

BBA 66751

SPECIFICITE DE L'IODOTYROSINE DESIODASE DES MICROSOMES THYROÏDIENS ET HEPATIQUES

PAUL DUMAS*, BERNARD MAZIERE, NICOLE AUTISSIER ET RAYMOND MICHEL

Laboratoires de Biochimie Cellulaire I.B.A.N.A., 21-Dijon et Pierre Süe, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Saclay, 91-Gif-sur-Yvette (France)

(Reçu le 5 juin, 1972)

SUMMARY

Specificity of thyroidal and hepatic microsomal iodotyrosine deiodinase

The deiodinating activity of thyroid and liver microsomes was studied with 19 compounds including 3-iodo-L-tyrosine and 3:5-diiodo-L-tyrosine and their analogs. While L-iodotyrosines were almost completely dehalogenated, D-iodotyrosines, α -methyl-DL-iodotyrosines and 3:5-diiodo-4-hydroxyphenyl-DL-lactic acid were poor substrates for the deiodinase. All the other compounds tested remained unchanged including 3:5-diiodo-4-hydroxyphenyl- α -guanidyl propionic acid, 3:5-diiodo-4-hydroxyphenyl propionic acid and 3:5-diiodotyramine. The phenol group played a major role since 3-iodo-5-nitro-L-tyrosine and 3-iodo-L-phenylalanine were not decomposed. In conclusion, thyroid and liver deiodinase are highly specific enzymes. It appears probable that the enzymatic site requires the carboxyl, amino and phenol groups of the substrate to exert its activity.

INTRODUCTION

Les iodotyrosines sont deshalogénées par la plupart des tissus selon un processus enzymatique; en effet, les préparations thyroïdiennes et à un degré moindre, celles de foie, rein, intestin provoquent la dégradation de la 3:5-diiodo-L-tyrosine en L-tyrosine et iodures avec formation de 3-iodo-L-tyrosine comme intermédiaire¹⁻⁵. Le caractère enzymatique de la réaction est bien établi et l'existence d'une désiodase spécifique active sur les iodotyrosines et inactive sur les iodothyronines, ne semble plus faire de doute⁶⁻⁹. L'enzyme est localisé dans les microsomes, les mitochondries et les noyaux en sont pratiquement dépourvus. Cependant l'activité microsomale ne semble se manifester qu'après addition de NADPH ou de surnageant cellulaire^{10,11}.

On a montré que l'enzyme est thermolabile, contrairement à l'iodothyronine désiodase, et que les flavoadénines nucléotides (FAD et FMN) le stimulent en présence

* Cet article fait partie d'un travail destiné à une thèse es sciences qui sera soutenue par Paul Dumas devant l'Université de Dijon.

de NADPH^{12,13}. Un traitement préalable des animaux par la thyrotropine ou le propylthiouracile augmente la deshalogénéation des iodotyrosines par le tissu thyroïdien mais n'affecte pas les préparations hépatiques^{14,15}. La désiodase est fortement inhibée par les effecteurs des groupements sulphydriles, par un excès de substrat, par les nitro ou bromotyrosines, par la ménadione et par tous les accepteurs d'électrons susceptibles d'intervenir dans l'oxydation du NADPH¹⁶⁻²¹. L'anaérobiose, les formateurs de complexe, certains métaux comme Cu^{2+} ou Fe^{3+} sont sans effet^{2,10,11}. Le fait que la désiodase soit localisée dans les microsomes thyroïdiens, hépatiques ou rénaux et qu'elle nécessite la présence de NADPH comme activateur, permet de supposer qu'il s'agit soit d'un même enzyme, soit d'un enzyme différent mais doté de propriétés voisines. Quelques essais de purification n'ont pas encore permis de résoudre ce problème^{13,22}.

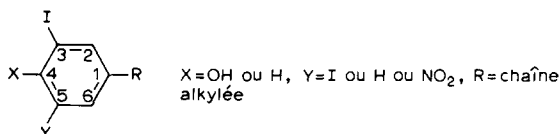
Les propriétés de la désiodase sont relativement bien connues; par contre les données sur sa spécificité sont peu nombreuses. L'enzyme thyroïdien qui provoque la deshalogénéation des bromotyrosines, est inactif sur la 3:5-diiodo-D-tyrosine ainsi que sur les iodo et bromothyronines^{6-8,25,26}. La thyroglobuline ou les peptides contenant des résidus d'iodotyrosine ne sont pas deshalogénés à moins de subir une hydrolyse préalable²³⁻²⁵.

Notre travail a pour but l'étude de la spécificité de la désiodase en utilisant comme matériel enzymatique des microsomes thyroïdiens ou hépatiques que l'on fait agir sur plusieurs analogues structuraux des iodotyrosines dont la chaîne alanine latérale est plus ou moins modifiée.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Nature des composés iodés

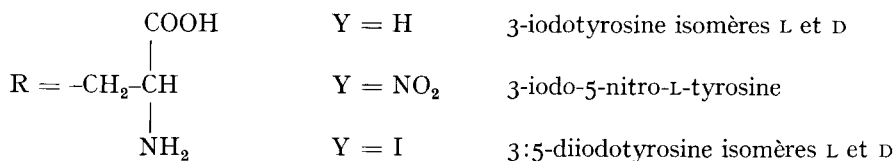
Les produits iodés utilisés répondent à la formule générale:

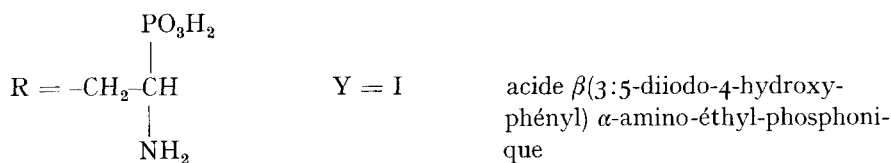
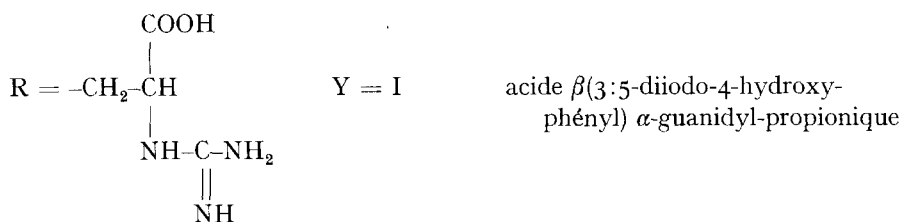
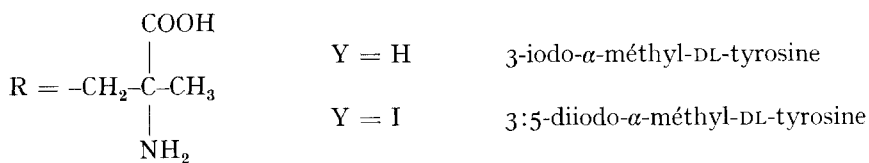


On peut les classer en quatre groupes chimiques se distinguant par la nature de leur chaîne latérale.

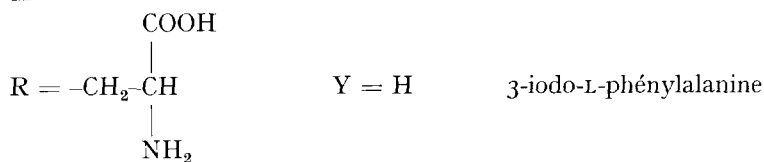
(I) Acides aminés

$\text{X} = \text{OH}$

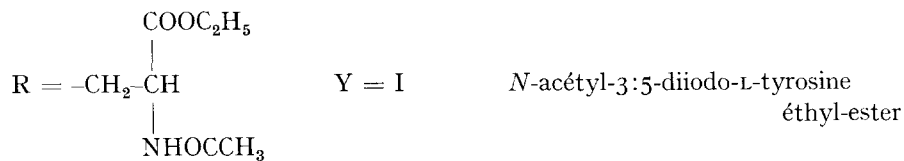




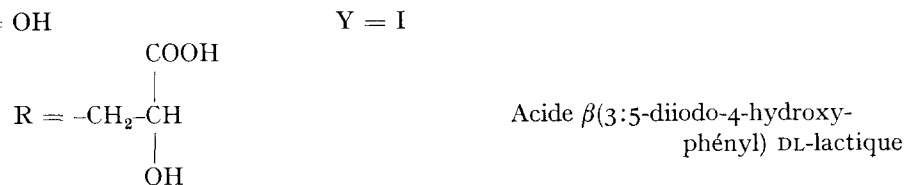
X = H

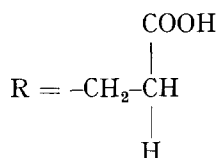
*(2) Amide ester*

X = OH

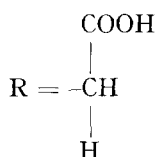
*(3) Acides*

X = OH





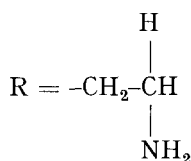
Acide β (3:5-diiodo-4-hydroxy-phényl) propionique



Acide α (3:5-diiodo-4-hydroxy-phényl) acétique

(4) Amines

X = OH

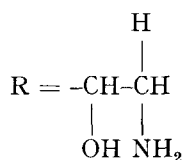


Y = H

β (3-iodo-4-hydroxyphényl) éthylamine ou 3-iodotyramine

Y = I

β (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) éthylamine ou 3:5-diiodotyramine

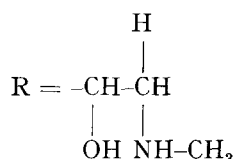


Y = H

β (3-iodo-4-hydroxyphényl) β -hydroxyéthylamine ou 3-iodonor-synéphrine

Y = I

β (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) β -hydroxyéthylamine ou 3:5-di-iodonorsynéphrine



Y = I

β (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) β -hydroxy-*N*-méthyléthylamine ou 3:5-diiodosynéphrine

La 3-iodo-L-phénylalanine nous a été fournie par le Professeur R. E. Counsell, du laboratoire de Chimie Médicale de l'Université du Michigan (U.S.A.) que nous tenons à remercier. Les autres composés ont été synthétisés au laboratoire.

Préparation des substrats marqués par ^{131}I

Les dérivés phénoliques iodés marqués par ^{131}I sont préparés, à l'exception de la 3-iodo-5-nitro-L-tyrosine par halogénéation en milieu ammoniacal des dérivés phénoliques correspondants selon les conditions antérieures²⁶.

L'iodation de la 5-nitro-L-tyrosine est réalisée en milieu acétique par ICl marqué, selon une technique inspirée de celle utilisée pour l'iodation de la tyrosine²⁷. On prélève 10 mCi d'une solution de Na^{131}I (traceur sans réducteur, pH = 9, C.E.A.)

qu'on évapore jusqu'à siccité. Le résidu est repris par 10 μ l de H_2SO_4 1.5 M. On ajoute 20 μ l d'une solution éthanolique d'iode 2 mM puis 0.2 ml d'une solution acétique d'ICl 12 mM. Après échange, la solution radioactive est additionnée par petites fractions, à 0.2 ml d'une solution acétique de 5-nitro-L-tyrosine 10 mM. On laisse reposer 30 min. Les opérations sont conduites en bain de glace.

Dans tous les cas, les produits marqués sont séparés par chromatographie descendante sur papier Whatman 1 MM en solvant *n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17, par vol.) ou *n*-butanol saturé par NH_4OH 2 M. L'activité spécifique des produits obtenus après élution est environ 200 à 400 $\mu Ci/\mu mole$. Les Tableaux I et II

TABLEAU I

R_F CHROMATOGRAPHIQUES DES DÉRIVÉS IODÉS ET DE LEUR PRÉCURSEUR

Chromatographie descendante sur papier Whatman 1 MM en milieu *n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17, par vol.). Le R_F de l'iodure est 0.29.

Nature et R_F du précurseur	R_F des dérivés iodés		
	3-Iodo	3:5-Diiodo	
Tyrosine	0.26	0.55	0.66
α -Méthyl-tyrosine	0.50	0.72	0.83
5-Nitro-tyrosine	0.33	0.45	—
Acide β (4-hydroxyphényl) α -guanidyl-propionique	0.41	—	0.80
Acide β (4-hydroxyphényl) α -amino-éthylphosphonique	0.31	—	0.62
Acide α (4-hydroxyphényl) acétique	0.91	—	0.94
Acide β (4-hydroxyphényl) propionique	0.89	—	0.93
Acide β (4-hydroxyphényl) lactique	0.77	—	0.91
Tyramine	0.48	0.76	0.82
Norsynéphrine	0.36	0.64	0.78
Synéphrine	0.44	—	0.81
<i>N</i> -Acétyl-tyrosine éthyl-ester	0.89	—	0.93
Phénylalanine	0.65	0.60	—

TABLEAU II

R_F CHROMATOGRAPHIQUES DE QUELQUES DÉRIVÉS IODÉS ET DE LEUR PRÉCURSEUR

Chromatographie descendante sur papier Whatman 1 MM en milieu *n*-butanol saturé par NH_4OH 2 M. Le R_F de l'iodure est 0.22.

Nature et R_F du précurseur	R_F des dérivés iodés		
	3-Iodo	3:5-Diiodo	
Tyrosine	0.09	0.11	0.04
Acide α (4-hydroxyphényl) acétique	0.18	0.06	0.08
Acide β (4-hydroxyphényl) propionique	0.26	0.10	0.15
Acide β (4-hydroxyphényl) lactique	0.15	0.04	0.07
Phénylalanine	0.25	0.47	—

rassemblent les R_F chromatographiques des composés iodés et de leurs précurseurs respectivement en milieu acétique et en milieu ammoniacal. Le premier milieu se prête bien à la séparation de la plupart des produits iodés à l'exception de dérivés halogénés acides qui se séparent mieux dans le second.

La pureté des substrats radioactifs est contrôlée par chromatographie sur papier dans deux solvants et par électrophorèse en tampon volatil. Les produits stables correspondants, dont la teneur en iode est satisfaisante, sont utilisés comme témoins marginaux.

Préparation du matériel biologique

Les préparations microsomales sont obtenues à partir de thyroïdes et de foies prélevés, d'une part sur des moutons et, d'autre part sur des rats mâles de souche Wistar pesant de 200 à 300 g.

Les microsomes thyroïdiens et hépatiques de mouton ainsi que ceux provenant de foie de rat sont isolés à partir d'homogénats dans le saccharose 0.25 M, centrifugés successivement à $800 \times g$ et $12\,000 \times g$ pendant 10 min puis à $100\,000 \times g$ pendant 60 min. Le dernier culot, correspondant aux microsomes, est repris par du saccharose 0.25 M de telle sorte que la concentration en protéines soit environ de 20 mg/ml pour les suspensions hépatiques (soit 1.3 g de tissu frais) et 10 mg/ml pour la suspension thyroïdienne (soit 0.4 g de glande). La contamination mitochondriale, estimée par dosage de la cytochrome oxydase, est inférieure à 3%.

Les préparations thyroïdiennes de rat sont obtenues selon une méthode simplifiée. Les glandes de 30 rats sont homogénéisées dans le saccharose 0.25 M. Après centrifugation à $12\,000 \times g$ pendant 10 min, le culot est éliminé. Le surnageant renferme les microsomes et les extraits acellulaires solubles ainsi que la thyroglobuline. Il a une teneur en protéines de l'ordre de 20 mg/ml dont 80% au moins proviennent de la protéine iodée.

Mesure de l'activité enzymatique

L'étude de l'activité enzymatique de l'iodotyrosine désiodase est réalisée de la manière suivante: on ajoute, à 0.5 ml de la suspension microsomale, 0.2 ml d'une solution faiblement alcaline de produits iodés 10 à 150 μM pour une radioactivité de l'ordre de 0.5 à 5 μCi dans la prise d'essai, puis 0.5 ml de NADPH 0.1 mM; on complète ensuite à 2 ml avec une solution tampon de Krebs-Ringer phosphatée (pH = 7.2). La réaction enzymatique est conduite à 37 °C pendant 60 min sous agitation. Elle est arrêtée par addition de 0.1 ml d'une solution 2 mM d'iodotyrosine stable puis on congèle à -20 °C. Un témoin est préparé avec le même composé radioactif en présence de microsomes préalablement chauffés au bain-marie bouillant pendant 5 min. Un prélèvement au temps zéro est effectué.

Après incubation, les produits iodés marqués sont séparés par électrophorèse ou chromatographie. L'électrophorèse est conduite sur papier Whatman 3 MM, pendant 3 h en tampon acétate d'ammonium 0.2 M (pH = 7), 4 V·cm⁻¹ et 0.8 mA·cm⁻¹ ou en tampon carbonate d'ammonium 0.2 M (pH = 7.5), 4 V·cm⁻¹ et 0.8 mA·cm⁻¹. Les séparations chromatographiques sont réalisées par voie descendante sur papier Whatman 1 MM en milieu *n*-butanol saturé par NH₄OH 2 M ou en milieu *n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17, par vol.). Le solvant acétique permet une meilleure résolution des produits iodés mais présente l'inconvénient de provoquer des pertes d'iodure. Les concentrations respectives des composés organiques halogénés et des iodures formés sont calculées après enregistrement des radioélectrophorégrammes et des radiochromatogrammes (Scanner Packard).

Au cours d'essais préliminaires nous avons suivi la cinétique de désiodation de

la 3:5-diiodo-L-tyrosine $7\text{ }\mu\text{M}$ par des microsomes thyroïdiens de mouton. L'analyse du milieu réactionnel, effectuée par chromatographie descendante en milieu *n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17, par vol.), montre que 60% environ de l'iode organique est passé sous forme d'iodure après 60 min d'incubation avec formation de 3-iodo-L-tyrosine comme intermédiaire. Au delà, la vitesse de la réaction enzymatique diminue de façon notable, aussi avons-nous choisi pour toutes les expériences, une concentration d'iodotyrosine comprise entre 1 et $15\text{ }\mu\text{M}$ et un temps d'incubation de 60 min.

L'effet des microsomes thyroïdiens de mouton sur la 3-iodo-L-phénylalanine, seul composé stable utilisé, est déterminé après analyse par activation neutronique des produits de la réaction enzymatique. On ajoute, à 0.5 ml d'une solution aqueuse de 3-iodo-L-phénylalanine $320\text{ }\mu\text{M}$, 1 ml de suspension microsomale dont le taux en protéines est environ 30 mg/ml, puis 0.1 ml de NADPH 1 mM. On complète à 2.5 ml par du tampon Tris-acétate 0.2 M (pH = 7.2). Après une incubation à 37 °C pendant 60 min sous agitation continue, la réaction est arrêtée par congélation. Un essai de référence est conduit avec la 3-iodo-L-tyrosine à la même concentration. Deux témoins sont réalisés simultanément avec deux échantillons de la solution de chaque composé, l'un contenant le produit pur, l'autre, additionné de microsomes préalablement inactivés par chauffage.

Des parties aliquotes des milieux réactionnels sont chromatographiées par voie descendante sur papier Whatman 1 MM en milieu *n*-butanol saturé par NH_4OH 2 M ou *n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17, par vol.). Les chromatogrammes, découpés en rectangles de 3 cm \times 2 cm, sont introduits séparément dans des ampoules de polyéthylène et irradiés simultanément avec des étalons de KI contenant 0.4 μg d'iode en solution déposée sur un rectangle de même papier. Un blanc, préparé à partir d'une même surface de papier est traité dans des conditions semblables. L'irradiation est conduite dans le réacteur EL 3 de Saclay dans un flux de neutrons thermiques de $7.10^{12}\text{ n}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pendant 20 min. Immédiatement après irradiation, le spectre γ des échantillons et des étalons est enregistré en opérant la soustraction automatique de la composante due au support papier à l'aide d'un scintillateur NaI 4 inches \times 4 inches à puits relié à un sélecteur d'amplitude 400 canaux. La quantité d'iode présente dans l'échantillon est déduite de la surface obtenue en intégrant le pic γ à 441 keV de ^{128}I formé par réaction (*n*- γ) sur ^{127}I stable. Dans un second temps, un échantillon contenant de l'iode, ainsi que le témoin sont de nouveau soumis à une irradiation de 20 min. Le spectre de leur radioactivité γ est enregistré ensuite pendant des temps variant de 1 à 5 min à l'aide d'un détecteur au Ge (Li) de 50 cm³, ayant pour le ^{60}Co une résolution de 2.5 keV, relié à un sélecteur 4000 canaux. Ces déterminations ont montré que le support papier imprégné de tampon renferme environ $3.3\cdot 10^{-3}\text{ }\mu\text{g}$ d'iode par cm². Les résultats trouvés à l'aide de cette seconde technique ne diffèrent pas de ceux obtenus à l'aide du scintillateur NaI.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les effets des préparations microsomales sur les divers analogues structuraux des iodotyrosines sont traduits par des tableaux qui comportent la concentration en iode apparu, après 60 min d'incubation à 37 °C et à pH 7.2, à partir d'une concentration donnée de dérivé halogéné. Le substrat de référence est la 3:5-diiodo-L-tyrosine ou la 3-iodo-L-tyrosine selon qu'il s'agit de dérivés di- ou mono-iodophénoliques

TABLEAU III

INFLUENCE DES MICROSOMES THYROÏDIENS ET HÉPATIQUES DE MOUTON SUR DIVERS DÉRIVÉS 3:5-DIIODOPHÉNOLIQUES

La 3:5-diiodo-L-tyrosine, à la même concentration que le produit à essayer, est utilisée comme témoin. Les iodures apparus sont dosés après 60 min d'incubation.

<i>Produit essayé</i>			<i>Témoin</i>
<i>Dénomination</i>	<i>Concentration (μM)</i>	<i>I⁻ apparus (μM)</i>	<i>I⁻ apparus (μM)</i>
<i>Microsomes thyroïdiens</i>			
3:5-Diiodo-D-tyrosine	2.3	0.20 \pm 0.04	3.00 \pm 0.60
3:5-Diiodo- α -méthyl-DL-tyrosine	6.7	1.30 \pm 0.25	7.00 \pm 1.40
Acide β (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) α -guanidyl-propionique	6.3	0.03 \pm 0.02	4.10 \pm 0.80
Acide β (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) α -amino-éthylphosphonique	3.0	0.02 \pm 0.01	3.00 \pm 0.60
N-Acétyle-3:5-diiodo-L-tyrosine éthyl-ester	2.9	0.02 \pm 0.01	2.00 \pm 0.40
Acide β (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) DL-lactique	6.9	0.65 \pm 0.10	7.10 \pm 1.40
Acide β (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) propionique	3.5	0.02 \pm 0.01	2.10 \pm 0.40
Acide α (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) acétique	7.4	0.04 \pm 0.02	4.10 \pm 0.80
3:5-Diiodotyramine	2.5	0.02 \pm 0.01	2.90 \pm 0.50
3:5-Diiodonorsynéphrine	14.3	0.09 \pm 0.05	9.70 \pm 1.70
3:5-Diiodosynéphrine	13.0	0.09 \pm 0.05	9.70 \pm 1.80
<i>Microsomes hépatiques</i>			
3:5-Diiodo-D-tyrosine	2.0	0.25 \pm 0.05	1.20 \pm 0.20
3:5-Diiodo- α -méthyl-DL-tyrosine	2.0	0.15 \pm 0.03	1.20 \pm 0.20
Acide β (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) DL-lactique	2.0	0.10 \pm 0.02	1.60 \pm 0.40
Acide β (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) propionique	2.0	0.03 \pm 0.02	1.60 \pm 0.40
Acide α (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) acétique	2.0	0.03 \pm 0.02	1.60 \pm 0.40
3:5-Diiodotyramine	2.0	0.03 \pm 0.02	1.40 \pm 0.30

TABLEAU IV

INFLUENCE DES MICROSOMES THYROÏDIENS ET HÉPATIQUES DE MOUTON SUR DIVERS DÉRIVÉS 3-IODOPHÉNOLIQUES

La 3-iodo-L-tyrosine, à la même concentration que le produit à essayer, est utilisée comme témoin. Les iodures apparus sont dosés après 60 min d'incubation.

<i>Produit essayé</i>			<i>Témoin</i>
<i>Dénomination</i>	<i>Concentration (μM)</i>	<i>I⁻ apparus (μM)</i>	<i>I⁻ apparus (μM)</i>
<i>Microsomes thyroïdiens</i>			
3-Iodo-D-tyrosine	3.0	0.15 \pm 0.03	2.40 \pm 0.50
3-Iodo- α -méthyl-DL-tyrosine	3.0	0.25 \pm 0.05	2.40 \pm 0.50
3-Iodo-5-nitro-L-tyrosine	3.0	0.02 \pm 0.01	1.55 \pm 0.30
3-Iodotyramine	5.0	0.03 \pm 0.02	2.10 \pm 0.40
3-Iodonorsynéphrine	5.0	0.03 \pm 0.02	2.00 \pm 0.40
<i>Microsomes hépatiques</i>			
3-Iodo-D-tyrosine	3.0	0.60 \pm 0.15	1.80 \pm 0.35
3-Iodo- α -méthyl-DL-tyrosine	3.0	0.25 \pm 0.05	1.80 \pm 0.35
3-Iodo-5-nitro-L-tyrosine	2.0	0.02 \pm 0.01	1.45 \pm 0.30

utilisés à la même concentration comprise entre 1 et 15 μM . Les valeurs trouvées pour la désiodation de chaque produit représentent la moyenne des résultats obtenus avec au moins trois préparations microsomales, chaque essai étant réalisé en triple exemplaire.

Le Tableau III, donné à titre d'exemple, rend compte de l'influence respective des microsomes thyroïdiens et hépatiques de mouton sur les analogues structuraux de la diiodotyrosine. Seule parmi les composés essayés, la 3:5-diiodo-L-tyrosine est fortement deshalogénée. Son stéréoisomère D, les dérivés α -méthylé et lactique ne le sont que faiblement; tous les autres produits demeurent inattaqués. En faisant agir les mêmes particules sur les dérivés 3-iodophénoliques, on obtient des résultats analogues ainsi qu'il ressort du Tableau IV.

Les variations d'activité enzymatique observées sont dues au fait que les microsomes de mouton possèdent une activité variable d'un lot à l'autre, même si les teneurs en protéines sont voisines. De plus, il semble que l'état nutritionnel et physiologique puisse varier d'un animal à l'autre et retentir ainsi sur les effets enzymatiques des préparations microsomales *in vitro*²⁸.

Les préparations thyroïdiennes de rat possèdent sur les produits iodés la même spécificité que celles des glandes de mouton, comme l'indique le Tableau V, puisque

TABLEAU V

INFLUENCE DES MICROSOMES THYROÏDIENS DE RAT SUR DIVERS DÉRIVÉS IODOPHÉNOLIQUES

La 3:5-diiodo-L-tyrosine et la 3-iodo-L-tyrosine sont utilisées comme témoin, respectivement pour les produits diiodés et monoiodés, elles sont employées à la même concentration que les substances à essayer. Les iodures apparus sont dosés après 60 min d'incubation.

Produit essayé	Témoin		
Dénomination	Concentration (μM)	I ⁻ apparu (μM)	I ⁻ apparu (μM)
3:5-Diiodo-D-tyrosine	1.5	0.02 \pm 0.01	2.10 \pm 0.40
3:5-Diiodo- α -méthyl-DL-tyrosine	1.5	0.02 \pm 0.01	2.10 \pm 0.40
Acide β (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) α -Amino-éthylphosphonique	3.0	0.03 \pm 0.02	2.50 \pm 0.50
Acide β (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) DL-lactique	1.0	0.02 \pm 0.01	1.40 \pm 0.30
Acide β (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) propionique	1.0	0.02 \pm 0.01	1.45 \pm 0.30
Acide α (3:5-diiodo-4-hydroxyphényl) acétique	1.0	0.02 \pm 0.01	1.45 \pm 0.30
3:5-Diiodotyramine	2.0	0.03 \pm 0.02	2.80 \pm 0.60
3-Iodo-D-tyrosine	0.5	0.01 \pm 0.01	0.25 \pm 0.05
3-Iodo- α -méthyl-DL-tyrosine	0.5	0.01 \pm 0.01	0.25 \pm 0.05
3-Iodo-5-nitro-L-tyrosine	2.0	0.02 \pm 0.01	1.20 \pm 0.25

seules les L-iodotyrosines sont deshalogénées alors les autres dérivés restent inchangés. Les essais réalisés avec les microsomes hépatiques conduisent à des résultats analogues.

Les mesures de l'activité de la désiodase thyroïdienne de mouton sur la 3-iodo-L-phénylalanine, obtenus après dosage de l'iode par activation neutronique, sont rassemblés dans le Tableau VI. Le produit iodé non phénolique n'est pas désiodé alors que la 3-iodo-L-tyrosine, à la même concentration molaire, est entièrement deshalogénée. Une quantité importante d'iode demeure à l'origine des chromatogrammes. Elle semble provenir des iodo protéines microsomales lesquelles ne migrent pas en

TABLEAU VI

ACTION DES MICROSOMES THYROÏDIENS DE MOUTON SUR LA 3-iodo-L-phénylalanine 64 μ M COMPARÉE À LA 3-iodo-L-tyrosine À LA MÊME CONCENTRATION

Les produits de la réaction sont séparés, après 60 min d'incubation, par chromatographie par voie descendante sur papier Whatman 1 MM en présence de *n*-butanol saturé par NH_4OH 2 M comme solvant. L'iode est dosé par activation neutronique. Composition des chromatogrammes: A, iode de potassium. B, 3-iodo-L-phénylalanine. C, 3-iodo-L-phénylalanine + microsomes inactivés. D, 3-iodo-L-phénylalanine + microsomes actifs. E milieu d'incubation + microsomes inactivés. F, 3-iodo-L-tyrosine. G, 3-iodo-L-tyrosine + microsomes inactivés. H, 3-iodo-L-tyrosine + microsomes actifs.

Chromatogrammes	Quantité d'iode (μ M)			
	$R_F = 0$ (origine)	$R_F = 0.11$ (3-iodo-L-tyrosine)	$R_F = 0.22$ (I ⁻)	$R_F = 0.47$ (3-iodo-L-phénylalanine)
A	—	—	0.70	—
B	—	—	—	0.50
C	0.80	—	—	0.21
D	1.16	—	—	0.23
E	1.42	—	—	—
F	—	0.81	—	—
G	1.40	0.46	—	—
H	1.86	—	0.41	—

chromatographie puisqu'on retrouve de l'iode à l'origine des chromatogrammes même lorsque le milieu d'incubation est dépourvu de substrat halogéné ou d'iodures.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les iodotyrosines naturelles sont intensément deshalogénées par les microsomes thyroïdiens ou hépatiques grâce à un enzyme doué d'une spécificité très stricte.

Les résultats obtenus avec les dérivés 3:5-diiodophénoliques parasubstitués sont à cet égard particulièrement démonstratifs puisque la désiodase microsomale de mouton agit essentiellement sur la 3:5-diiodo-L-tyrosine mais est peu efficace sur le stéréoisomère D ainsi que sur la plupart des produits essayés. Il est même vraisemblable que la faible réponse constatée avec la 3:5-diiodo-D-tyrosine procède d'une certaine racémisation qui est susceptible de se manifester au cours de l'iodation de son précurseur en milieu ammoniacal.

Le meilleur substrat enzymatique est celui qui possède une chaîne L-alanine en para par rapport au phénol. En effet, la substitution de l'hydrogène du groupement acide α -aminé par un radical méthyle diminue considérablement l'influence de la désiodase. Comme les pK_1 et pK_2 sont sans doute peu modifiés par la présence du radical méthyle, on est conduit à penser que l'affinité de la désiodase pour le substrat est diminuée par suite d'un empêchement stérique. Par contre, la substitution du radical amine de la chaîne alanine par un reste guanidyle, empêche tout effet de l'enzyme. Il est probable que la présence d'un groupement d'une basicité plus forte que celle du radical amine favoriserait son rapprochement avec le radical phénolique provoquant ainsi une torsion moléculaire qui s'opposerait à la fixation de l'enzyme. Cependant, la substitution du radical amine par un hydroxyle ne supprime pas totalement l'affinité de l'enzyme pour le substrat, puisque la désiodation de l'isostère lacti-

que de la diiodotyrosine, quoique faible, reste néanmoins significative. D'une façon générale, la substitution par un hydrogène du radical amine ou du radical carboxyle, soit le remplacement de ce dernier par un groupe phosphonique, empêchent l'activité catalytique de l'enzyme de se manifester. Il en est de même lorsque la fonction carboxylique est estérifiée et la fonction aminée acétylée.

Des faits semblables ressortent des expériences réalisées avec les préparations thyroïdiennes ou hépatiques de rat. Les seules différences relevées avec les particules correspondantes de mouton concernent les analogues α -méthylé ou lactique des iodo-tyrosines qui ne sont pas désiodés. Il convient cependant de remarquer que ces composés sont assez peu sensibles à l'action des microsomes de mouton et qu'une désiodation notable n'apparaît qu'avec des quantités d'enzymes supérieures à celles utilisées avec les préparations thyroïdiennes de rat, lesquelles contiennent en plus la thyroglobuline comme contaminant.

Les essais réalisés avec les produits 3-iodophénoliques ont conduit à des résultats analogues à ceux obtenus avec leurs homologues diiodés. Une donnée supplémentaire a été apportée par l'utilisation de la 3-iodo-5-nitro-L-tyrosine qui n'est pas désiodée bien qu'il s'agisse d'un acide α -aminé phénolique de la série L. Il est donc probable que le pK de la fonction phénol du substrat, modifié par la présence en ortho d'un substituant nitré, intervient dans l'affinité enzymatique.

Le rôle de la fonction phénol semble d'ailleurs primordial puisque l'enzyme est sans action sur la 3-iodo-L-phénylalanine, substrat non hydroxylé. Ce fait résulte d'essais pratiqués avec des microsomes thyroïdiens de mouton mis en présence de 3-iodo-L-tyrosine ou 3-iodo-L-phénylalanine, utilisées à la même concentration. Les dosages d'iode réalisés par activation neutronique montrent que le premier produit est totalement deshalogéné alors que le second reste inchangé. La quantité d'iode, retrouvée à l'origine des chromatogrammes, est essentiellement apportée par les particules microsomales dont la teneur en halogène est comprise entre 0.1 et 0.2% du taux en protéines.

En conclusion, la fonction phénol doit nécessairement intervenir dans la combinaison enzyme-substrat qui exige également le groupement acide α -aminé de la chaîne L-alanine. De plus, la distance intramoléculaire entre ce groupement et l'hydroxyle phénolique ortho-iodé intervient dans l'activité désiodante de l'enzyme.

L'enzyme thyroïdien, qui s'avère stéréospécifique, permet ainsi un cycle intra-thyroïdien de l'iode en intervenant donc directement sur la sélectivité de la sécrétion hormonale et indirectement sur la biosynthèse de la thyroglobuline. Par contre, le rôle de la désiodase présente dans divers tissus périphériques et douée de la même spécificité que celle de la glande thyroïde, reste encore à élucider.

RÉSUMÉ

Les recherches ont consisté à étudier l'activité de l'iodotyrosine désiodase des microsomes thyroïdiens et hépatiques sur dix neuf composés représentés par les 3-iodo- et 3:5-diiodo-L-tyrosine et leurs analogues structuraux. Dans les conditions où les L-iodotyrosines sont intensément deshalogénées, les D-iodotyrosines (peut-être à cause d'une racémisation partielle), les α -méthyl-DL-iodotyrosines et l'acide 3:5-diiodo-4-hydroxyphényl-DL-lactique ne le sont que faiblement. Tous les autres produits étudiés, en particulier l'acide 3:5-diiodo-4-hydroxyphényl- α -guanidyl propioni-

que, l'acide 3:5-diiodo-4-hydroxyphényl propionique et la 3:5-diiodotyramine restent pratiquement inattaqués. La fonction phénol du substrat joue un rôle fondamental puisque la 3-iodo-5-nitro-L-tyrosine et la 3-iodo-L-phénylalanine demeurent inchangées. Les désiodases thyroïdienne et hépatique possèdent donc une spécificité très stricte. On peut supposer que l'enzyme se fixe sur les fonctions carboxyle, amine et phénol du substrat grâce à trois sites distincts.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Lissitzky, S., Benevent, M. T. et Roche, J. (1958) *C.R. Soc. Biol.* 152, 10-13
- 2 Lissitzky, S., Benevent, M. T., Roques, M. et Roche, J. (1959) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 41, 1329-44
- 3 Lissitzky, S. (1961) *Exp. Ann. Biochim. Med.* 23, 189-203
- 4 Nakano, M. et Danowski, T. S. (1959) *Endocrinol.* 65, 889-901
- 5 Roche, J., Lissitzky, S. et Benevent, M. T. (1958) *C.R. Soc. Biol.* 151, 1666-9
- 6 Roche, J., Michel, R., Michel, O. et Lissitzky, S. (1951) *C.R. Soc. Biol.* 145, 288-90
- 7 Roche, J., Michel, R., Michel, O. et Lissitzky, S. (1952) *Biochim. Biophys. Acta*, 9, 161-9
- 8 Roche, J., Michel, O., Michel, R. et Lissitzky, S. (1953) *C.R. Soc. Biol.* 147, 232-4
- 9 Roche, J., Michel, O., Michel, R., Gorbman, A. et Lissitzky, S. (1953) *Biochim. Biophys. Acta* 12, 570-6
- 10 Stanbury, J. B. (1957) *J. Biol. Chem.* 228, 801-11
- 11 Stanbury, J. B. et Morris, M. L. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 106-8
- 12 Rosenberg, I. N. et Ahn, C. (1969) *Endocrinol.* 84, 727-37
- 13 Rosenberg, I. N. (1970) *Metab. Clin. Exp.* 19, 785-98
- 14 Maayan, M. L. (1964) *Endocrinol.* 75, 747-51
- 15 Maayan, M. L. (1966) *Endocrinol.* 78, 471-80
- 16 Bastomsky, C. H. et Rosenberg, I. N. (1966) *Endocrinol.* 79, 505-10
- 17 Granato, D. et Jequier, E. (1969) *Experientia* 25, 252-4
- 18 Green, W. L. (1968) *Endocrinol.* 83, 336-47
- 19 Greer, M. A. et Grimm, Y. (1968) *Endocrinol.* 83, 405-10
- 20 Haibach, H. (1971) *Endocrinol.* 88, 1277-9
- 21 Matsuzaki, S. et Suzuki, M. (1967) *J. Biochem., Tokyo* 62, 746-55
- 22 Hartmann, N. (1957) *Z. Physiol. Chem.* 308, 157-9
- 23 Stanbury, J. B., Kassenaar, A. A. et Meijer, J. W. (1956) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 16, 735-46
- 24 Stanbury, J. B., Meijer, J. W. et Kassenaar, A. A. (1956) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 16, 848-68
- 25 Michelot, J., Meyniel, G., Gaillard, G., Berger, J. A. et Blanquet, P. (1968) *C.R. Soc. Biol.* 162, 1795-9
- 26 Roche, J., Lissitzky, S., Michel, O. et Michel, R. (1951) *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 439-45
- 27 Block, P. et Powel, G. (1943) *J. Am. Chem. Soc.* 65, 1430-1
- 28 Bouchilloux, S. (1971) *Méthodologie Expérimentale en Physiologie et en Physiopathologie Thyroïdienne* (I.N.S.E.R.M. eds), pp. 239-52