

**CONDITIONS DE FORMATION D'UNE COMBINAISON
PROTÉIQUE IODÉE ET TRITIÉE AU COURS DE
LA DÉSIODATION DES HORMONES THYROIDIENNES
DOUBLEMENT MARQUÉES (^{131}I ET ^3H)**

JEAN ROCHE, JACQUES NUNEZ ET CLAUDE JACQUEMIN

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

(Reçu le 10 juillet, 1962)

SUMMARY

Conditions for the formation of a iodinated and tritiated protein combination during the deiodination of doubly labelled (^{131}I and ^3H) thyroid hormones

1. Thyroid hormones doubly labeled in α - β position with ^3H and in 3',5' or 3' with ^{131}I ([$^{131}\text{I}, ^3\text{H}$]DL-thyroxine and [$^{131}\text{I}, ^3\text{H}$]3,5,3'-triiodo-DL-thyronine) can be deiodinated by mitochondria and several acellular preparations: salt extracts of slices and mitochondria, purified preparations of thyroxine deiodinase. The only labelled compounds produced under the adopted experimental conditions are ^{131}I - and a protein complex, PX, which contains both ^3H and ^{131}I . No tritium-labelled thyronine or tyrosine is formed. Since no ^3H loss occurs during the incubation there is no exchange between the tritium atoms of the iodothyronine and the hydrogen atoms of the medium, neither do any metabolic modifications occur in the alanine side chain during the process.

2. The ratio of the specific activities of the two isotopes in the chromatographic zones where residual DL-thyroxine or 3,5,3'-triiodo-DL-thyronine are located is identical to the blank after incubation with thyroxine deiodinase. However, this is not so in the other cases where a disagreement is observed in the rate of deiodination calculated from the measurements of ^{131}I and ^3H .

PX does always, at the end of the reaction, contain a fraction of the ^{131}I and the total ^3H provided for by the disappeared iodothyronine. The ^{131}I concentration of PX is not constant during the incubation period, but decreases when considered as a total and even in relationship to the concentration of ^3H . The ^{131}I deiodination of PX takes place in two steps which seems to indicate that the ^{131}I is present in the protein in two different forms.

3. All the used preparations lead to the same reaction products. Also, it seems that the mechanism of the deiodination is the same in the different cases. The deiodination of the thyroid hormones proceeds in two steps: (a) the fixation of the hormone to a protein, probably the enzyme, (b) the iodine is partially liberated from the complex which retains completely the organic skeleton of the iodothyronine. The formation of PX thus appears as a necessary step in the deiodination of the thyroid hormones.

INTRODUCTION

La désiodation des hormones thyroïdiennes T_4 et T_3 , marquées en α - β par 3H et en 3'-5' par ^{131}I , en présence de coupes et d'homogénats de tissus de rat conduit à la formation d'une combinaison protéique marquée par ^{131}I et 3H , renfermant le squelette organique de l'iodothyronine, et à de l'iodure^{1,2}. Cette combinaison ne cède pas de tritium aux solvants organiques, alors que son hydrolyse enzymatique ou barytique libère de la diiodotyrosine marquée par 3H , mais non par ^{131}I ; la fraction de celui-ci associée à la protéine apparaît alors à l'état d'iodure minéral. Nous avons cherché à préciser le mécanisme de la formation de la combinaison protéique iodée et tritiée prenant naissance au cours de la désiodation des hormones thyroïdiennes doublement marquées, que nous avons considérée comme un produit intermédiaire de la réaction.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Molécules marquées

Nous avons utilisé les hormones thyroïdiennes: T_4 , T_3 et T_2 , marquées en α - β par $^3H([^3H]T_4$, $[^3H]T_3$ et $[^3H]T_2$) d'une part et, d'autre part, T_4 et T_3 doublement marquées, en α - β par 3H et en 3'-5' par $^{131}I([^{131}I, ^3H]T_4)$ et en 3'($[^{131}I, ^3H]T_3$). La T_2 , marquée en α - β par $^3H([^3H]T_2)$, produit de départ pour l'obtention de T_3 et T_4 , a été préparée par action de l'acide iodhydrique tritié³ sur l'acide β (4'-méthoxy-3,5-diido-4-phénoxy)- α -benzamidocinnamique⁴. Sa pureté a été contrôlée par spectroscopie dans l'ultraviolet et par radiochromatographie sur papier; son activité spécifique était de 108 mC/mmol⁵. $[^{131}I, ^3H]T_4$ et $[^{131}I, ^3H]T_3$ ont été obtenues par iodation de $[^3H]T_2$ au moyen d'un mélange de $^{127}I_2$ et de $^{131}I_2$. Les corps ainsi préparés ont été purifiés par chromatographie sur papier et le rapport des activités spécifiques soigneusement déterminé. L'activité spécifique en 3H a été mesurée par scintillation liquide avant marquage par ^{131}I .

Préparation des systèmes de désiodation

Extrait de foie: Des coupes de foie ont été extraites par KCl 1.15% dans les conditions indiquées par MACLAGAN ET REID⁶ et PLASKETT⁷, mais avec des concentrations en tissu plus élevées, telles que les résultats obtenus puissent être comparés à ceux des autres systèmes utilisés: 0.4, 0.6 et 0.8 ml d'extrait correspondent respectivement à 150, 225 et 300 mg de tissu frais.

Mitochondries et extrait de mitochondries traitées par KCl à 1.15%: Une fraction de mitochondries a été préparée à partir d'homogénat de foie de rat par la méthode de SCHNEIDER⁸. Les mitochondries non lavées obtenues ont été reprises dans un volume de liquide de KREBS-RINGER bicarbonaté tel qu'on utilise les particules de 150 ou 300 mg de foie pour chaque essai (volume total du milieu d'incubation: 0.5 ou 1 ml). La fraction mitochondriale a été également extraite par KCl 1.15% pendant 30 min à 0° avec élimination des mitochondries par centrifugation à 5000 × g pendant 10 min; on a utilisé pour chaque essai l'extrait correspondant à 150 ou 300 mg de foie.

Thyroxine-désiodase: Chaque essai contient 0.8 mg de préparation enzymatique⁹

Abréviations: T_4 , DL-thyroxine; T_3 , 3,5,3'-triiodo-DL-thyronine; T_2 , 3,5-diiodothyronine; DIT, diiodotyrosine.

dans 1 ml de liquide de KREBS-RINGER bicarbonaté* (activité spécifique rapportée à l'homogénat = 80).

Conditions d'incubation et d'analyse

Les diverses préparations ont été incubées en présence de [^{131}I , ^3H]T₄ ou de [^{131}I , ^3H]T₃ à concentration finale $5 \cdot 10^{-5}$ M. L'hormone a été introduite en solution dans le propane 1,2-diol à 50% (0.05 ml) et l'on a ajouté dans certains essais une solution de FMN dans le liquide de KREBS-RINGER (concentration finale $5 \cdot 10^{-5}$ M), dans un volume total de 1 ml. La réaction a été suivie à 37° dans un appareil de Warburg (agitation 80 rév./min) et sous illumination; des parties aliquotes de la solution (50 µl) ont été prélevées à des temps divers et analysées par chromatographie sur papier en prenant comme solvants les mélanges: *n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17) et *n*-butanol saturé d' NH_4OH 2 N. La radioactivité de ^{131}I a été mesurée avec un compteur Geiger-Müller sur un appareil automatique et celle de ^3H déterminée en scintillation liquide¹⁰. Les rendements des compteurs ont été établis avec précision et l'on a pu ainsi obtenir des rapports d'activités spécifiques (α) pour chaque section du chromatogramme ou pour la totalité de celui-ci en valeur relative (coups/min) ou en valeur absolue (désintégrations/min), en tenant compte dans chaque cas de la décroissance de la radioactivité de ^{131}I . Nous avons établi ainsi le rapport $\alpha = ^{131}\text{I}/^3\text{H}$ pour le chromatogramme total d'un témoin de l'iodothyronine étudiée, α -témoins de T₄ ou T₃ et α -total de chaque essai. Les rapports: $^{131}\text{I}/^3\text{H}$ de la zone correspondant au corps de $R_F = 0$ et à la zone de T₄ ou T₃ non consommée ont été respectivement désignés par α -PX, α -T₄ et α -T₃. I⁻/I- ^3H X traduit le partage de ^{131}I entre les iodures et le corps de $R_F = 0$ et % [^3H]PX/% [^{131}I]PX le pourcentage de ^3H retenu dans le corps de $R_F = 0$ rapporté à celui de ^{131}I présent dans ce même composé.

RÉSULTATS

Désiodation par les mitochondries de foie de rat

Le système désiodant, localisé principalement dans les mitochondries, n'y est en concurrence qu'avec l'enzyme responsable de la formation de dérivés acétiques; l'addition de FMN favorise alors la désiodation aux dépens de l'oxydation de la chaîne¹¹.

Nous avons étudié successivement la désiodation de [^{131}I , ^3H]T₄ et de [^{131}I , ^3H]T₃ par des quantités croissantes de mitochondries. La Fig. 1a illustre la disparition de T₄ et la formation de ses produits de dégradation mesurées au moyen de ^{131}I , la Fig. 1b les mêmes processus mesurés au moyen d' ^3H dans un essai contenant les mitochondries de 150 mg de foie de rat. Des résultats analogues ont été obtenus en présence de mitochondries de 300 mg de tissus. L'examen de ces figures montre que T₄ donne naissance à de l'iodure minéral ($^{131}\text{I}^-$) et à une combinaison protéique (PX) marquée à la fois par ^{131}I et ^3H . Dans les deux cas, on observe que, pour les différents temps d'incubation, les pourcentages de T₄ disparue diffèrent selon qu'ils sont calculés en se basant sur les mesures de ^3H ou sur celles de ^{131}I . L'incubation de [^{131}I , ^3H]T₃ en présence de mitochondries de 150 mg de foie conduit à des résultats analogues (Fig. 2a et 2b). Cette discordance pourrait être interprétée par une perte de ^3H .

* Cette préparation de thyroxine-désiodase nous a été adressée par M. S. LISSITZKY (Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille), que nous remercions vivement.

Cependant, la valeur d' α -total dans un essai d'incubation de T_4 au temps 120 min ($\alpha = 24.6$) et celle du témoin ($\alpha = 27.0$) diffèrent peu. Il ne semble donc pas se produire de perte globale de ^3H et l'évolution des valeurs d' α pour PX et T_4 résiduelle sur les chromatogrammes ne peut être interprétée que si la zone correspondant à T_4 contient un mélange alternativement plus ou moins riche en iodé que le témoin. Les résultats obtenus avec $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]T_3$ sont du même ordre.

Dans le cas de T_4 , PX contient 1/5 à 1/7 de ^{131}I du témoin T_4 . La quantité d'iodure minéral libéré augmente proportionnellement plus vite que la teneur en iodé de PX (Fig. 3).

Le taux de désiodation est proportionnel à la quantité de mitochondries mise en oeuvre et cela pour une même concentration de FMN (Fig. 4). Par contre, la désiodation augmente pour une même quantité de FMN quand on ajoute Fe^{2+} ; dans ce cas, α -PX est plus élevé que dans le témoin incubé en présence des seuls FMN ou Fe^{2+} . Nous avons, en outre, confirmé qu'EDTA, les thyronines 10^{-3} M (T_3 ou son

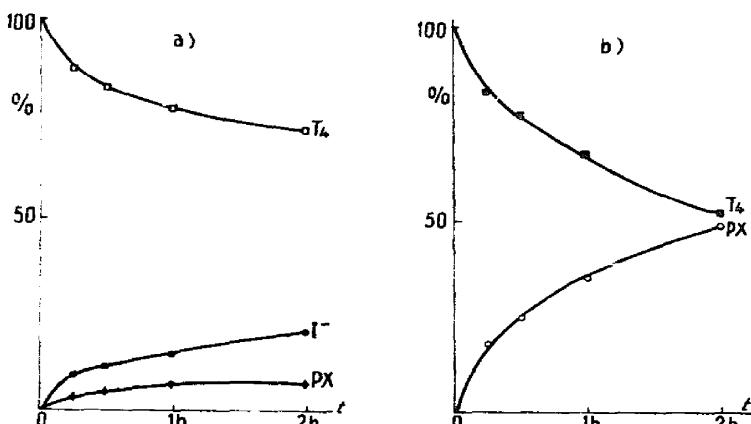


Fig. 1. Cinétique de désiodation de $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]T_4$ par les mitochondries de 150 mg de foie: a, ^{131}I ; b, ^3H .

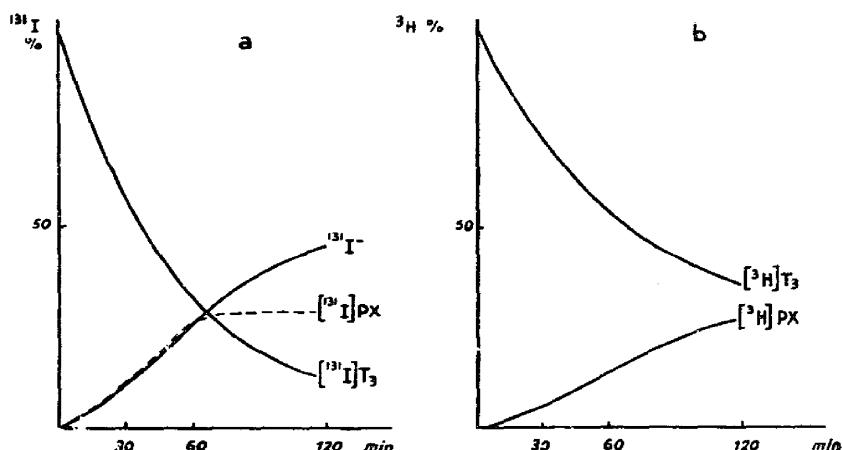


Fig. 2. Cinétique de désiodation de $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]T_3$ par les mitochondries de 150 mg de foie: a, ^{131}I ; b, ^3H .

isomère, la 3,3',5'-triodothyronine, par exemple), les métabolites (SO_3^{2-} , cystéine, propylthiouracile 10^{-3} M) inhibent la désiodation et constaté que la teneur en ^{131}I de PX n'est pas modifiée identiquement par ces divers agents.

Désiodation de $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]T_4$ par l'extrait de mitochondries par KCl

Les cinétiques de désiodation ont été établies comparativement pour les mitochondries intactes, l'extrait de celles-ci traitées par KCl 1.15%, et le culot résiduel de cette extraction. Dans les trois cas, les incubations ont été réalisées en présence de FMN $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ en utilisant chaque fois un volume de système désiodant correspondant à un même poids de tissus frais (150 ou 300 mg pour un volume final de 0.5 ou 1 ml).

La Fig. 5 reproduit les cinétiques de désiodation ($[^{131}\text{I}]$) respectivement pour le système mitochondries, extrait de mitochondries par KCl et le culot. Les produits de la réaction sont toujours l'iodure et le matériel de $R_F = 0$ marqué par ^{131}I . La somme des taux de désiodation pour l'extrait de mitochondries par KCl et le culot

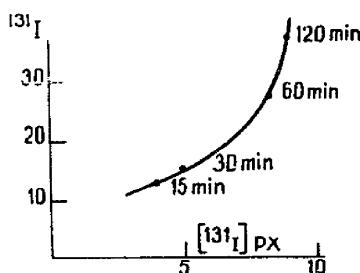


Fig. 3. Evolution en fonction du temps (15, 30, 60, 120 min) de la répartition de ^{131}I entre l'iodure ($^{131}\text{I}^-$) et PX($[^{131}\text{I}]PX$) au cours de l'incubation de $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]T_4$ avec les mitochondries de 150 mg de foie.

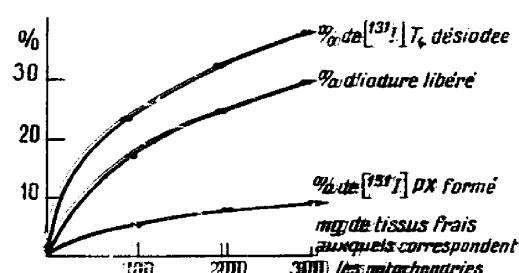


Fig. 4. Relation entre désiodation et quantité de mitochondries.

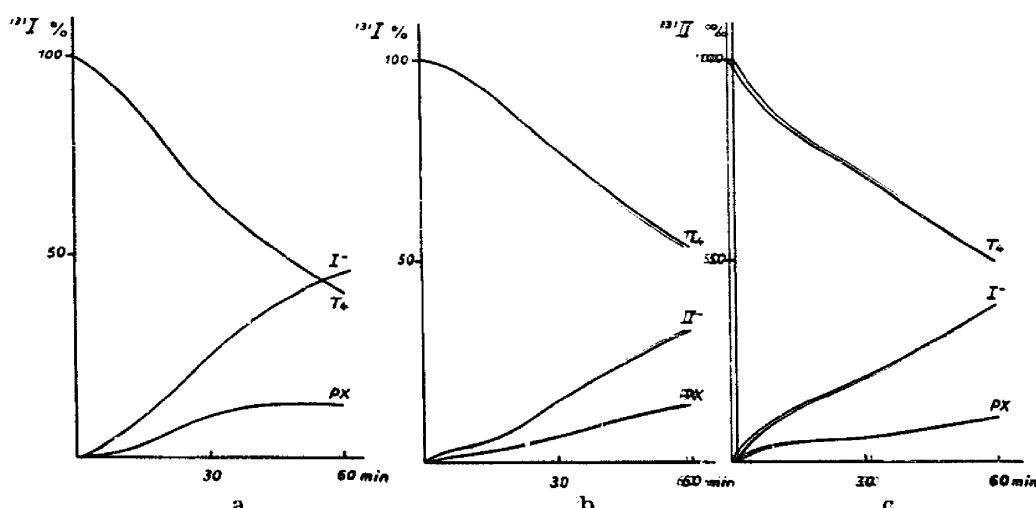


Fig. 5. Cinétiques de désiodation de $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]T_4$ par (a) les mitochondries de 150 mg de foie, (b) l'extrait par KCl 1.15 % d'une même préparation de mitochondries, (c) par le culot de centrifugation de l'extrait (b).

résiduel sont supérieurs au témoin mitochondries. Le Tableau I reproduit les résultats obtenus (mesures de ^{131}I et de ^3H à 60 min): la désiodation est importante dans les deux cas; il ne semble pas y avoir de perte de ^3H car α -total est toujours peu différent de 4. PX contient quatre fois moins de ^{131}I que T_4 . Le pourcentage des iodures formés est 3.5 à 4 fois plus élevé que celui de PX.

TABLEAU I

TAUX DES DIVERS PRODUITS DE LA RÉACTION,
RAPPORTS $^{131}\text{I}/^3\text{H}$ DES CHROMATOGRAMMES (α -TOTAL) ET DE PX (α -PX)
ET RAPPORT DE ^{131}I RETROUVÉ DANS LES IODURES/ ^{131}I RETROUVÉ DANS PX (I/I-PX)

Mesures au temps 60 min de l'incubation de $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]\text{T}_4$ en présence de l'extrait (M-KCl) par KCl 1.15 % de mitochondries (M) de foie de rat.

Préparation	% I^-	% $I-\text{PX}$	% $/^3\text{H}]\text{PX}$	Total: $I^- + I-\text{PX}$	α -Total	α -PX	I/I-PX
M	53.6	13.4	57.2	67	4	0.95	4.0
M-KCl	35	9.9	41	45	4.1	0.99	3.5

Désiodation de $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]\text{T}_4$ par l'extrait de foie par KCl

La cinétique de désiodation a été étudiée dans six essais, trois en la présence, trois en l'absence de FMN $5 \cdot 10^{-5}$ M. Chaque série correspond aux extraits de 150–225 et 300 mg de tissu pour un volume final de 1 ml. La Fig. 6 reproduit les cinétiques de désiodation par l'extrait de 225 mg de foie (a) en la présence et (b) en l'absence de FMN. Les produits de la réaction sont exclusivement le corps de $R_F = 0$ et l'iodure. Les résultats des autres essais sont analogues, FMN n'augmentant pas le taux de désiodation. Le Tableau II indique le taux des divers produits de la réaction après 60 min d'incubation (calculés en ^{131}I et ^3H) et les rapports α -total, α -PX et $I^-/\text{I-PX}$.

Ces résultats peuvent être interprétés de la manière suivante: (a) la cinétique de la réaction est beaucoup plus régulière qu'avec les coupes et les homogénats^{1,2}.

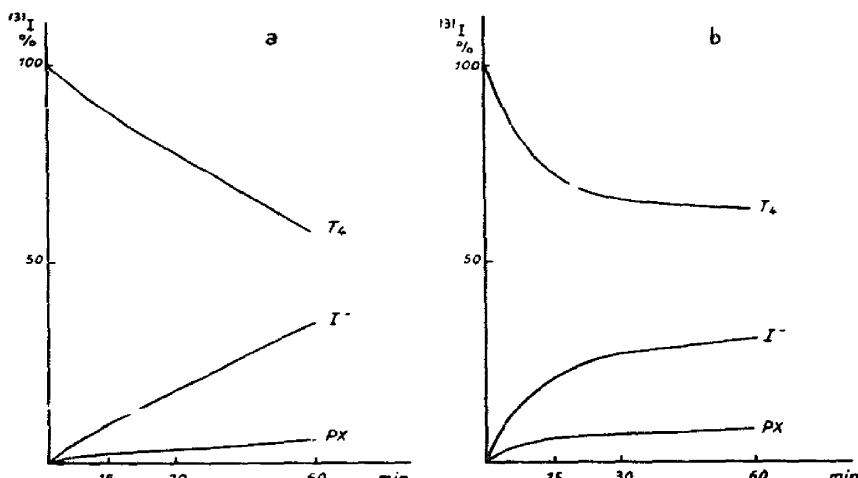


Fig. 6. Cinétique de désiodation de $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]\text{T}_4$ par un extrait par KCl 1.15 % de coupes de foie: (a) en la présence de FMN $5 \cdot 10^{-5}$ M; (b) en l'absence de ce cofacteur.

TABLEAU II

TAUX DES DIVERS PRODUITS DE LA RÉACTION ET RAPPORTS $^{131}\text{I}/^3\text{H}$
 $(\alpha\text{-T}_4$ NON CONSUMMÉ, $\alpha\text{-PX}$ ET $\alpha\text{-TOTAL}$) APRÈS INCUBATION PENDANT 60 MIN
DE $[^{131}\text{I},^3\text{H}]\text{T}_4$ EN PRÉSENCE D'UN EXTRAIT DE FOIE DE RAT PAR KCl 1.15 %

Le rapport α -total du témoin T_4 est égal à 3.7-3.8.

No. de l'essai et conditions expérimentales	% I	% I-PX	% I- + I-PX	% $^3\text{H}/\text{PX}$	α -Total	α -PX	I- / I-PX
1. Extrait de 0.50 mg de coupes + FMN	23.3	4.6	27.9	18.2	3.92	1.0	5.2
2. Extrait de 225 mg de coupes + FMN	32.3	6.1	38.4	25.2	3.72	0.8	5.3
3. Extrait de 300 mg de coupes + FMN	19.3	3.3	22.6	9.9	3.92	1.3	5.8
4. Extrait de 0.50 mg de coupes sans FMN	24.0	7.2	31.2	26.5	3.34	0.9	3.4
5. Extrait de 225 mg de coupes sans FMN	26.6	6.7	33.3	22.4	3.68	1.1	3.9
6. Extrait de 300 mg de coupes sans FMN	25.9	6.3	32.2	29.2	3.61	0.8	4.1

(b) Il n'y a pas de perte de ^3H au cours de l'incubation, car α -total est en moyenne de 3.8 en présence de FMN et de 3.5 sans ce cofacteur, et la valeur moyenne d' $\alpha\text{-T}_4$ est de 3.7. (c) Le rapport I- / I-PX est plus élevé en la présence de FMN (5.4) qu'en son absence (3.8). FMN semble donc favoriser la désiodation de PX, bien que les taux globaux de désiodation ne soient pas sensiblement affectés avec l'extrait de foie par KCl. (d) Les rapports α -PX sont peu différents pour les divers essais; ils témoignent du fait que PX contient 1/3 à 1/5 de ^{131}I de T_4 initiale. (e) Les taux de désiodation calculés en ^{131}I sont supérieurs à ceux calculés en ^3H . Or α -total des essais est constant et identique à celui du témoin; il n'y a donc pas de perte de ^3H . On peut interpréter ce fait par la présence sur les chromatogrammes, au niveau de T_4 , d'une molécule moins iodée que celle-ci.

Désiodation du $[^{131}\text{I},^3\text{H}]\text{T}_4$ et de $[^{131}\text{I},^3\text{H}]\text{T}_3$ par la thyroxine-désiodase purifiée

Les meilleurs d'incubation de $[^{131}\text{I},^3\text{H}]\text{T}_4$ et de $[^{131}\text{I},^3\text{H}]\text{T}_3$ avec la thyroxine-désiodase, en présence de FMN $5 \cdot 10^{-5}$ M, ont été analysés à des temps différents (0, 15, 30, 60, 90, 120 min). Les radiochromatogrammes établis simultanément à partir des mesures de ^{131}I et de ^3H montrent que les seuls produits de la réaction qui s'accumulent dans le milieu sont $^{131}\text{I}^-$ et le matériel de $R_F = 0$ (PX) marqué à la fois par les deux isotopes (Figs. 7 et 8). Il n'est forme aucun des métabolites, rencontrés parfois avec des systèmes moins purifiés, tels que la thyonine, la tyrosine et les acides iodothyroacétiques. Si l'on calcule pour chaque temps d'incubation les taux respectifs des constituants du mélange, on peut établir les courbes cinétiques de la désiodation (Figs. 9 et 10). L'examen de ces courbes montre que les quantités de T_4 et T_3 désiodées sont les mêmes, qu'elles soient évaluées à partir des mesures de ^{131}I ou de ^3H . Il en découle que PX renferme la totalité des produits de la désiodation des deux iodothyronines —ou un produit unique de même origine—et que ceux-ci contiennent encore une partie de ^{131}I ; l'autre, plus importante, se retrouve dans le milieu sous forme d'iodure. Cette correspondance des pourcentages d'iodothyronine résiduelle établis en ^{131}I et

^3H élimine l'éventualité d'une perte de ^3H au cours de l'action de la thyroxine-désiodase. Nous l'avons vérifié en établissant qu' α -total du témoin et celui de l'essai, après 120 min d'incubation, sont identiques (α -total = 1.35). α - T_4 de T_4 résiduelle, après le même temps d'incubation, est égal à 1.25, ce qui pourrait correspondre à une perte de ^{131}I , donc à la formation d'une iodothyronine moins iodée que T_4 ; l'écart observé n'excède cependant pas 7%, valeur comprise dans la marge des erreurs expérimentales.

Cet ensemble de résultats: concordance des taux de désiodation, des rapports de radioactivité de ^{131}I et ^3H , pour divers éléments de mesure, par rapport au témoin, montre d'une manière absolue que les seuls produits de la réaction sont ceux séparés sur les chromatogrammes.

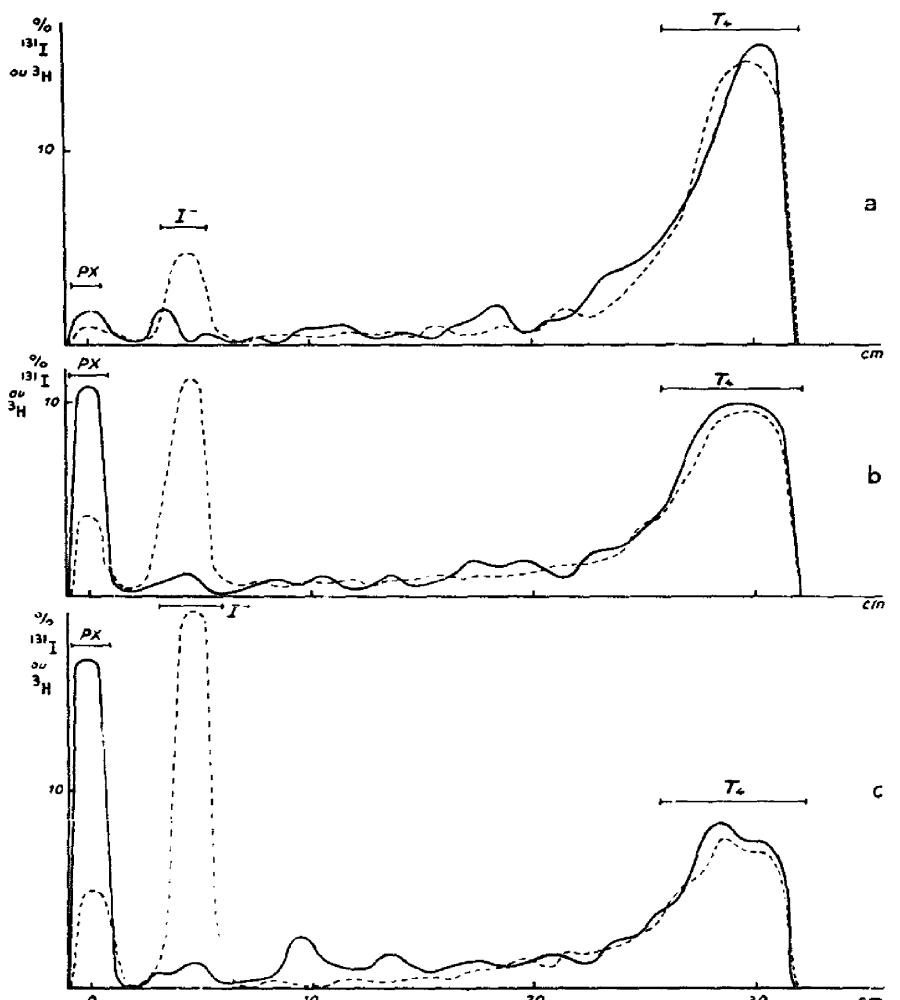


Fig. 7. Radiochromatogrammes (solvant: *n*-butanol - acide acétique - eau (76:5:17)) du milieu d'incubation de $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]T_4$ en présence de thyroxine-désiodase. Prélèvements après: a, 0 min; b, 60 min; c, 120 min d'incubation.

En ce qui concerne PX, la répartition de ^{131}I entre l'iodure et I-PX diffère selon que les taux sont établis à partir de chromatogrammes en *n*-butanol-acide acétique-eau ou en *n*-butanol saturé de 2 N NH_4OH ; ce fait peut témoigner de la présence, dans PX, de ^{131}I dont une partie est liée d'une manière relativement labile et qui donne aisément naissance à de l'iodure. Cette remarque est en accord avec certaines observations d'autres auteurs^{12,13}. Le fait que PX peut s'appauvrir en ^{131}I est confirmé par l'évolution d' α -PX en fonction du temps d'incubation. Pour une valeur d' α -témoign = 1 pour T_4 et 0.5 pour T_3 , α -PX diminue régulièrement au cours de l'incubation (Fig. 11). Les variations du rapport $[^3\text{H}]$ PX/I-PX aux divers temps de l'incubation montrent par ailleurs que PX contient un pourcentage de ^{131}I de plus en plus faible (Fig. 12).

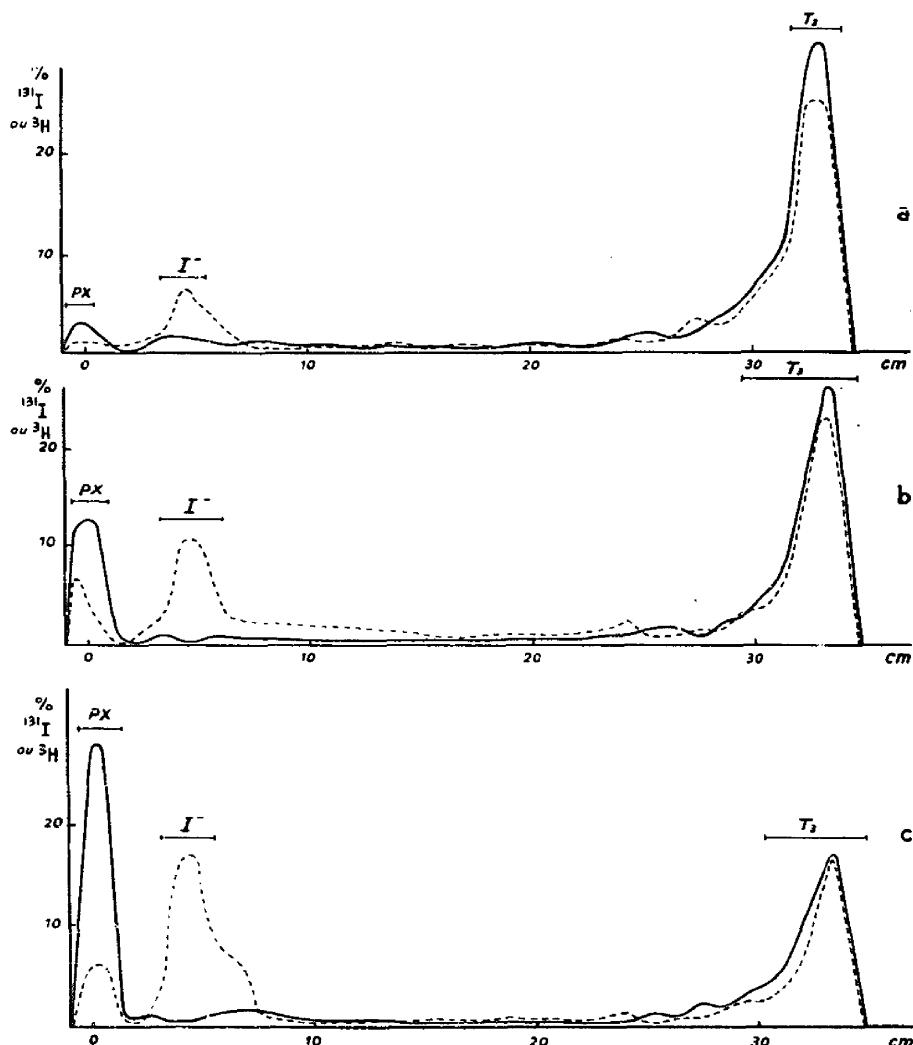


Fig. 8. Radiochromatogrammes (solvant: *n*-butanol - acide acétique - eau (78:5:17)) du milieu d'incubation de $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]T_3$ en présence de thyroxine-désiodase. Prélèvements après: a, 0 min; b, 60 min; c, 120 min d'incubation.

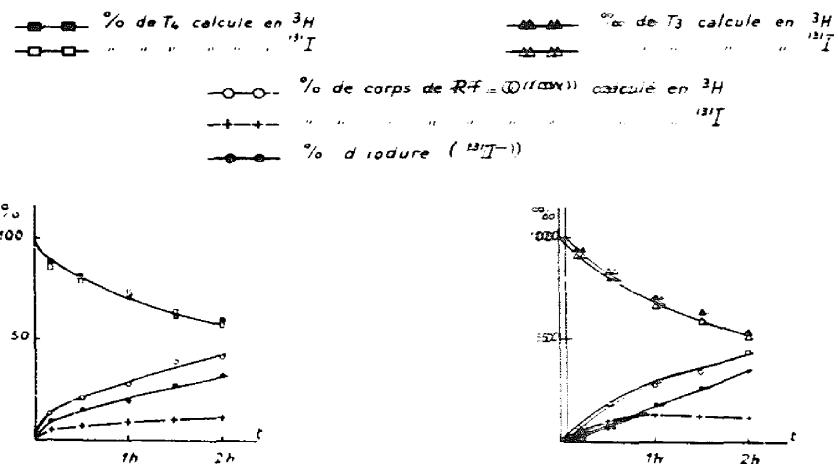


Fig. 9. Cinétique de désiodation de $^{131}\text{I}, ^3\text{H}-\text{T}_4$ par la thyroxine-désiodase.

Fig. 10. Cinétique de désiodation de $^{131}\text{I}, ^3\text{H}-\text{T}_3$ par la thyroxine-désiodase.

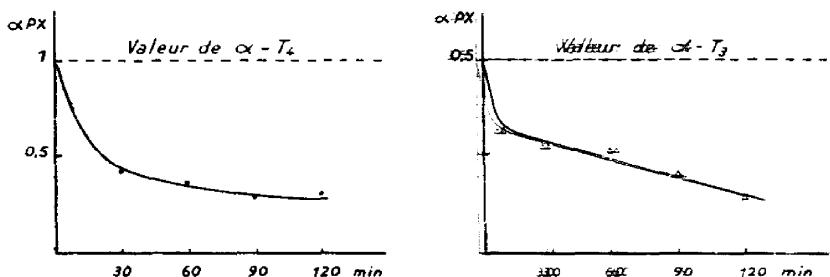


Fig. 11. Evolution d' α -PX, formé au cours de l'incubation, en présence de thyroxine-désiodase, calculé en prenant $\alpha-\text{T}_4 = 0$ et $\alpha-\text{T}_3 = 0,5$.

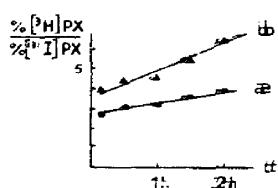


Fig. 12. Evolution du rapport $\% [^3\text{H}] \text{PX}/\% [^{131}\text{I}] \text{PX}$ formé au cours de l'incubation en présence de thyroxine-désiodase: a, de $^{131}\text{I}, ^3\text{H}-\text{T}_4$; b, de $^{131}\text{I}, ^3\text{H}-\text{T}_3$.

DISCUSSION

L'étude comparée de la désiodation de $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}-\text{T}_4]$ et de $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}-\text{T}_3]$ par diverses préparations acellulaires a permis de constater que les produits de la réaction sont toujours l'iodure minéral et un corps iodé et tritié (PX). Il ne se forme ni thyronine, ni tyrosine, ni les dérivés acétiques de celles-ci ou des hormones, comme en présence de coupes ou d'homogénats de tissus^{1,2}.

PX produit en présence des mitochondries contient 1/5 à 1/7 de ^{131}I de T_4 . PX de T_3 , au contraire, contient dans les temps courts de l'incubation plus de ^{131}I que l'iodothyronine incubée marquée en 3' par celui-ci. Dans tous les cas, cependant, en fin d'incubation, le taux de $^{131}\text{I}^-$ libéré est proportionnellement plus élevé que celui de $[^{131}\text{I}]$ PX.

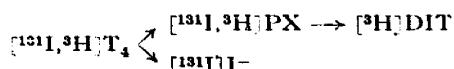
PX est le seul produit tritié de la réaction, aucune perte de ^3H n'ayant lieu au cours de celle-ci.

L'addition de Fe^{2+} au milieu contenant $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]$ T_4 , FMN et une suspension de mitochondries augmente le taux de désiodation; dans ce cas, α -PX est plus élevé que pour le témoin correspondant à une incubation en présence de FMN ou Fe^{2+} seuls. Cependant, le taux de désiodation est différent selon qu'il est calculé à partir de mesures de ^{131}I ou de ^3H . Cette différence ne peut être interprétée que si l'on admet que les zones renfermant T_4 ou T_3 résiduelles et PX sur les chromatogrammes ne sont pas homogènes, c'est-à-dire contiennent divers constituants dont les teneurs respectives en ^{131}I et ^3H sont différentes. Cette hypothèse semble confirmée par l'évolution d' α - T_3 au cours de l'incubation (Tableau I).

L'action des extraits des mitochondries ou des coupes par KCl 1.15% conduit à des résultats analogues: PX contient alors 4 fois moins d'iode que T_4 utilisée et il se forme 4 fois plus d' I^- que d' $\text{I}-\text{PX}$. L'extrait de foie par KCl désiode T_4 sans qu'il soit nécessaire d'ajouter FMN: on peut supposer que celui-ci est extrait en même temps que l'enzyme, à moins que le cofacteur de ce système ne soit pas FMN; cette hypothèse est peu vraisemblable, car les produits de la réaction sont identiques dans tous les cas.

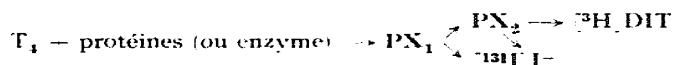
L'action de la thyroxine-désiodase sur des substrats marqués simultanément par ^{131}I et ^3H conduit à la formation du même complexe, PX, lequel renferme la totalité de ^3H et 60 à 30 % de ^{131}I de l'iodothyronine disparue. Il ne se forme alors pas de dérivés acétiques et l'on n'observe aucune perte de ^3H . Contrairement à ce que l'on observe avec des préparations de mitochondries, les taux de désiodation sont identiques, qu'ils soient calculés à partir des mesures de ^{131}I ou de ^3H , et α - T_4 est constant et identique pour le témoin non incubé et pour les essais. PX semble contenir ^{131}I sous deux formes, dont l'une est plus labile que l'autre, toutes deux donnant naissance à des iodures au cours de l'incubation. Nous pouvons conclure que divers systèmes acellulaires (particules, extraits et préparation enzymatique) désiodent les hormones thyroïdiennes selon un mécanisme, sinon identique, du moins analogue, sans qu'on puisse affirmer avec certitude qu'il existe dans les tissus un seul système enzymatique de désiodation, car les résultats ne sont facilement interprétables qu'avec la thyroxine-désiodase.

Compte tenu des résultats obtenus antérieurement en présence de coupes et d'homogénats^{1,2}, nous avons proposé le schéma réactionnel suivant:



A la lumière des nouvelles expériences, poursuivies avec des systèmes solubles, il nous semble nécessaire d'apporter à celui-ci quelques modifications: la désiodation des hormones thyroïdiennes procède en deux temps; après fixation de l'hormone à un matériel protéique, vraisemblablement l'enzyme, le complexe formé libère

pantiellement l'iode et retient la totalité du squelette organique de l'iodothyronine. Le mécanisme de la désiodation apparaît alors, en première analyse, comme étant le suivant:



La formation de PX (PX_1 et PX_2) semble donc être une étape obligatoire du mécanisme de la désiodation. Des expériences complémentaires sur la nature des molécules qui en ferment ^{131}I et ^3H dans PX et sur le mécanisme d'action du cofacteur FMN sur $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]T_4$, seront exposées ultérieurement. Toutefois, nos observations sont en contradiction avec l'hypothèse de la transiodation^{14, 15} car PX ne contient pas uniquement ^{131}I , mais surtout ^3H . Nous avons en outre remarqué qu'en présence de coupes et d'homogénats^{1, 2} le taux de formation de thyronine est réduit (0-10%); avec les extraits solubles et les préparations enzymatiques, son absence est constante. Ces données soulignent la contradiction entre nos résultats et ceux d'autres auteurs^{12, 15, 16} et rendent vraisemblable le mécanisme biochimique de la désiodation que nous avons proposé.

RÉSUMÉ

1. La désiodation des hormones thyroïdiennes doublement marquées en α - β par ^3H et en 3'-5' ou en 3' par ^{131}I ($[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]T_4$ et $[^{131}\text{I}, ^3\text{H}]T_3$) a été réalisée par des mitochondries et par divers systèmes acellulaires: extraits salins de coupes et de mitochondries, préparations purifiées de thyroxine-désiodase. Dans les conditions expérimentales adoptées, les seuls produits marqués de la désiodation sont $^{131}\text{I}^-$ et une combinaison protéique, PX, contenant ^3H et ^{131}I ; il ne se forme ni thyronine, ni thyrosine tritierées. Aucune perte de ^3H n'a lieu au cours de l'incubation; il n'y a donc ni échange entre les atomes de ^3H de l'iodothyronine et le milieu, ni modifications métaboliques de la chaîne alanine.

2. Le rapport des activités spécifiques entre les deux isotopes dans la zone des chromatogrammes où sont localisées T_4 ou T_3 résiduelles est identique à celui du témoin au cours d'une incubation avec la thyroxine-désiodase. Il n'en est pas de même dans les autres cas, ce qui se traduit par la non-concordance des taux de désiodation calculés d'après les mesures de ^{131}I ou de ^3H .

PX contient dans tous les cas, à la fin de la réaction, une fraction de ^{131}I et la totalité de ^3H de l'iodothyronine disparue. La teneur de PX en ^{131}I n'est pas constante en fonction du temps d'incubation; elle diminue en valeur absolue et, plus encore, par rapport à sa teneur en ^3H . ^{131}I contenu dans PX est libéré en deux temps, ce qui permet de penser qu'il y est présent sous deux formes différentes.

3. L'ensemble des préparations utilisées conduit aux mêmes produits réactionnels. Le mécanisme de la désiodation semble donc analogue dans ces différents cas. La désiodation des hormones thyroïdiennes se déroule en deux temps: l'hormone est fixée à du matériel protéique, probablement l'enzyme; le complexe formé libère partiellement l'iode et retient la totalité du squelette organique de l'iodothyronine. La formation de PX semble donc être une étape obligatoire de la désiodation des hormones thyroïdiennes.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. NUNEZ ET CL. JACQUEMIN, *Compt. rend.*, 252 (1961) 802.
- ² J. ROCHE, J. NUNEZ ET CL. JACQUEMIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 64 (1962) 475.
- ³ J. NUNEZ ET CL. JACQUEMIN, *Compt. rend.*, 249 (1959) 132.
- ⁴ C. R. HARRINGTON ET G. BARGER, *Biochem. J.*, 21 (1927) 169.
- ⁵ J. NUNEZ, CL. JACQUEMIN ET J. ROCHE, *Intern. J. Appl. Radiation and Isotopes*, sous presse.
- ⁶ N. F. MACLAGAN ET D. REID, *Ciba Foundation Colloq. on Endocrinol.*, 10 (1956) 190.
- ⁷ L. G. PLASKETT, *Biochem. J.*, 78 (1961) 652.
- ⁸ W. C. SCHNEIDER ET V. R. POTTER, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 893.
- ⁹ S. LISSITZKY, M. ROQUES ET M. T. BENEVENT, *Bull. soc. chim. biol.*, 43 (1961) 727.
- ¹⁰ J. NUNEZ ET CL. JACQUEMIN, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 271.
- ¹¹ K. YAMAMOTO, S. SHIMIZU ET I. ISHIKAWA, *Japan. J. Physiol.*, 10 (1960) 594.
- ¹² S. LISSITZKY, M. T. BENEVENT ET M. ROQUES, *Bull. soc. chim. biol.*, 43 (1961) 743.
- ¹³ V. A. GALTON ET S. H. INGBAR, *Endocrinology*, 70 (1962) 210.
- ¹⁴ J. R. TATA, *Nature*, 187 (1960) 1025.
- ¹⁵ J. R. TATA, *Biochem. J.*, 77 (1960) 214.
- ¹⁶ V. A. GALTON ET S. H. INGBAR, *Endocrinology*, 69 (1961) 30.

Biochim. Biophys. Acta, 69 (1963) 271-283

BBA 3904

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF α -CRYSTALLIN FROM OX LENS*, **

SALIL K. NIYOGI AND VIRGIL L. KOENIG

Department of Biochemistry, Northwestern University Medical School,
Chicago, Ill. (U.S.A.)

(Received June 22nd, 1962)

SUMMARY

α -Crystallin was isolated from ox lenses and purified by repeated precipitation at its isoelectric point. Electrophoretic analyses in acid and alkaline solutions at various ionic strengths indicate α -crystallin to be a single component. Sedimentation studies above pH 3.0 at various ionic strengths also indicate that α -crystallin is a single component. At pH 3.0 and below, depending upon the ionic strength, two or three components appear during sedimentation. Sedimentation and viscosity studies suggest that this dissociation is reversible. Sedimentation, viscosity, and light-scattering data at pH 2.0 at various ionic strengths indicate an unfolding of the protein molecule ultimately leading to dissociation. Sedimentation and light-scattering data at pH 9.1 at six ionic strengths (0.1-0.6) indicate nearly a two-fold aggregation of the protein at the higher ionic strengths, possibly accompanied by a change in the shape of the molecule. Molecular weights and dimensions have been calculated from sedimentation, viscosity, and partial-specific-volume data obtained at pH 9.1 and at six ionic strengths.

* The data presented in this paper are taken from a dissertation submitted by S. K. Niyogi to the Faculty of Northwestern University in partial fulfillment for the degree, Doctor of Philosophy, in 1961.

** Requests for reprints should be addressed to Dr. V. L. KOENIG, J. F. Bell Research Center, General Mills, Inc., 9000 Plymouth Avenue North, Minneapolis 27, Minn. (U.S.A.).