la thyroxine (T₄).

4. Les hormones thyroïdiennes prenant naissance dans des glandes, *in vitro*, cultivées ou non, sont retrouvées à peu près exclusivement dans le liquide iodé au sein duquel les organes ont été mis en incubation. Il est probable que, dans les conditions adoptées, la protéolyse de la thyroglobuline libère les iodothyronines très rapidement après leur formation et que celles-ci diffusent aussitôt.

SUMMARY

1. The thyroid gland of young rats (20 days old) cultured *in vitro* for 25 days retains the ability to synthesize thyroid hormones (iodothyronines) starting from an isotonic medium containing labelled iodides in the presence of which the gland is incubated (18-24 hours at 37° C).

2. The mechanism of synthesis of iodothyronines does not seem to be modified by the culture. The formation of hormones is nevertheless more intense in the non-cultured control organs, which seem to constitute, like the cultures, an excellent material for studying the thyroid metabolism of iodine.

3. The culture of glands in the presence of anterior pituitary gland or the addition of the latter to control organs stimulates intensely the biosynthesis of hormones and their precursors *in vitro*. Under these conditions the two triiodothyronine isomers (3:5:3'-T₃ and 3:3':5'-T₃) change preferentially to the thyroxine (T₄) form.

4. The thyroid hormones produced in the glands, *in vitro*, whether cultured or not, are recovered almost exclusively in the iodinated liquid in which the organs have been incubated. It is probable that, under the conditions used, the proteolysis of the thyroglobulin liberates the iodothyronines very rapidly after their formation and that these diffuse immediately.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. E. MORTON ET I. L. CHAIKOFF, *J. Biol. Chem.*, 147 (1943) 1.
- ² M. PAVLOVIC, *J. Endocrinol.*, 12 (1955) 227.
- ³ F. GONZALES, *Texas Repts. Biol. and Med.*, 12 (1954) 828.
- ⁴ P. N. MARTINOVIC, *Exptl. Cell Research*, 4 (1953) 490.
- ⁵ E. WOLFF ET K. HAFEN, *J. Exptl. Zool.*, 119 (1952) 381.
- ⁶ J. ROCHE, R. MICHEL, P. JOUAN ET W. WOLF, *Bull. soc. chim. biol.*, 37 (1955) 819.
- ⁷ R. J. BLOCK, E. L. DURRUM AND G. ZWEIG, *Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Vol. 1, Academic Press, Inc., New York, 1955.
- ⁸ C. H. BOWDEN ET N. F. MACLAGAN, *Biochem. J.*, 56 (1954) vii.
- ⁹ I. L. CHAIKOFF ET A. TAUROG, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 50 (1949) 377.
- ¹⁰ A. ALBERT, *ibid.*, 50 (1949) 466.
- ¹¹ R. W. RAWSON, *ibid.*, 50 (1949) 49.
- ¹² C. R. HARRINGTON, *J. Chem. Soc.*, (1944) 193.
- ¹³ A. TAUROG, J. D. WHEAT ET I. L. CHAIKOFF, *Endocrinology*, 58 (1956) 121.
- ¹⁴ J. ROCHE, R. MICHEL, O. MICHEL ET S. LISSITZKY, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 161.
- ¹⁵ J. ROCHE, O. MICHEL, R. MICHEL, A. GORBMAN ET S. LISSITZKY, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 570.
- ¹⁶ E. DE ROBERTIS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 50 (1949) 317.

Reçu le 20 décembre 1957