

- ⁸ B. HAGIHARA, H. MATSUBARA, M. NAKAI AND K. OKUNUKI, *J. Biochem. Tokyo*, 45 (1958) 185.
⁹ H. FUWA, *J. Biochem. Tokyo*, 41 (1954) 583.
¹⁰ K. HAMAGUCHI, K. ROKKAKU, M. FUNATSU AND K. HAYASHI, *J. Biochem. Tokyo*, 48 (1960) 351.
¹¹ J. R. KIMMEL AND E. L. SMITH, *J. Biol. Chem.*, 207 (1954) 515.
¹² K. MORIHARA, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 21 (1957) 11.
¹³ S. AKABORI, T. IKENAKA AND B. HAGIHARA, *J. Biochem. Tokyo*, 41 (1954) 577.

Received May 1st, 1962

Revised manuscript received November 13th, 1962.

Biochim. Biophys. Acta, 71 (1963) 239-241

PN 1221

Sur la biosynthèse *in vitro* des hormones thyroïdiennes à partir de la L-tyrosine tritiée

La 3,5-diiodo-L-tyrosine et la 3-iodoiodo-L-tyrosine, considérées comme précurseurs des hormones thyroïdiennes, prennent naissance par iodation de la tyrosine et l'on admet, selon une hypothèse d'HARINGTON¹ généralisée par ROCHE *et al.*², que les iodothyronines sont biosynthétisées par condensation de deux molécules d'iodotyrosine avec perte d'une chaîne d'alanine. Divers arguments expérimentaux, pour la plupart indirects, ont déjà été fournis en faveur de cette hypothèse; néanmoins il nous a paru utile de vérifier si la tyrosine fixée par la glande au cours de la biosynthèse de la thyroglobuline est bien le précurseur du squelette carboné des iodothyronines; nous y sommes parvenus grâce à l'emploi de tyrosine tritiée en position $\alpha\beta$, d'activité spécifique élevée (86 mC/mmole)³.

A. *Conditions d'incubation permettant l'hormonogénèse in vitro.* La formation de thyroxine *in vivo* ne se manifeste que 6 h environ après l'injection d'¹³¹I-. Elle a été rarement signalée *in vitro*; les incubations de coupes de glande n'ont été en général poursuivies que pendant quelques heures et les critères d'identification de thyroxine employés n'ont pas toujours été rigoureux. Les recherches poursuivies *in vivo* avec ¹³¹I sont facilitées par la concentration thyroïdienne des iodures, mais tel ne peut être le cas pour la tyrosine, laquelle est fixée par l'ensemble des tissus après son injection. On ne pouvait donc escompter de résultats satisfaisants qu'*in vitro*, dans la mesure où la survie de coupes serait assurée pendant un temps assez long. Nous y sommes parvenus en incubant 100 mg de coupes sous O₂ à 37° pendant 24 h dans 3 ml d'un milieu nutritif approprié⁴ additionné soit d'¹³¹I- soit d'³H]tyrosine. QO₂ (10 essais par série de mesures) demeure constant pendant toute la durée de l'incubation.

B. *Incorporation d'¹³¹I et d'³H]tyrosine dans la thyroglobuline: identification des iodothyronines formées.* Les coupes et le milieu d'incubation sont analysés soit séparément, soit après homogénéisation et isolement des particules cellulaires (mitochondries-microsomes, surnageant) par centrifugation différentielle (700 × g pendant 2 min, puis 105 000 × g pendant 1 h). Les liquides obtenus sont analysés à l'état brut ou après dialyse, par chromatographie sur papier (solvants: *n*-butanol-acide acétique-eau (8:5:17) et (8:2:2), amyloïd tertiaire saturé de NH₄OH 2 N) et électrophorèse sur papier (véronal pH 8.6, 18 h). Il a été ainsi établi qu'¹³¹I- et ³H]tyrosine sont fixés par les coupes et partiellement incorporés dans la thyroglobuline de celles-ci et qu'il se forme également d'autres protéines iodées et tritiées, de mobilité électro-

phorétique nulle dans les conditions adoptées. Les liquides d'incubation ont été hydrolysés soit par un mélange de trypsine cristallisée et d'enzymes pancréatiques totaux (pancréatine) à pH 8.6 et pendant 48–72 h, soit par la baryte à 4 % agissant à 100° en tube scellé pendant 6–18 h. L'autoradiographie et la radiochromatographie ont permis de constater les faits suivants:

(1) L'hydrolyse enzymatique étant très souvent incomplète, la présence de nombreux peptides iodés rend alors aléatoire l'identification directe de thyroxine. Cependant, en fractionnant un hydrolysate aussi total que possible, on peut identifier sans ambiguïté [^{131}I]thyroxine à côté de corps inconnus et confirmer^{5,6} la présence d'un composé inconnu de R_F élevé marqué par ^{131}I .

Les peptides tritiés obtenus après incubation en présence de [^3H]tyrosine et hydrolyse enzymatique sont plus nombreux que ceux marqués par ^{131}I , ce qui s'explique par la faible teneur de la thyroglobuline en acides aminés iodés (15 résidus environ) par rapport au nombre de résidus de tyrosine (110 résidus) qu'elle renferme.

(2) L'hydrolyse barytique désiode les acides aminés iodés (3-iodo-L-tyrosine et 3,5-diiodo-L-tyrosine en tyrosine, les iodothyronines en thyronine) partiellement en 6 h⁷ et totalement en 18 h. Ce fait constitue un inconvénient majeur lorsque l'isotope utilisé est ^{131}I , mais, si l'incubation des coupes a été réalisée en présence d' [^3H]tyrosine, la désiodation chimique des iodothyronines éventuellement formées doit conduire à la thyronine tritiée [^3H]thyronine. Or, comme la thyroglobuline ne renferme pas de thyronine, celle que l'on identifie dans les hydrolysats barytiques provient donc des iodothyronines biosynthétisées, puis désiodées au cours du traitement alcalin.

Les hydrolysats barytiques ont été extraits par le *n*-butanol acide et les extraits analysés et fractionnés par chromatographie mono- et bidimensionnelle. Les chromatogrammes se sont révélés renfermer [^3H]thyronine provenant des iodothyronines formées à partir d' [^3H]tyrosine. On a constaté également la présence dans l'hydrolysate barytique non fractionné d'un corps inconnu migrant en front des chromatogrammes et qui contient ^{131}I et ^3H .

Il ressort de nos résultats que: (1) La thyroglobuline marquée par ^{131}I et ^3H est synthétisée au cours d'incubations prolongées de coupes de thyroïde en présence de ^{131}I et [^3H]tyrosine. Une autre protéine iodée et tritiée se forme dans les coupes de glande. (2) [^{131}I]Thyroxine est synthétisée dans les conditions d'incubation utilisées. (3) Une partie au moins du squelette carboné (cycle A) des thyronines formées provient de [^3H]tyrosine. (4) Le corps inconnu iodé (^{131}I) déjà signalé par divers auteurs^{5,6} qui migre en front des chromatogrammes contient [^3H]tyrosine ou l'un de ses dérivés.

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

JACQUES NUNEZ
JEAN MAUCHAMP
JEAN ROCHE

¹ C. R. HARRINGTON, *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B.*, 132 (1944) 223.

² J. ROCHE, R. MICHEL, W. WOLF ET J. NUNEZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 308.

³ J. NUNEZ ET C. JACQUEMIN, *Compt. Rend.*, 249 (1959) 138.

⁴ R. N. CAMPAGNE ET M. GRUBER, *Biochim. Biophys. Acta*, 55 (1962) 353.

⁵ A. TAUROG, W. TONG ET I. L. CHAIKOFF, *J. Biol. Chem.*, 227 (1957) 759.

⁶ M. SUSUKI, H. NAGASHIMA ET K. YAMAMOTO, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1 (1961) 103.

⁷ S. LISSITZKY, *Thèse de Doctorat*, Paris, 1952.

Reçu le 18 Décembre, 1962