

REVUE

La thyroglobuline, protéine iodée naturelle

J. NUNEZ

Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée
Collège de France, Paris 5^e (France)

Reçu le 1^{er} novembre 1966

SUMMARY

Certain critical observations can be made with regard to the preparation and properties of artificially halogenated proteins on the basis of the study of the iodination and biosynthesis of thyroglobulin in the thyroid gland and its physico-chemical properties. It appears that iodination causes two types of changes. The first has to do with halogenation method used. The damage is caused by the actual iodination conditions and can be avoided if the chemical iodination methods are replaced by enzymatic techniques. The second is an inevitable consequence of the introduction of the halogen (which is tantamount to changing the primary structure of the molecule). The physico-chemical properties (probably the conformation of the protein) depend on the halogen content and its distribution. In the case of thyroglobulin, two types of change are observed. For fairly low halogen contents, each iodine atom introduced causes an increase in the sedimentation factor (from 17 to 20 S). When the iodine content is increased, the molecule, which has hitherto been broken down by the detergent into sub-units of 12 S, develops a resistance to this treatment, so that iodination modifies the interaction between sub-units.

RÉSUMÉ

L'étude de l'iodation et de la biosynthèse de la thyroglobuline dans la glande thyroïde et de ses propriétés physicochimiques permet quelques observations critiques sur la préparation et les propriétés de protéines artificiellement halogénées. Il apparaît que l'iodation entraîne deux types de modifications : le premier relève de la méthode d'halogénéation. Il s'agit des dommages causés par les conditions mêmes d'iodation; ils peuvent être évités si l'on remplace les méthodes chimiques d'iodation par les méthodes enzy-

matiques. Le second est une conséquence inévitable de l'introduction d'halogène (qui revient à changer la structure primaire de la molécule) : les propriétés physicochimiques (probablement la conformation de la protéine) dépendent de la teneur en halogène et de sa distribution. Dans le cas de la thyroglobuline, on constate deux types de changements : pour des teneurs modérées en halogène, chaque atome d'iode introduit provoque une augmentation du coefficient de sédimentation (de 17 à 20 S). Lorsque la teneur en iode atteint une valeur plus élevée, la molécule, jusque là dissociée par les détergents en sous-unités de 12 S, devient résistante à ce traitement : l'iodation modifie donc l'interaction entre sous-unités.

La thyroglobuline est l'une des rares protéines iodées naturelles. Elle est halogénée dans la glande thyroïde des Vertébrés et peut être aisément marquée par voie biologique par l'un ou l'autre des isotopes de l'iode. L'halogène est présent dans deux dérivés de la tyrosine : la 3-mono-iodotyrosine et la 3,5-diiodotyrosine, dans deux iodothyronines : la thyroxine et la 3,5,3'-triiodothyroxine et, accessoirement, dans l'iodohistidine.

Au cours de ces dernières années, divers travaux ont eu pour objet l'étude du mécanisme enzymatique de l'iodation de cette protéine, l'articulation de sa biosynthèse et de son halogénéation, les propriétés physicochimiques des molécules obtenues.

L'iode réagit facilement avec de nombreuses autres protéines. On obtient ainsi des molécules artificiellement halogénées, qui peuvent être marquées aisément par l'un ou l'autre des isotopes de l'iode (^{131}I et ^{125}I). Ces molécules sont utilisées : 1° comme modèles pour l'étude de l'iodation de la thyroglobuline et de la thyroxinogenèse ^(1,6); 2° comme marqueurs de protéines, sériques ou non, dont on veut connaître la vitesse de renouvellement, le métabolisme, la distribution ⁽⁷⁾; 3° pour réaliser le dosage par radioimmuno-électrophorèse ou précipitation immunologique, notamment de protéines hormonales, présentes à l'état de trace dans le sang ⁽⁸⁾; 4° pour l'étude de la structure des protéines et les relations existant entre celle-ci et l'activité biologique ⁽⁹⁻²³⁾. Dans ce cas, l'iode est un réactif spécifique de groupe. L'introduction d'iode sur une molécule protéique permet également de préparer des cristaux de densité électronique élevée qui sont nécessaires pour les études de structure aux rayons X ⁽²⁴⁾.

On admet généralement que la protéine halogénée est identique (ou très peu différente) à la molécule native non iodée. C'est pourquoi le choix de la méthode d'iodation présente un intérêt majeur. Mais il est prévisible que, même dans le cas où les conditions d'halogénéation sont parfaites et évitent toute dénaturation, des changements interviennent dans la structure fine de la molécule, du fait même de l'introduction d'iode, qui revient à modifier la structure primaire de la protéine.

Il peut paraître utile, de ce fait, de présenter une analyse rapide des modalités de l'iodation enzymatique de la thyroglobuline, telle qu'elle intervient dans la glande thyroïde, et de résumer brièvement les études sur les changements de propriétés de cette molécule au cours de son iodation.

I. PRÉPARATION DE PROTÉINES ARTIFICIELLEMENT HALOGÉNÉES ET IODATION ENZYMATIQUE DANS LA GLANDE THYROÏDE.

L'introduction d'iode sur les restes de tyrosine des protéines est généralement effectuée par voie chimique. L'élément I_2 (^{127}I ou ^{131}I et ^{125}I traçeurs ou additionnés de quantités variables de ^{127}I) peut être utilisé directement soit en solution iodo-iodurée (24, 25), soit introduit par diffusion (26), soit encore produit au sein du milieu réactionnel par électrolyse (27). Il peut être également généré à partir de IK par action d'un oxydant convenable (H_2O_2 , IO_3K , chloramine T, etc.) (28-30). Dans tous les cas, la présence d'iode métalloïdique et d'un oxydant représente un danger certain pour la protéine; certains éléments de la structure primaire peuvent être même atteints (groupes $-SH$, $-S-S$, $-S-CH_3$ de la cystine, cystéine et méthionine notamment (31, 32), tryptophane (15, 33).

Pour obtenir un rendement convenable d'iodation il est, en outre, nécessaire d'opérer en milieu alcalin. En effet, Mayberry *et al.* (34, 35) ont étudié le mécanisme d'iodation chimique de la tyrosine et montré que le rendement de la substitution est proportionnel à la quantité de phénoxyde formé. Ils ont également démontré l'existence d'une catalyse basique qui facilite le départ du proton en 3 ou 5 de la forme quinoïde iodée intermédiaire. Les réactions chimiques proposées pour illustrer ce mécanisme sont reproduites dans la figure 1.

Il est donc nécessaire d'effectuer la réaction à un pH relativement élevé (supérieur à 8,5), ce qui peut ne pas être sans inconvénient pour l'intégrité de la structure de certaines protéines. Signalons cependant qu'une méthode peu utilisée d'iodation chimique, qui met en œuvre ICl , permet de travailler à des pH proches de la neutralité (14, 36-38).

Chez les organismes vivants, le processus d'halogénéation est enzymatique. Par exemple, chez certains microorganismes, le chlore est l'halogène utilisé. On a pu extraire un système enzymatique soluble à partir de *Caldoromyces fumago* qui catalyse l'oxydation des chlorures (39-42). Le système est complexe et contient : 1° une amylase qui fournit du glucose; 2° une glucose oxydase qui, réagissant avec celui-ci, génère de l'eau oxygénée; 3° une chloroperoxydase qui, oxydée par le peroxyde d'hydrogène, catalyse l'oxydation du chlorure et assure ainsi l'halogénéation du substrat.

Dans la thyroïde, il existe un système analogue qui catalyse l'halogénéation des restes de tyrosine de la thyroglobuline à partir de l'iodure capté par la glande (43-64). La source d'eau oxygénée n'est pas très bien définie, mais on

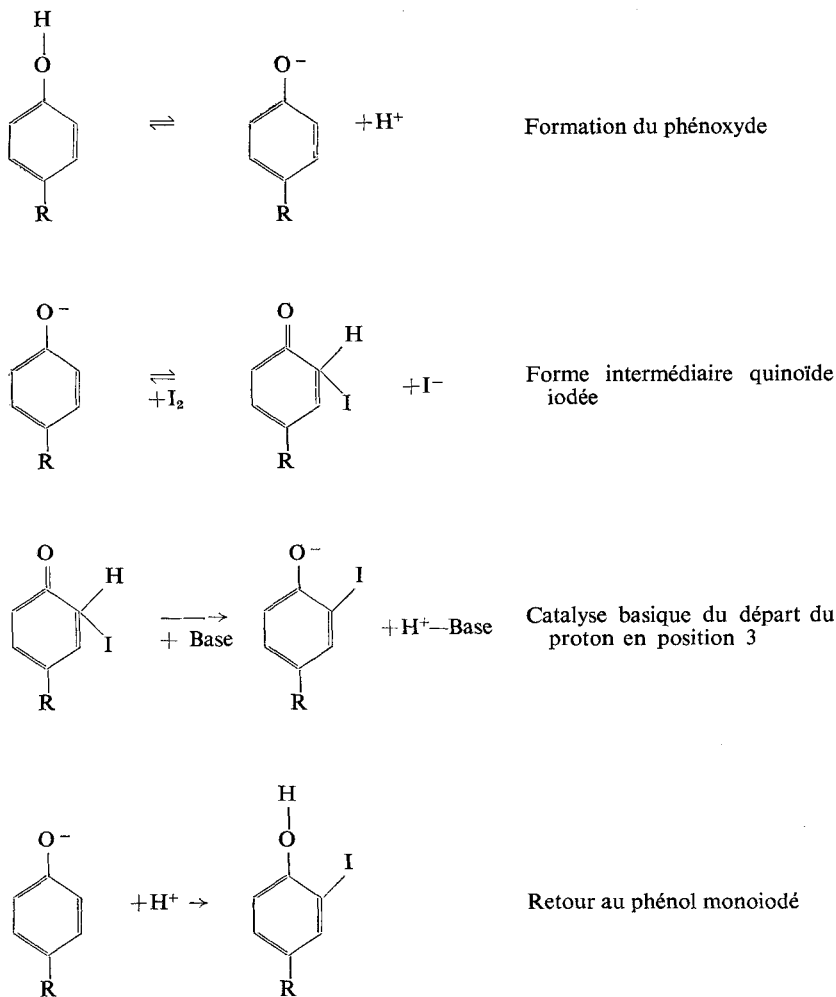
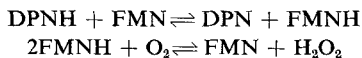


FIG. 1. Réactions proposées par Mayberry *et al.* (34) pour illustrer le mécanisme de l'iodation chimique de la tyrosine.

admet qu'elle peut être constituée par le système glucose-glucose oxydase ou par le DPNH (ou le TPNH), selon la réaction (48, 54) :



Le pH optimum de la réaction peroxydasique est proche de la neutralité.

Par analogie avec ces systèmes, qui réalisent l'halogénéation de protéines dans des conditions très douces, nous avons proposé l'utilisation de peroxy-

dases pour la préparation de protéines artificiellement halogénées ⁽⁶⁵⁾. On sait, en effet, que non seulement la peroxydase thyroïdienne, mais également la chloroperoxydase, la myéloperoxydase, la lactoperoxydase, etc., additionnées de H_2O_2 ou d'un système générateur de peroxyde d'hydrogène, réalisent l'halogénéation de la tyrosine libre ^(3-5, 66).

La peroxydase de raifort ⁽⁶⁵⁾ et la chloroperoxydase ⁽⁶⁶⁾ permettent l'iodation de la thyroglobuline et d'autres protéines dans des conditions proches de celles qui existent dans la glande thyroïde. La peroxydase de raifort n'halogène cependant pas la tyrosine libre, mais conduit à des polymères de cet acide aminé ⁽⁶⁷⁾. Il semble, dans ce cas, que la tyrosine soit oxydée sous forme radicalaire et donc polymérisée avant que l'iodation puisse intervenir. Ce résultat suggère donc que la réaction peroxydasique est de type radicalaire *. En utilisant la méthode de résonance paramagnétique nucléaire, Yamazaki *et al.* ont pu montrer que l'oxydation de divers substrats par une peroxydase et H_2O_2 comporte comme étape intermédiaire la formation de radicaux libres ^(68, 69).

Le mécanisme de la réaction enzymatique serait différent de celui de la réaction chimique (fig. 2).

La réaction d'iodation procéderait alors de la manière suivante : 1° La peroxydase est oxydée par l'eau oxygénée. Il semble que le peroxyde produit par le système glucose-glucose oxydase ne soit pas libre dans le milieu. 2° La peroxydase oxydée catalyse l'oxydation de l'iodure. Mais l'iode oxydé formé ne semble pas libre dans le milieu réactionnel; il est probablement fixé à l'enzyme.

L'absence d'eau oxygénée libre dans le milieu et la fixation de l'iode oxydé sur l'enzyme sont deux éléments favorables de l'iodation enzymatique. Cunningham ⁽⁷⁰⁾ a supposé que, au cours de l'oxydation de l'iodure par la peroxydase thyroïdienne, l'espèce d'halogène oxydée obtenue est fixée sur les ponts disulfure de la protéine pour former un dérivé intermédiaire instable (iodure de sulfenyle).

La réaction enzymatique d'iodation se déroule donc dans des conditions proches de celles décrites pour le système thyroïdien, probablement plus compatibles que les méthodes chimiques avec la conservation des propriétés structurales des protéines. Elle permet, en outre, d'introduire dans certains cas un nombre d'atomes d'iode plus élevé que les méthodes chimiques, ce qui pour certaines utilisations peut présenter un intérêt. Ainsi, la thyroglobuline ne peut être halogénée chimiquement au-delà d'une cinquantaine d'atomes sans qu'interviennent des dissociations et des dénaturations irréversibles ⁽⁷¹⁾. Par la méthode enzymatique on peut introduire, par contre, jusqu'à 200 atomes d'halogène sans dénaturation apparente ⁽⁶⁵⁾.

* Dans un travail très récent, Yip et Hadley (*Biochim. Biophys. Acta*, **122** : 406, 1966) confirment que la réaction d'iodation par une peroxydase est de type radicalaire.

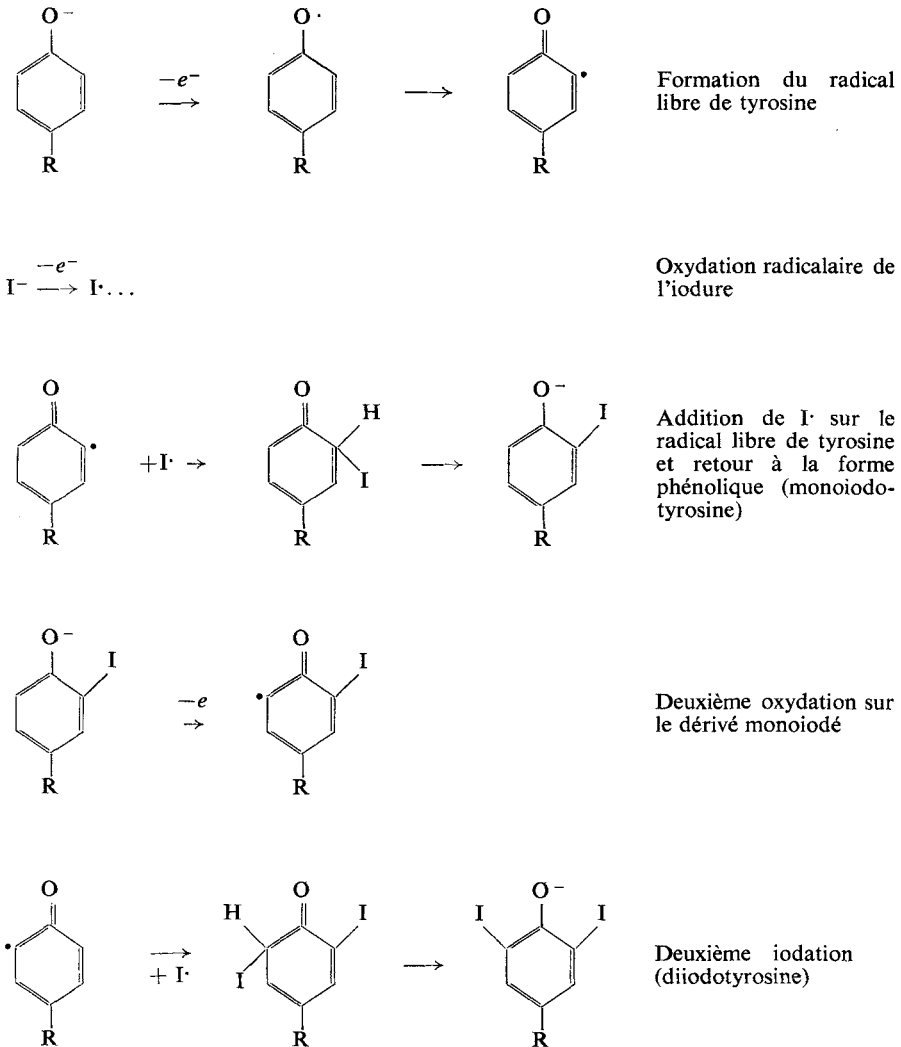


FIG. 2. Réactions proposées pour illustrer le mécanisme de l'iodation enzymatique par une peroxydase.

II. HÉTÉROGÉNÉITÉ D'IODATION DE LA THYROGLOBULINE.

La thyroglobuline renferme 110 restes de tyrosine, 12 restes de monoiodotyrosine et 10 restes de diiodotyrosine. Le contenu en iode est donc égal à 32 atomes. Mais, en fait, il n'est pas constant d'une préparation à l'autre.

Il peut varier entre 0,2 et 1,5 %. Diverses indications permettent de supposer qu'en fait la thyroglobuline est constituée par un mélange de molécules de teneur en halogène différente, le contenu en iode représentant donc une moyenne. En effet, il est possible de séparer par chromatographie sur un échangeur anionique (DEAE-cellulose ou DEAE-Sephadex ⁽⁷²⁻⁷⁶⁾ des fractions dont la teneur en iode est différente. Les fractions sont d'autant plus faciles à éluer qu'elles contiennent moins d'halogène. Par ultracentrifugation en gradient de saccharose, on sépare également des fractions dont le rapport monoiodotyrosine/diiodotyrosine est différent; les fractions les plus riches en iode sont celles qui sédimentent le plus rapidement ⁽⁷⁶⁾. Ce résultat met en évidence l'hétérogénéité d'iodation. Il indique également que les molécules les plus halogénées ont des propriétés de sédimentation différentes de celles qui le sont moins. Nous reviendrons sur ce résultat plus loin.

On a pu montrer que d'autres propriétés physiques dépendent de la teneur en halogène : par exemple la résistance à la dénaturation par la chaleur et à la dissociation par les détergents ^(71, 77, 78). Lorsque l'on traite la thyroglobuline (19 S) par le dodécylsulfate de sodium, on dissocie partiellement cette molécule en deux sous-unités identiques de 12 S et de poids moléculaire moitié moindre (325 000) ^(77, 78). Mais une portion de la protéine résiste au traitement et on a pu montrer que c'est la plus iodée ^(76, 78, 80).

L'existence de cette hétérogénéité d'iodation se comprend aisément si l'on se réfère au fait que l'introduction d'halogène n'est pas codée. La monoiodotyrosine et la diiodotyrosine ne sont pas incorporées dans la thyroglobuline au cours de la synthèse protéique ^(81, 82); de plus, une désiodase spécifique très active est présente dans la glande et assure la déshalogénéation très rapide des iodotyrosines libres ⁽⁸³⁾. La situation pour la thyroglobuline est donc analogue à celle décrite pour les protéines artificiellement halogénées : l'iode est distribué au hasard entre les restes de tyrosine ayant la même réactivité. Cha et Scheraga ont pu ainsi isoler sur Amberlite des molécules de ribonucléase iodée différant par leur contenu en iodotyrosine, et établir par cette méthode la réactivité de divers restes de tyrosine selon leur position ^(15, 16).

III. CONSÉQUENCE DE L'IODATION : LES MODIFICATIONS DE CONFORMATION.

Nous avons indiqué ci-dessus que l'introduction d'un atome d'iode sur un reste de tyrosine d'une protéine revient, en fait, à changer la structure primaire de celle-ci, le dérivé halogéné — monoiodotyrosine et diiodotyrosine — ayant toute une série de propriétés différentes de celles de l'acide aminé précurseur. Ainsi, le pK de la fonction phénol de la tyrosine est de 10, 13 ⁽⁸⁴⁾, celui de la monoiodotyrosine de 8,2 ⁽⁸⁵⁾ et celui de la diiodotyrosine de 6,36 ⁽⁸⁶⁾. On sait le rôle que le tyrosine joue dans la constitution de la structure tertiaire de la protéine, qui elle-même conditionne la conformation de la molécule; on admet généralement que le phénol de la tyrosine intervient dans la formation

de liaisons hydrogènes. On sait également que les groupes polaires et apolaires sont orientés différemment par rapport à la surface de la molécule. Un changement de pK de la fonction phénol doit donc se traduire par une modification des liaisons hydrogènes et par un changement d'orientation des cycles phénoliques par rapport à la surface d'hydratation. Ces observations permettent de comprendre également l'abolition de l'activité biologique constatée après iodation. On peut penser, en effet, que le centre actif est affecté, directement ou non, par un changement conformationnel de la molécule.

A cet égard, les travaux sur la thyroglobuline ont fourni toute une série d'informations qui confirment les éventualités décrites ci-dessus. Nous avons vu que l'hétérogénéité d'iodation de la thyroglobuline a pu être mise en évidence parce que certaines propriétés physiques de la molécule sont modifiées par l'introduction d'halogène.

Nous avons indiqué plus haut, par exemple, que les préparations natives de thyroglobuline sont dissociées par le dodécylsulfate de sodium en sous-unités de 12 S dans la proportion de 60-70%. Si l'on iode artificiellement de la thyroglobuline, on constate que la proportion de fractions résistant à l'action du détergent augmente en fonction du contenu en halogène jusqu'à représenter près de 100%. Il faut donc admettre que l'interaction entre sous-unités est affectée par la teneur en halogène de la molécule. On ne peut cependant pas encore indiquer quel est le mécanisme de cette modification et, plus précisément, si des liaisons covalentes (ponts -S-S par exemple, selon de Crombrughe *et al.* ⁽⁸⁷⁾) sont formées au cours de l'iodation. La sensibilité à la dénaturation par la chaleur est aussi fonction de la teneur en halogène : Robbins a montré que les molécules qui sont éluées le moins facilement d'une colonne de DEAE-Sephadex et qui sont précisément les plus halogénées sont plus sensibles à ce traitement ⁽⁷⁵⁾.

Ces résultats permettent donc de confirmer que toute une série de propriétés physiques sont modifiées au cours de l'iodation d'une protéine. Il en est d'autres qui permettent de supposer que les modifications portent sur la conformation de la molécule.

Lorsque l'on étudie la biosynthèse de la thyroglobuline, on constate que la cinétique d'incorporation d'un acide aminé marqué se fait selon la séquence d'événements suivante : l'acide aminé est d'abord incorporé dans des fractions protéiques légères (3-8 S), puis la radioactivité est renfermée dans un composé de 12 S ⁽⁸⁸⁻⁹⁰⁾, pour s'accumuler enfin dans une molécule dont les propriétés analytiques et immunologiques sont celles de la thyroglobuline ⁽⁹¹⁻⁹³⁾. Le coefficient de sédimentation, établi par ultracentrifugation en gradient de saccharose, de cette protéine néosynthétisée (17 S) est cependant inférieur à celui de la thyroglobuline (19 S) ⁽⁹²⁾. On constate également que cette protéine de 17 S n'est pas halogénée ⁽⁹²⁾. On peut d'ailleurs la séparer de la thyroglobuline par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex ⁽⁹³⁾.

Si l'on étudie parallèlement la cinétique de l'iodation, on constate que la protéine marquée par l'iode *in vitro* contient moins d'halogène que la stable,

accumulée au cours de la vie de l'animal. Là encore la protéine iodée *in vitro* présente un coefficient de sédimentation (18,4 S) inférieur à celui de la thyroglobuline (19 S).

Ces différences entre les coefficients de sédimentation dépendent donc de la teneur en halogène : plus la protéine est iodée, plus le coefficient de sédimentation est élevé. Il est facile de le confirmer puisque, après iodation artificielle, les coefficients de sédimentation de la protéine néosynthétisée (17 S) et de celle halogénée *in vitro* (18,4 S) augmentent pour rejoindre celui de la thyroglobuline (19 S). On peut atteindre un maximum de coefficient de sédimentation (20 S) en introduisant artificiellement un excès d'halogène, ce qui est possible puisque le nombre de restes de tyrosine disponibles est important (110). On constate alors que le niveau d'iodation pour lequel ce maximum est atteint est le même que celui pour lequel les molécules sont totalement résistantes au dodécylsulfates de sodium.

Ces résultats indiquent que la valeur de 17 S pour la molécule non iodée est un minimum et celle de 20 S un maximum. Entre ces deux valeurs, le coefficient de sédimentation évolue en fonction de la teneur en halogène : chaque atome d'iode provoquerait de ce fait une transition *discrète*, qui se traduirait par une augmentation du coefficient de sédimentation. Une transition plus nette interviendrait pour un niveau d'iodation élevé, mise en évidence par l'apparition de la résistance au dodécylsulfate de sodium. Cette deuxième transition témoigne alors de l'influence de l'iodation sur la nature et la force des liaisons réunissant les sous-unités.

Nous avons attribué cette évolution des propriétés physicochimiques de la thyroglobuline en fonction de son niveau d'iodation à des changements conformationnels. En effet, la valeur d'un coefficient de sédimentation dépend de trois paramètres : le poids moléculaire, la forme et la densité de la molécule. Dans le cas de la thyroglobuline (poids moléculaire : 650 000), même lorsque la teneur en iode atteint la valeur de 60-70 atomes, l'augmentation de poids moléculaire calculée est trop faible pour faire passer le coefficient de sédimentation de 17 S à 20 S.

Cette augmentation ne peut donc être que le résultat d'un changement de forme ou de densité qui, elles-mêmes, pourraient être la conséquence du changement de polarité de la fonction phénol d'un certain nombre de restes de tyrosine, dû lui-même à leur iodation.

Ce changement de coefficient de sédimentation en fonction de l'halogénéation n'est pas limité à la thyroglobuline; on peut vérifier qu'il en est de même pour d'autres molécules ⁽⁷⁶⁾ telles que sérumalbumine, globine, etc., protéines habituellement marquées artificiellement par l'iode.

Les résultats obtenus avec la thyroglobuline permettent donc de confirmer l'existence de modifications de structure, qui ne sont pas des dénaturations dues à la méthode d'halogénéation, mais qui sont une conséquence inévitable de l'iodation. Les protéines artificiellement iodées ne sont pas homologues des protéines natives; elles en diffèrent par diverses propriétés physicochimiques.

CONCLUSION.

Les connaissances que l'on possède sur les modalités de l'iodation enzymatique de la thyroglobuline dans la glande thyroïde et sur l'évolution de ses propriétés au cours de l'halogénéation permettent quelques observations critiques sur la préparation et les propriétés des protéines artificiellement halogénées. Il apparaît ainsi que les méthodes d'iodation par des enzymes peroxydasiques tels que la peroxydase de raifort ⁽⁶⁵⁾ ou la chloroperoxydase ⁽⁶⁶⁾ sont susceptibles, du fait même de leur mécanisme, de conduire à des produits marqués présentant des qualités supérieures à celles obtenues avec des méthodes chimiques. L'exemple de la thyroglobuline et les résultats obtenus avec cette protéine en ce qui concerne l'hétérogénéité de distribution de l'halogène et les modifications inévitables de structure qu'entraîne son introduction permettent, en outre, de souligner que les protéines artificiellement iodées ne sont pas homologues des protéines natives à partir desquelles elles sont préparées. Si, dans de nombreux cas, les différences constatées ne sont pas assez importantes pour restreindre leur utilisation, l'interprétation des résultats auxquels elles conduisent devrait en tenir compte.

BIBLIOGRAPHIE

1. ROCHE, J., MICHEL, R. et LAFON, M. — *Biochim. Biophys. Acta*, **1** : 453 (1947).
2. EDELHOCH, H. — *J. Biol. Chem.*, **237** : 2788 (1962).
3. KLEBANOFF, S. J., YIP, C. C. et KESSLER, D. — *Biochim. Biophys. Acta*, **58** : 563 (1962).
4. YIP, C. C. et KLEBANOFF, S. J. — *Biochim. Biophys. Acta*, **74** : 747 (1963).
5. LJUNGGRENN, J. G. — *Acta Chem. Scand.*, **17** : 567 (1963).
6. YIP, C. et KLEBANOFF, S. J. — *Biochim. Biophys. Acta*, **82** : 276 (1964).
7. Voir les revues d'ensemble (par MCFARLANE, BIANCHI, ANDERSEN, REGOECZI, etc.) du Colloque de Pise, sur les Protéines Iodées.
8. Voir les revues d'ensemble (par YALOW, GREENWOOD, etc.) du Colloque de Pise, sur les Hormones Iodées.
9. OLCOTT, H. S. et FRAENKEL-CONRAT, H. — *Chem. Rev.*, **41** : 151 (1947).
10. HERRIOTT, R. M. — *Advan. Protein Chem.*, **3** : 110 (1947).
11. RAMACHANDRAN, L. K. — *Chem. Rev.*, **56** : 199 (1956).
12. GRUEN, L., LASKOWSKI, M. et SCHERAGA, H. A. — *J. Biol. Chem.*, **234** : 2050 (1959).
13. DE ZOETEN, L. W. et HAVINGA, E. — *Rec. Trav. Chim.*, **80** : 917 (1961).
14. SPRINGELL, P. H. — *Biochim. Biophys. Acta*, **63** : 136 (1962).
15. CHA, C. Y. et SCHERAGA, H. A. — *J. Biol. Chem.*, **238** : 2958 (1963).
16. CHA, C. Y. et SCHERAGA, H. A. — *J. Biol. Chem.*, **238** : 2965 (1963).
17. DONOVAN, L. G. — *Biochim. Biophys. Acta*, **78** : 474 (1963).
18. KOSHLAND, M. E., ENGLBERGER, F. M., ERWIN, M. J. et GADDONE, S. M. — *J. Biol. Chem.*, **238** : 1343 (1963).
19. HARTDEGEN, F. J. et RUPLEY, J. A. — *Biochim. Biophys. Acta*, **92** : 625 (1964).
20. DI SABATO, G. — *Biochemistry*, **4** : 2288 (1965).
21. COVELLI, I. et WOLFF, J. — *Biochemistry*, **5** : 860 (1966).
22. COVELLI, I. et WOLFF, J. — *Biochemistry*, **5** : 867 (1966).
23. SIMPSON, R. T. et VALLÉE, B. L. — *Biochemistry*, **5** : 1760 (1966).
24. HUGHES, W. L. et STRAESSLE, R. J. — *J. Am. Chem. Soc.*, **72** : 452 (1950).

25. ROCHE, J. et MICHEL, R. — *Advan. Protein Chem.*, **6** : 253 (1951).
26. BANERJEE, R. N. et EKINS, R. P. — *Nature*, **192** : 746 (1961).
27. ROSA, U. — Actes sur les méthodes de préparation de molécules marquées, Euratom éd., p. 197, Bruxelles (1964).
28. FRANCIS, C. E., MULLIGAN, W. et WORMALL, A. — *Nature*, **167** : 748 (1951).
29. HUNTER, W. M. et GREENWOOD, F. C. — *Nature*, **194** : 495 (1962).
30. GREENWOOD, F. C., HUNTER, W. M. et GLOVER, J. S. — *Biochem. J.*, **89** : 114 (1963).
31. HUGHES, W. L. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **70** : 3 (1957).
32. CECIL, R. et MCPHEE, J. R. — *Advan. Protein Chem.*, **14** : 255 (1959).
33. ROCHE, J. et MICHEL, R. — *Biochim. Biophys. Acta*, **2** : 97 (1948).
34. MAYBERRY, W. E., RALL, J. E. et BERTOLI, D. A. — *J. Am. Chem. Soc.*, **86** : 5302 (1964).
35. MAYBERRY, W. E. et BERTOLI, D. A. — *J. Org. Chem.*, **30** : 2029 (1965).
36. MCFARLANE, A. S. — *Nature*, **182** : 53 (1958).
37. SAMOLS, R. et WILLIAMS, H. S. — *Nature*, **190** : 1211 (1961).
38. IZZO, J. L., BALE, W. F., IZZO, M. J. et RONCONE, A. — *J. Biol. Chem.*, **239** : 3743 (1964).
39. SHAW, P. D., BECKWITH, J. R. et HAGER, L. P. — *J. Biol. Chem.*, **234** : 2560 (1959).
40. SHAW, P. D. et HAGER, L. P. — *J. Biol. Chem.*, **234** : 2565 (1959).
41. SHAW, P. D. et HAGER, L. P. — *J. Biol. Chem.*, **236** : 1626 (1961).
42. MORRIS, D. et HAGER, L. P. — *J. Biol. Chem.*, **241** : 1320 (1966).
43. DEMPEY, E. W. — *Endocrinology*, **34** : 27 (1944).
44. DE ROBERTIS, E. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **50** : 317 (1949).
45. TAUROG, A., POTTER, G. D. et CHAIKOFF, I. L. — *J. Biol. Chem.*, **213** : 119 (1955).
46. SERIF, G. S. et KIRKWOOD, S. — *J. Biol. Chem.*, **233** : 109 (1958).
47. ALEXANDER, N. M. — *J. Biol. Chem.*, **234** : 1530 (1959).
48. CUNNINGHAM, B. A. et KIRKWOOD, S. — *J. Biol. Chem.*, **236** : 485 (1961).
49. DE GROOT, L. J. et DAVIS, A. M. — *J. Biol. Chem.*, **236** : 2009 (1961).
50. HOSOYA, T. et UI, N. — *Nature*, **192** : 659 (1961).
51. IGO, R. P. et MACKLER, B. — *Arch. Biochem. Biophys.*, **95** : 12 (1961).
52. SUZUKI, M., NAGASHIMA, M. et YAMAMOTO, K. — *Gen. Comp. Endocrinol.*, **1** : 103 (1961).
53. ALEXANDER, N. M. et CORCORAN, B. J. — *J. Biol. Chem.*, **237** : 243 (1962).
54. DE GROOT, L. J. et DAVIS, A. M. — *Endocrinology*, **70** : 492 (1962).
55. DE GROOT, L. J. et DAVIS, A. M. — *Endocrinology*, **70** : 505 (1962).
56. HOSOYA, T. — *J. Biochem.*, **53** : 86 (1963).
57. HOSOYA, T. — *J. Biochem.*, **53** : 381 (1963).
58. HOSOYA, T., KONDO, Y. et UI, N. — *J. Biochem.*, **52** : 180 (1963).
59. MALOOF, F. et SOODAK, M. — *Pharmacol. Rev.*, **15** : 43 (1963).
60. MALOOF, F. et SOODAK, M. — *J. Biol. Chem.*, **239** : 1955 (1964).
61. IGO, R. P., MAHONEY, C. P. et MAKLER, B. — *J. Biol. Chem.*, **239** : 1893 (1964).
62. YIP, C. C. — *Biochim. Biophys. Acta*, **90** : 216 (1964).
63. HOSOYA, T. et MORRISON, M. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20** : 27 (1965).
64. YIP, C. C. — *Biochim. Biophys. Acta*, **96** : 75 (1965).
65. NUNEZ, J., POMMIER, J., EL HILALI, M. et ROCHE, J. — *J. Labelled Compounds*, **1** : 128 (1965).
66. TAUROG, A. et HOWELLS, E. M. — *J. Biol. Chem.*, **241** : 1320 (1966).
67. GROSS, A. J. et SIZER, I. W. — *J. Biol. Chem.*, **234** : 1611 (1959).
68. YAMAZAKI, I. et PIETTE, L. — *Biochim. Biophys. Acta*, **50** : 62 (1961).
69. YAMAZAKI, I., MASON, H. S. et PIETTE, L. — *J. Biol. Chem.*, **235** : 2444 (1965).
70. CUNNINGHAM, L. W. — *Biochemistry*, **3** : 1629 (1964).
71. EDELHOCH, H. et LIPPOLDT, R. E. — *J. Biol. Chem.*, **237** : 2788 (1962).
72. INGBAR, S. H., ASKONAS, B. A. et WORK, T. S. — *Endocrinology*, **64** : 110 (1959).
73. ROCHE, J., NUNEZ, J. et GRUSON, M. — *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **154** : 2194 (1960).
74. UI, N., TARUTANI, O., KONDO, Y. et TAMURA, H. — *Nature*, **191** : 1199 (1961).
75. ROBBINS, J. — *J. Biol. Chem.*, **238** : 182 (1963).

76. NUNEZ, J., MAUCHAMP, J., POMMIER, J., CIRCOVIC, T. et ROCHE, J. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23** : 761 (1966).
77. EDELHOCH, H. et LIPPOLDT, R. E. — *J. Biol. Chem.*, **235** : 1325 (1960).
78. EDELHOCH, H. — *J. Physical Chem.*, **64** : 1771 (1960).
79. SELLIN, H. G. et GOLDBERG, I. H. — *J. Biol. Chem.*, **240** : 774 (1965).
80. GOLDBERG, I. H. et SEED, R. W. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19** : 615 (1965).
81. CARTOUZOU, G., AQUARON, R. et LISSITZKY, S. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15** : 82 (1964).
82. ALEXANDER, N. M. — *Endocrinology*, **74** : 273 (1964).
83. ROCHE, J., MICHEL, R., MICHEL, O. et LISSITZKY, S. — *Biochim. Biophys. Acta*, **9** : 161 (1952).
84. MARTIN, R. B., EDSALL, J. T., WETLAUFER, D. B. et HOLLINGWORTH, B. R. — *J. Biol. Chem.*, **233** : 1429 (1958).
85. HERRIOTT, R. M. — *J. Gen. Physiol.*, **31** : 19 (1947).
86. GEMMILL, C. L. — *Arch. Biochem. Biophys.*, **54** : 359 (1965).
87. DE CROMBRUGGHE, B., EDELHOCH, H. et PITT-RIVERS, R. — *In* Topics in thyroid research, Cassano et Andreoli éds., Acad. Press Inc., New York, 1965, p. 145.
88. SEED, R. W. et GOLDBERG, I. H. — *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **50** : 275 (1963).
89. SEED, R. W. et GOLDBERG, I. H. — *J. Biol. Chem.*, **240** : 764 (1965).
90. LISSITZKY, S., ROQUES, M., TORRESANI, J. et SIMON, Cl. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47** : 1999 (1965).
91. NUNEZ, J., MAUCHAMP, J. et ROCHE, J. — *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **157** : 755 (1963).
92. NUNEZ, J., MAUCHAMP, J. et ROCHE, J. — *Biochim. Biophys. Acta*, **107** : 247 (1965).
93. NUNEZ, J., MAUCHAMP, J. et ROCHE, J. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20** : 71 (1965).