

DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DE LA THYROXINE, DE LA DIIODOTYROSINE ET DE LA MONOIODOTYROSINE. APPLICATION AUX PROTÉINES IODÉES

par

JEAN ROCHE ET RAYMOND MICHEL

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Marseille (France)

INTRODUCTION ET OBJET DU TRAVAIL

Les thyroglobulines des divers animaux renferment de la thyroxine (3.5.3'.5'-tétraiodothyronine) et de la 3.5-diiodotyrosine et, par ailleurs, la 3-monoiodotyrosine a été isolée de certaines protéines artificiellement iodées (HARINGTON⁶, HARINGTON et RANDALL⁸, HARINGTON et PITT RIVERS⁷, HERRIOTT¹⁰, LUDWIG et MUTZENBECHER¹⁵, REINEKE et TURNER²²). Plusieurs méthodes permettent actuellement de déterminer la teneur en thyroxine et en diiodotyrosine des unes et des autres, tandis qu'il n'en existe aucune pour y doser la monoiodotyrosine. Nous nous sommes proposés de réaliser le dosage des trois acides aminés iodés par des techniques nouvelles, basées sur des réactions colorées spécifiques de chacun dans des conditions opératoires bien définies. Une brève discussion de travaux antérieurs est nécessaire pour justifier l'objet de nos recherches.

La mise en liberté des acides aminés iodés par hydrolyse des protéines et leur dosage proprement dit posent deux problèmes distincts. Les travaux d'HARINGTON et RANDALL⁸, de LELAND et FOSTER¹³, de BLAU^{2, 3}, ont résolu le premier, alors que l'étude du second méritait d'être reprise. L'hydrolyse des protéines par les acides minéraux ou par la soude en présence de stannite de sodium libère l'halogène de la thyroxine et de la diiodotyrosine et donne naissance en quantité isomoléculaire à de la thyronine et à de la tyrosine; le dosage colorimétrique de celles-ci au moyen de la réaction de MILLON permet alors indirectement celui de la thyroxine et de la diiodotyrosine (calcul de „l'extratyrosine" formée sous l'action des réactifs) (BRAND et KASSEL⁴). Les méthodes reposant sur ce principe ou sur la désioduration des acides aminés halogénés au moyen de l'hydrazine (PAAL et MOTZ²⁰, MICHEL¹⁷) donnent des résultats satisfaisants sur les solutions de ces corps purs, mais elles ne sont pas applicables aux protéines renfermant de la monoiodotyrosine, laquelle se comporte alors comme son isologue diiodé. De ce fait, il convient de ne pas les mettre en oeuvre sur des protéines iodées par voie chimique et leur emploi sur des produits thyroïdiens ne conduit pas à coup sûr à des résultats rigoureux, car il est possible que les thyroglobulines ne soient pas entièrement dépourvues de monoiodotyrosine. L'hydrolyse par la soude ou par la baryte a été en général adoptée; elle doit être réalisée dans des conditions soigneusement définies pour ne provoquer qu'une faible décomposition des acides aminés iodés. La soude (action de NaOH N pendant 4 heures à ébullition selon HARINGTON et RANDALL⁹, de NaOH 2 N pendant 18 heures à ébullition, selon LELAND et FOSTER¹³) transforme de 10 à 15 pour 100 de l'iode thyroïdien en iodure alcalin, tandis que l'hydrolyse barytique (action de Ba(OH)₂ à 8 pour 100

pendant 6 heures au bain-marie) libre au plus 5 pour 100 de l'iode thyroxinien (BLAU³). Cette dernière méritait donc d'être retenue.

Le dosage des acides aminés iodés dans un hydrolysats protéique doit nécessairement être basé soit sur une réaction spécifique de chacun avant ou après désioduration, soit sur une réaction non spécifique appliquée à des fractions de l'hydrolysats ne renfermant que l'un de ces corps. La séparation des constituants iodés des protéines et le dosage de l'halogène dans diverses fractions des hydrolysats ont été adoptées par tous les auteurs, à l'exception de BRAND et KASSEL⁴, dont la méthode a été discutée plus haut. Elle est réalisée soit par insolubilisation de la thyroxine à $p_H = 4.5$ (HARINGTON et RANDALL⁹) soit par extraction de celle-ci dans le butanol. Cette dernière opération isole la totalité de la thyroxine et des traces de diiodotyrosine lorsqu'elle est poursuivie sur un milieu sodique (LELAND et FOSTER¹³); de même, la précipitation à $p_H = 4.5$ entraîne la thyroxine souillée du dérivé diiodé. L'extraction butanolique des hydrolysats barytiques amenés à $p_H = 4.5$ suivie du lavage à la soude de la solution butanolique conduit à la séparation quantitative de la thyroxine et des autres acides aminés iodés (BLAU³). HARINGTON et RANDALL, LELAND et FOSTER, BLAU, ont proposé de doser la thyroxine en déterminant la teneur en iode de la fraction des hydrolysats renfermant ce corps et de calculer le taux de diiodotyrosine par différence entre l'iode total et l'iode thyroxinien. Or, la monoiodotyrosine accompagne le dérivé dihalogéné dans les iodoprotéines, en sorte que l'iode non thyroxinien y est réparti entre la monoiodotyrosine et la diiodotyrosine dans des proportions qui ne peuvent pas alors être précisées. On peut donc espérer, d'une part, doser la thyroxine avec plus de sécurité et, d'autre part, déterminer les taux respectifs de diiodotyrosine et de monoiodotyrosine, si l'on met en oeuvre des propriétés plus spécifiques de ces corps que la présence de l'halogène dans la molécule de chacun.

Les solutions chlorhydriques de nombreux orthodiiodophénols se colorent en rouge orangé par addition de nitrite de sodium et virent par la suite au rouge après alcalinisation par l'ammoniaque. Cette réaction, fortement positive avec la thyroxine et la diiodotyrosine (KENDALL et OSTERBERG¹², INGVALDSEN et CAMERON¹¹, HARINGTON⁶) est négative avec la monoiodotyrosine et la tyrosine (HARINGTON et PITT RIVERS⁷). Par ailleurs, ces deux dernières donnent la réaction dite de MILLON (coloration rouge en présence de sulfate mercurique et d'acide nitreux), tandis que tel n'est pas le cas pour les deux premières⁷. Dès lors, il était légitime d'entreprendre des recherches sur l'application de ces réactions au dosage des divers acides aminés iodés et tel est l'objet de notre travail. Au cours de celui-ci nous avons mis en oeuvre la réaction aux ions nitreux pour le dosage de la thyroxine et de la diiodotyrosine, après séparation de ces corps au moyen de leurs différences de solubilité dans le butanol à divers p_H , et la réaction de MILLON pour le dosage de la monoiodotyrosine. Un récent mémoire de MORTON et CHAIKOFF¹⁹ envisage l'application de la première de ces réactions au dosage de la thyroxine et de la diiodotyrosine pures, sans en donner une étude détaillée. Les recherches de ces auteurs, parvenues à notre connaissance alors que les nôtres étaient en cours, ne font nullement double emploi avec elles.

Nous exposerons successivement l'étude du dosage des acides aminés iodés en solution pure, dans leurs mélanges et dans les protéines thyroïdiennes ou iodées par voie chimique.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. DOSAGE DE LA THYROXINE ET DE LA DIIODOTYROSINE EN SOLUTION PURE ET DANS LEUR MÉLANGE EN PRÉSENCE D'AUTRES ACIDES AMINÉS

Il convenait tout d'abord d'étudier la réaction colorée de la thyroxine et de la diiodotyrosine aux ions nitreux en vue de son adaptation au dosage de ces corps à l'état pur, comme l'ont envisagé indépendamment de nous MORTON et CHAIKOFF¹⁹. Nous avons recherché par la suite dans quelle mesure cette réaction est spécifique des deux acides aminés iodés en présence d'autres non halogénés. Enfin, nous avons appliqué le dosage de la thyroxine et de la diiodotyrosine pures à leur mélange après avoir réalisé le fractionnement de ce dernier.

1. Etude de la réaction colorée de la thyroxine et de la diiodotyrosine et dosage de ces corps à l'état pur

Les solutions chlorhydriques de thyroxine ou de diiodotyrosine* additionnées de nitrite de sodium se colorent en jaune et virent ensuite à l'orangé par ébullition, puis au rouge brun par alcalinisation à l'ammoniaque. Après divers essais, nous avons éliminé la teinte brune apparaissant irrégulièrement dans le dernier temps de la réaction et sensibilisé celle-ci en opérant dans des conditions particulières. Les réactifs nécessaires sont** :

Solution I: (a) Dissoudre 2.50 mg de diiodotyrosine dans 10 ml NaOH 10 N, ajouter 25 ml H₂O puis 10 ml HCl 10.5 N et H₂O q.s.p. 50 ml. (b) Dissoudre 5.00 mg de thyroxine dans 20 ml NaOH 0.1 N. Solution II: (a) Ajouter à 10 ml NaOH 10 N, 10 ml HCl pur, $d = 1.19$, titrant 10.5 N, et H₂O q.s.p. 50 ml. (b) Mélanger 14.3 ml NaOH 10 N avec 14.3 ml HCl 10.5 N et compléter à 50 ml avec H₂O. Solution III: Solution à 1 pour 100 de nitrite de sodium fraîchement préparée. Ammoniaque concentrée (20 pour 100 NH₄OH). Ethanol à 95°.

Le mode opératoire est le suivant: On place dans un tube à centrifuger conique une prise d'essai de solution I (5 ml ou moins) renfermant 100 à 300 γ de thyroxine (I b) ou 50 à 200 γ de diiodotyrosine (I a) et l'on complète en cas de besoin à 5 ml avec de la solution II (a ou b selon l'emploi de solution I a ou b). On ajoute 2.5 ml d'alcool à 95° puis, après agitation, 1 ml de solution III. Il se développe alors une coloration jaune atteignant son maximum d'intensité en 10 minutes à la température du laboratoire. Ce temps écoulé, on ajoute 1.50 ml d'ammoniaque concentrée et l'on mélange. Le milieu prend une teinte rouge, stable pendant 15 à 20 minutes. On centrifuge le fin précipité salin prenant naissance et l'on mesure l'intensité de la coloration au photomètre de PULFRICH, sous 2 cm d'épaisseur et en lumière filtrée par l'écran S₅₀.

La réaction est plus intense avec la diiodotyrosine qu'avec la thyroxine. Elle est sensibilisée par le chlorure de sodium et plus ou moins forte selon l'acidité du milieu et la concentration de celui-ci en acide nitreux. Il est donc indispensable de l'opérer dans des conditions toujours identiques pour réaliser des mesures photométriques comparables entre elles. Le tableau I indique l'intensité de la coloration apparaissant en présence de 50 à 200 γ de diiodotyrosine ou de 100 à 300 γ de thyroxine dans les essais réalisés selon le mode opératoire choisi.

Dans les limites de 100 à 300 γ pour la thyroxine et de 50 à 200 γ pour la diiodotyrosine

* La *l*-thyroxine et la *l*-diiodotyrosine employées pour ce travail présentaient les teneurs en iode suivantes: thyroxine, 1% théorique = 65.35, trouvé = 65.05; diiodotyrosine, 1% théorique = 58.63, trouvé = 57.30. Nous remercions la Maison HOFFMANN-LA ROCHE de nous avoir fourni ces produits.

** Les réactifs (a) sont particuliers à la diiodotyrosine, (b) à la thyroxine.

la réaction suit la loi de BEER-LAMBERT, l'intensité des colorations obtenues étant alors proportionnelle aux quantités d'acide aminé. Il en découle que l'on peut doser l'un et

TABLEAU I

INTENSITÉ DE LA RÉACTION COLORÉE DE LA THYROXINE ET DE LA DIIODOTYROSINE AUX IONS NITREUX
(FILTRE S_{60} , 2 cm)

Gamma de thyroxine	Coefficient d'absorption (ϵ)	Gamma de diiodotyrosine	Coefficient d'absorption (ϵ)
121	0.20	50	0.12
169	0.25	61	0.14
181	0.28	92	0.20
226	0.34	100	0.22
241	0.36	122	0.25
282	0.43	150	0.32
301	0.45	200	0.41

l'autre des deux corps en solution pure en appliquant la technique décrite plus haut et en se référant à des courbes d'étalonnage établies sur des quantités connues de chacun.

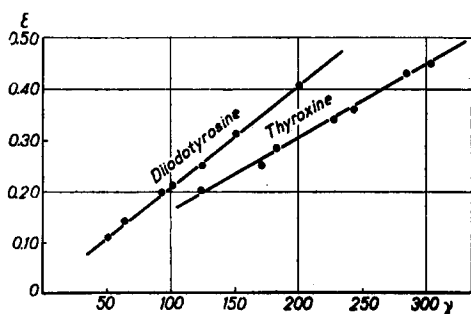


Fig. 1. Courbe d'étalonnage de la réaction colorée de la thyroxine et de la diiodotyrosine (cuve de 2 cm, écran S_{60}). Abscisses : γ de thyroxine ou de diiodotyrosine, Ordonnées : coefficient d'absorption

Les données rapportées ci-dessus ont été utilisées pour élaborer deux courbes de ce type reproduites sur la Figure 1.

2. Spécificité de la réaction

Comme l'ont signalé HARINGTON et PITT RIVERS, la monoiodotyrosine ne donne pas de réaction colorée en présence d'ions nitreux (essais poursuivis sur 100 à 400 γ)*. Il en est de même de l'acide glutamique, du glyocolle, de l'histidine, de la méthionine, de la phénylalanine, de la proline et de la sérine (5 mg), de l'arginine et de la leucine (10 mg). Par contre, il se développe une teinte jaune en présence de tryptophane ou de tyrosine et une réaction rouge dans les solutions de dioxyphénylalanine additionnées de nitrite de sodium dans les conditions définies plus haut. Le dernier de ces acides aminés étant

* Nos observations confirment à cet égard celles d'HARINGTON et PITT RIVERS et sont, comme les leurs, en contradiction avec celles faites par LUDWIG et MUTZENBECHER¹⁵ et par HERRIOTT¹⁰ sur un produit isolé par ces derniers d'hydrolysats de protéines artificiellement iodées. Il est possible que ces divergences soient dues à la présence de diiodotyrosine dans les préparations d'HERRIOTT et de LUDWIG et MUTZENBECHER, alors que tel n'est pas le cas dans celles de 3-monoiodotyrosine de synthèse utilisées par HARINGTON et PITT RIVERS comme par nous. Nous remercions très vivement M. le Professeur HARINGTON d'avoir mis à notre disposition l'échantillon de 3-monoiodotyrosine de synthèse (1% théorique = 42.10, trouvé = 41.35) sur lequel nos recherches ont été poursuivies.

absent des hydrolysats protéiques, on ne saurait en attendre de perturbation dans l'application de la méthode à ces milieux. Quant au tryptophane et à la tyrosine, l'intensité de leur réaction est illustrée par les données rassemblées dans le tableau II, déterminées par le mode opératoire adopté pour le dosage des acides aminés iodés en solution pure.

TABLEAU II

INTENSITÉ DE LA RÉACTION COLORÉE DU TRYPTOPHANE ET DE LA TYROSINE AUX IONS NITREUX
(FILTRE S_{50} , 2 cm)

mg de tryptophane	Coefficient d'absorption (ϵ)	mg de tyrosine	Coefficient d'absorption (ϵ)
0.50	0.01	0.50	0.015
1.00	0.01	1.00	0.025
3.00	0.03	2.50	0.08
5.00	0.05	5.00	0.19

La coloration due à 1 mg de tryptophane est donc négligeable, tandis que celle se manifestant en présence de tyrosine devra nécessairement être retenue lors du dosage des acides aminés iodés dans les protéines.

3. Dosage de la thyroxine et de la diiodotyrosine dans leurs mélanges

Le dosage des deux acides aminés iodés décrit plus haut comporte une précision de ± 2 pour 100 sur les solutions pures de chacun, mais son intérêt serait très limité s'il ne pouvait pas être appliqué à des mélanges de ces corps. Or, les travaux d'HARINGTON et RANDALL, de LELAND et FOSTER, de BLAU, ont précisé les conditions dans lesquelles ceux-ci peuvent être séparés quantitativement grâce à leurs différences de solubilité dans le butanol. L'extraction par ce dernier de milieux sodiques (NaOH 2 N) entraîne la thyroxine dans la phase alcoolique, la diiodotyrosine demeurant alors dans la phase aqueuse. Nous réservant de décrire par la suite en détail le mode opératoire adopté pour fractionner les acides aminés iodés dans les hydrolysats protéiques, nous nous bornerons à signaler ici que les quantités de chacun mises en expérience ont été retrouvées à ± 2 pour 100 près. Il est donc possible de doser la thyroxine et la diiodotyrosine dans leurs mélanges à l'aide de la méthode colorimétrique établie sur les solutions pures de ces corps, grâce à leur séparation quantitative par extraction de la thyroxine au butanol.

II. DOSAGE DE LA MONIODOTYROSINE EN SOLUTION PURE ET EN PRÉSENCE DE DIVERS ACIDES AMINÉS

Le dosage de la tyrosine a été basé par de nombreux auteurs sur la réaction dite de MILLON, commune à de multiples phénols (coloration rouge orangé en présence de sulfate mercurique et d'ion nitreux). Cette réaction se manifeste dans les solutions de moniodotyrosine, mais non dans celles de diiodotyrosine ou de thyroxine; aussi pouvait on espérer doser le premier de ces corps en solution pure à l'aide d'une méthode élaborée antérieurement pour doser la tyrosine. Par ailleurs, les caractères spectraux des dérivés colorés des deux acides aminés présentant de sensibles différences, nous avons mis ces dernières à profit pour doser la moniodotyrosine en présence de tyrosine.

1. Application à la monoiodotyrosine du dosage colorimétrique de la tyrosine (LUGG)

Nous avons appliqué à des solutions titrées de 3-monoiodotyrosine pure (HARINGTON et PITT RIVERS) le dosage de la tyrosine décrit par LUGG¹⁶, dont nous rappellerons le mode opératoire.

Les réactifs nécessaires sont :

Solution I : solution de monoiodotyrosine à 0.05 pour 100 dans SO_4H_2 0.7 N, fraîchement préparée.

Solution II : dissoudre dans 770 ml H_2O additionnés de 79 ml SO_4H_2 concentré 75 g SO_4Hg purifié, 55 g HgCl_2 , 70 g SO_4Na_2 et compléter à 1000 ml avec H_2O .

Solution III : solution de nitrite de sodium à 6.9 pour 100 fraîchement préparée.

SO_4H_2 0.7 N.

La technique du dosage est la suivante : On place dans un tube à essai en verre pyrex un volume de solution I égal au plus à 5 ml et renfermant de 0.5 à 2.5 mg de monoiodotyrosine et l'on complète à 5 ml, si besoin est, par SO_4H_2 0.7 N. Après avoir ajouté 5 ml de solution II on porte pendant 30 minutes au bain-marie à 60°, on refroidit sous un courant d'eau, on complète à 25 ml avec de la solution III, puis on ajoute 0.5 ml de solution IV. Il se développe alors une coloration rouge. Après agitation et, s'il y a lieu, centrifugation des fines particules de composés mercuriques en suspension, on mesure l'intensité de l'absorption dans les quinze minutes au photomètre de PULFRICH (cuve de 2 cm, lumière filtrée par l'écran S_{50}). On trouvera dans le tableau III un exemple des résultats obtenus entre 0.48 et 2.63 mg de produit.

TABLEAU III

INTENSITÉ DE LA RÉACTION DE MILLON DONNÉE PAR LA 3-MONOIODOTYROSINE (FILTRE S_{50} , 2 cm)

mg de monoiodotyrosine mis en expérience	Coefficient d'absorption (ϵ)
0.48	0.20
0.75	0.30
0.97	0.38
1.23	0.50
1.50	0.59
2.63	1.04

Ces données s'ordonnent suivant une droite passant pratiquement par l'origine, laquelle constitue la courbe d'étalonnage de la réaction de MILLON en présence de monoiodotyrosine dans les conditions opératoires adoptées. Il suffit d'y reporter la valeur expérimentale du coefficient d'absorption déterminée sur une prise d'essai pour connaître la quantité de l'acide aminé qu'elle renferme. La précision des résultats est égale à ± 2 pour 100 sur 0.50 à 2.80 mg de monoiodotyrosine.

2. Etude spectrophotométrique de la réaction de MILLON en présence de tyrosine et de monoiodotyrosine et dosage de ces acides aminés dans leur mélange

La réaction de MILLON n'est pas identique en présence de tyrosine et de monoiodotyrosine ; elle est rouge orangé avec la première et rouge carmin avec la seconde et, par ailleurs, son intensité est nettement plus forte dans le cas de la tyrosine. Aussi l'étude de l'absorption quantitative des produits colorés dérivant des deux acides aminés était-elle susceptible de comporter des applications analytiques.

Le spectre des solutions 10^{-2} millimoléculaires de tyrosine et de 3-monoiodotyrosine* traitées dans les conditions de leur dosage par la méthode de LUGG présente les caractères que traduisent les données numériques suivantes, à partir desquelles la Figure 2 a été établie (voir tableau IV**).

TABLEAU IV

ABSORPTION DES PRODUITS DE LA RÉACTION DE MILLON OPÉRÉE SUR LA 3-MONOIODOTYROSINE ET SUR LA TYROSINE PURES

Longueur d'onde (en unités Angström)	Coefficient d'absorption (ϵ) pour une concentration 1.10^{-2} milli moléculaire (sous 2 cm)	
	3-monoiodotyrosine	tyrosine
6400	0.105	0.036
6200	0.195	0.117
6000	0.277	0.255
5800	0.397	0.385
5600	0.518	0.560
5400	0.637	0.734
5300	0.660	0.865
5200	0.688	0.950
5100	0.684	1.008
5000	0.652	1.051
4900	—	1.056
4800	0.616	1.058
4600	0.457	0.945
4400	0.327	0.725
4200	0.254	0.523

L'absorption des solutions de monoiodotyrosine est maxima au voisinage de 5200 Å, alors que celle des solutions de tyrosine l'est à environ 4800 Å; elle est par ailleurs beaucoup plus intense dans ces dernières. Aussi avons-nous cherché à doser les deux acides aminés dans leurs mélanges par des mesures du coefficient d'extinction de leurs solutions présentant la réaction de MILLON, opérées à deux longueurs d'onde différentes, comprises dans la région du spectre où chacun absorbe le plus fortement la lumière.

Principe de la méthode. La solution renfermant de la monoiodotyrosine et de la tyrosine est soumise à l'action des réactifs y provoquant le développement de la coloration (réaction de MILLON, technique de LUGG). On mesure ensuite l'absorption du milieu à deux longueurs d'onde voisines des sommets respectifs des bandes caractéristiques des dérivés de la monoiodotyrosine et de la tyrosine (Figure 2) au moyen du photomètre de PULFRICH. Les positions approchées des maxima étant respectivement

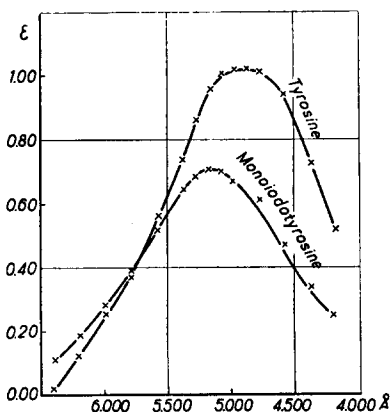


Fig. 2. Spectre d'absorption des produits de la réaction de MILLON sur la monoiodotyrosine et sur la tyrosine pures. Abscisses: longueurs d'onde (Å). Ordonnées: coefficient d'absorption (ϵ) des solutions 1.10^{-2} mM sous 2 cm d'épaisseur

* La *l*-tyrosine ayant servi à les essais renfermait 7.70% N (valeur théorique: 7.74) et la 3-monoiodotyrosine (HARINGTON) 42.10% I (valeur théorique: 41.35).

** Nous remercions M. le Professeur DUBOULOZ d'avoir bien voulu établir ces données à l'aide d'un spectrophotomètre à cellule construit par ses soins et permettant des mesures d'une grande précision

5200 Å pour la monoiodotyrosine et 4800 Å pour la tyrosine, on procède à deux mesures successives en lumière filtrée par les écrans S_{53} et S_{47} , sélectifs au voisinage de ces deux longueurs d'onde. Soient M et m les valeurs du coefficient d'extinction d'un mélange inconnu établies sous une épaisseur donnée (2 cm dans nos essais). On détermine par ailleurs dans les mêmes conditions celles propres à des solutions isomoléculaires de monoiodotyrosine et de tyrosine pures renfermant une quantité connue C de chacun. Soient T et t d'une part, I et i d'autre part les coefficients d'absorption des quantités C de tyrosine et de monoiodotyrosine en lumières filtrées par les écrans S_{53} et S_{47} . Les quantités x de monoiodotyrosine et y de tyrosine présentes dans le mélange initialement étudié peuvent être calculées à partir des équations :

$$(1) M = \frac{I}{C} x + \frac{T}{C} y \quad \text{et} \quad (2) m = \frac{i}{C} x + \frac{t}{C} y$$

Or, l'intensité de la réaction de MILLON donnée par les deux acides aminés purs suit la loi de BEER-LAMBERT entre des valeurs de C allant de 0.15 à 0.90 10^{-2} mM pour la monoiodotyrosine et de 0.12 à 0.60 10^{-2} mM pour la tyrosine, comme en témoignent les données du Tableau V.

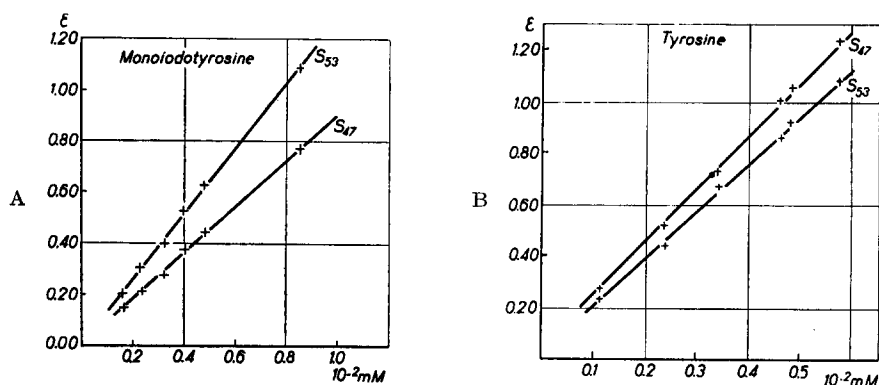


Fig. 3. Courbes d'étalonnage de la réaction de MILLON de la 3-monoiodotyrosine (A) et de la tyrosine (B) en lumières filtrées par les écrans S_{53} et S_{47} du photomètre de PULFRICH (cuve de 2 cm). Abscisses : concentration en acide aminé (en 1.10^{-2} mM). Ordonnées : coefficient d'absorption (ϵ)

Des courbes d'étalonnage de la réaction colorée des deux acides aminés en lumière filtrée par les écrans S_{53} et S_{47} peuvent être établies à partir de ces valeurs. Comme le montre l'examen de la Figure 3, elles sont constituées par des droites pratiquement convergentes vers l'origine et se prêtent à une détermination d' ϵ par extrapolation pour une concentration 1.10^{-2} mM des deux corps. Les valeurs d' ϵ ainsi obtenues sont respectivement : pour la monoiodotyrosine 1.25 et 0.90 avec les filtres S_{53} et S_{47} , pour la tyrosine 1.84 et 2.10 avec les mêmes écrans. Les rapports $\frac{I}{C}$, $\frac{i}{C}$, $\frac{T}{C}$ et $\frac{t}{C}$ définissent les coefficients

angulaires des courbes d'étalonnage; aussi l'introduction de leurs valeurs dans les équations précédentes permet-elle de calculer x et y connaissant M et m , soit :

$$x = \frac{2.10 M - 1.84 m}{0.97} \text{ en } 10^{-2} \text{ millimolécules de monoiodotyrosine, donc } x.3.07 \text{ en milligrammes de ce produit, et}$$

$y = \frac{1.25 m - 0.90 M}{0.97}$ en 10^{-2} millimolécules de tyrosine, donc $y.1.81$ milligrammes de celle-ci.

TABLEAU V

INTENSITÉ DE LA RÉACTION DE MILLON DONNÉE PAR LA 3-MONOIODOTYROSINE ET LA TYROSINE, MESURÉE EN LUMIÈRE FILTRÉE PAR LES ÉCRANS S_{53} ET S_{47} (2 cm)

Quantité de monoiodotyrosine C (1.10^{-2} mM)	Coefficient d'absorption (ϵ) avec le filtre	
	S_{53}	S_{47}
0.156	0.21	0.15
0.244	0.31	0.21 ₅
0.316	0.40	0.28 ₅
0.401	0.51 ₅	0.37
0.488	0.62	0.44
0.856	1.08	0.77

Quantité de tyrosine C (1.10^{-2} mM)	Coefficient d'absorption (ϵ) avec le filtre	
	S_{53}	S_{47}
0.116	0.23 ₅	0.27
0.232	0.44	0.50
0.348	0.66	0.73
0.464	0.85	0.97
0.487	0.91	1.02
0.580	1.08	1.22

Mode opératoire et résultats. Les opérations sont conduites comme pour le dosage de la monoiodotyrosine ou de la tyrosine pures, selon la technique de LUGG décrite plus haut. La précision la plus grande est obtenue lorsque les deux lectures qu'il convient de faire avec les filtres S_{53} et S_{47} correspondent à des valeurs d' ϵ comprises entre 0.8 et 1.1. On trouvera dans le tableau VI trois exemples de résultats obtenus sur des mélanges des deux acides aminés.

TABLEAU VI

EXEMPLES DE DOSAGES DE MONOIODOTYROSINE ET DE TYROSINE DANS DES MÉLANGES DE CES CORPS

Constituant du mélange dosé	Quantité (10^{-2} mM)			ϵ lu avec le filtre	
	théorique	retrouvée	Erreur p. 100	S_{53}	S_{47}
A. Monoiodotyrosine	0.039	0.041	+ 5.1	0.89	1.00
Tyrosine	0.414	0.432	+ 4.3		
B. Monoiodotyrosine	0.255	0.278	+ 6.3	0.79	0.75
Tyrosine	0.258	0.240	— 6.9		
C. Monoiodotyrosine	0.593	0.609	+ 2.6	0.95	0.76
Tyrosine	0.102	0.098	— 3.9		

La méthode est applicable à des prises d'essai renfermant de 0.25 à 1.00 mg de tyrosine et de 0.50 à 2.00 mg de monoiodotyrosine avec une erreur relative moyenne de ± 5 pour 100. Les données citées montrent que cette dernière est d'autant plus grande que l'écart entre les lectures faites avec les écrans S_{53} et S_{47} est moins important. Par ailleurs, on ne saurait espérer doser par ce procédé de très faibles quantités de l'un des acides

aminés en présence d'un fort excès de l'autre et il convient que le mélange renferme au moins 5 pour 100 de celui dont il est le plus pauvre. En pratique, il y a intérêt à faire un premier dosage d'orientation, sur une prise d'essai renfermant environ $0.2 \cdot 10^{-2}$ millimolécule du mélange afin d'obtenir un résultat approximatif, puis de réaliser un second dosage sur 0.6 à $0.7 \cdot 10^{-2}$ millimolécule si le milieu est beaucoup plus riche en monoiodotyrosine qu'en tyrosine, ou sur 0.4 à $0.5 \cdot 10^{-2}$ millimolécule dans le cas inverse.

III. DOSAGE DE LA THYROXINE, DE LA DIIODOTYROSINE ET DE LA MONOIODOTYROSINE DANS LES IODOPROTÉINES NATURELLES OU ARTIFICIELLES

L'application aux protéines des méthodes établies sur les solutions des acides aminés ne pouvait être faite sans une étude préalable indispensable à sa justification. Les travaux antérieurs renferment à cet égard des indications très utiles, surtout en ce qui concerne le dosage de la thyroxine, car la diiodotyrosine n'a été dosée jusqu'ici que par voie indirecte et la monoiodotyrosine ne l'a pas encore été. De ce fait, le dosage des deux derniers corps posait des problèmes plus étendus. En outre, il y avait lieu de préciser si un même mode opératoire peut être adopté pour les protéines thyroïdiennes et pour les iodoprotéines artificielles, car la composition des unes et des autres présente de notables différences. Les premières renferment de petites quantités de thyroxine et de diiodotyrosine, mais sont probablement dépourvues d'autres acides aminés iodés, tandis que l'on rencontre dans les hydrolysats des secondes de la thyroxine, de la diiodotyrosine, de la monoiodotyrosine et les dérivés halogénés du tryptophane et de l'histidine. Nous examinerons successivement les recherches poursuivies sur les deux types de protéine.

A. Dosage de la thyroxine

1. *Cas des protéines thyroïdiennes.* Les travaux de BLAU^{2, 3} ont établi que l'hydrolyse de ces protéines par la baryte à 8 pour 100 au bain-marie bouillant pendant 6 heures libère quantitativement la thyroxine sans décomposition importante de celle-ci (perte de 2 à 3 pour 100 de l'iode à l'état d'iodure). Par ailleurs, LELAND et FOSTER¹³ ont précisé les conditions dans lesquelles ce produit peut être séparé de la diiodotyrosine au moyen de son extraction par le butanol. Nous avons tout d'abord contrôlé que des solutions titrées de thyroxine additionnées de 8 pour 100 de baryte ne renferment après chauffage de 6 heures au bain d'huile à 115—120° que 2 à 4 pour 100 de leur iode à l'état d'iodures; 96 à 98 pour 100 de l'acide aminé sont alors retrouvés par la méthode colorimétrique décrite plus haut. Il en est de même de la thyroxine ajoutée à la thyroglobuline avant l'hydrolyse de celle-ci. Nous avons ensuite vérifié que l'extrait butanolique des hydrolysats porté à $pH = 3.5-4.0$ renferme la totalité de la thyroxine et que le lavage à la soude en élimine la diiodotyrosine. On n'y trouve plus alors que des quantités minimales de tyrosine (200γ environ pour 100 mg de thyroglobuline), trop faibles pour donner une réaction appréciable en présence d'ions nitreux et gêner le dosage. Les résultats de ces essais ont permis d'adopter la technique que nous proposons.

Réactifs nécessaires.

Solution I: mélanger 10 ml NaOH 10 N, 10 ml HCl 10.5 N, 25 ml éthanol à 95° et 30 ml H₂O*.

Solution II: solution à 1 pour 100 de nitrite de sodium fraîchement préparée.

Ammoniaque concentrée (20 pour 100), NaOH 5 N, HCl N, Ba(OH)₂, Butanol.

* La composition de ce réactif répond à la nécessité d'une certaine concentration en chlorure de sodium pour le développement complet de la réaction colorée et à celle d'une certaine teneur en éthanol du milieu pour assurer la dissolution de la thyroxine dans les derniers temps du dosage.

Mode opératoire. 50 à 200 mg de thyroglobuline ou de poudre de thyroïde* sont additionnés de 10 ml H₂O et de 0.8 Ba (OH)₂ et portés pendant 6 heures au bain d'huile à 115—120° sous réfrigérant à reflux. Après refroidissement, on transvase quantitativement dans une ampoule à décantation de 50 ml. On amène le milieu à p_H = 3.5—4.0 à l'aide d'HCl N (virage au bleu ardoisé du bleu de bromophénol) et l'on porte à 15 ml avec de l'eau distillée. Après addition de 15 ml de butanol on agite énergiquement et laisse reposer 12 heures; la totalité de la thyroxine passe alors en solution dans le butanol avec une partie de la diiodotyrosine. Pour éliminer celle-ci, on lave l'extrait butanolique avec de la soude 5 N (deux lavages, le premier avec 15 ml, le second avec 7.5 ml) en ayant soin de ne pas éliminer les produits insolubles rassemblés à la limite de séparation des deux liquides. On centrifuge, puis on décante le butanol, que l'on évapore à l'étuve à 70°. On reprend le résidu sec par 10 ml de la solution I et l'on dose la thyroxine sur une partie aliquote d'un volume égal ou inférieur à 7.5 ml et renfermant de 100 à 300 γ de ce corps.

Pour cela, on ajoute à l'échantillon prélevé autant de ml de solution I qu'il est nécessaire pour atteindre le volume total de 7.5 ml, puis 1 ml de solution II. On abandonne à 15° pendant 10 minutes, au cours desquelles il se développe une coloration jaune orangé, puis on ajoute 1.5 ml d'ammoniaque concentrée, ce qui provoque un virage au rouge. On centrifuge et l'on mesure, dans les 15 minutes qui suivent l'alcalinisation, l'intensité de la coloration au photomètre de PULFRICH sous 2 cm d'épaisseur et en lumière filtrée par l'écran S₅₀. On reporte le résultat obtenu sur une courbe d'étalonnage établie au préalable en opérant de la même manière sur des solutions titrées de thyroxine (100 à 300 γ), ce qui permet de déterminer la quantité de ce corps présente dans la prise d'essai**. Le tableau VII renferme des résultats obtenus sur deux hydrolysats d'une même thyroglobuline de boeuf, cités à titre d'exemple.

TABLEAU VII
EXEMPLE DE DOSAGE DE LA THYROXINE DANS UNE THYROGLOBULINE DE BOEUF

Quantité de protéine hydrolysée	Coefficient d'absorption (2 cm, filtre S ₈₀)	Thyroxine p. 100
50 mg	0.215	0.245
100 mg	0.420	0.236
	Témoin 0.025	

La méthode permet de doser la thyroxine à ± 3 pour 100 près dans 50 à 200 mg de thyroglobuline et dans 100 à 300 mg de poudre de thyroïde. Ses résultats sont identiques à ceux de la technique de BLAU, laquelle exige la mise en oeuvre de quantités beaucoup plus grandes de produit (500 mg au moins)***.

* La quantité minima de produit qu'il convient de soumettre à l'hydrolyse est fonction de sa teneur en thyroxine, assez variable dans les thyroglobulines.

** Il est recommandé, comme dans tous les dosages colorimétriques, de faire un essai témoin sur les réactifs mis en oeuvre dans les conditions du dosage, et, s'il y a lieu, de soustraire la valeur de ϵ ainsi déterminée de celle obtenue en présence de l'hydrolysat protéique. Dans cet essai à blanc ϵ ne doit pas dépasser 0.03.

*** Dans l'exemple cité plus haut, la thyroglobuline de boeuf étudiée renferme 0.243 pour 100 de thyroxine déterminée par la méthode de BLAU.

2. *Cas des protéines iodées.* Le dosage de la thyroxine dans les protéines artificiellement iodées présente des difficultés particulières en raison de la teneur élevée de ces produits en autres dérivés iodés solubles dans le butanol. Ces derniers ne donnant pas la réaction colorée des *o.* diiodophénols, il apparaissait que l'application de notre méthode aux iodoprotéines artificielles pourrait être réalisée, une fois fixées les conditions d'hydrolyse à adopter. REINEKE, TURNER, KOHLER, HOOVER et BEEZLEY²³ ont proposé de doser la thyroxine dans les iodoprotéines en utilisant la méthode de BLAU sur des hydrolysats obtenus par action de la baryte à 40 pour 100 pendant 20 heures au bain-marie bouillant. Les pertes en thyroxine résultant de cette opération étant de 6 à 7 pour 100, nous avons préféré lui substituer l'hydrolyse par la baryte à 8 pour 100 au bain d'huile à 115—120° pendant 6 heures, laquelle ne libère que 2 à 4 pour 100 de l'iode sous forme d'iodure. Par ailleurs, l'étude parallèle de la teneur en iode total et en thyroxine — la première déterminée par la méthode de MICHEL et LAFON¹³ et la seconde par colorimétrie — de l'extrait butanolique des hydrolysats préparé selon le mode opératoire de REINEKE et de ses collaborateurs a révélé de notables écarts, sur lesquels nous reviendrons plus bas. Aussi y a-t-il lieu de réaliser une purification de cet extrait, riche en acides aminés iodés autres que la thyroxine. Nous avons adopté la technique suivante mettant en oeuvre les mêmes réactifs que celle s'appliquant aux protéines thyroïdiennes.

Mode opératoire. 100 à 200 mg de protéine iodée sont additionnés de 5 à 10 ml de solution (5 ml par 100 mg) à 8 pour 100 de Ba(OH)₂ et chauffés pendant 6 heures au bain d'huile à 115—120° sous réfrigérant à reflux. Après refroidissement, on transvase quantitativement dans une ampoule à décanter de 50 ml. On amène le milieu à $pH = 3.5-4.0$ à l'aide d'HCl N (virage au bleu ardoisé du bleu de bromophénol) et l'on porte à 15 ml avec de l'eau distillée. On ajoute 15 ml de butanol et l'on agite énergiquement, puis on laisse reposer 12 heures; la totalité de la thyroxine passe alors dans le butanol avec une partie importante de la diiodotyrosine et d'autres dérivés iodés. Pour éliminer ces composés, dont le premier seul donne la même réaction colorée que la thyroxine, on lave l'extrait butanolique avec NaOH 2 N (2 lavages avec 15 ml et un avec 7.5 ml NaOH 5 N) en ayant soin de ne pas éliminer les produits insolubles rassemblés à la limite de séparation des deux liquides. On centrifuge, on décante le butanol que l'on évapore à l'étuve à 70°. Afin de se débarrasser complètement de la diiodotyrosine, on procède à une nouvelle extraction au butanol du résidu sec de la première repris par 15 ml d'eau acidulée à $pH = 3.5-4.0$ par HCl N. Le produit de cette seconde extraction est traité comme celui de la première et évaporé à 70°. Ceci fait, on dissout le résidu sec obtenu dans 15 ml de solution hydroalcoolique de chlorure de sodium (solution I, p. 344) et l'on dose la thyroxine sur une partie aliquote selon le mode opératoire décrit à propos des produits thyroïdiens.

Les résultats sont entachés d'une erreur de ± 3 pour 100. Ils sont en général sensiblement inférieurs à ceux de la méthode de REINEKE et de ses collaborateurs, comme l'ont montré de très nombreux essais, dont nous citerons deux exemples détaillés à titre de justification de notre mode opératoire. Deux échantillons d'iodocaséine renfermant respectivement (A) 6.75 et (B) 8.08 pour 100 d'iode ont été préparés selon REINEKE et TURNER²². La thyroxine a été dosée dans chacun d'eux par la méthode de REINEKE et ses collaborateurs après hydrolyse au moyen de la baryte à 40 pour 100 pendant 20 heures au bain-marie bouillant. Un échantillon des mêmes produits a été par ailleurs hydrolysé selon le mode opératoire que nous avons adopté (action de la baryte à 8 pour

100 pendant 6 heures au bain d'huile à 115—120°) et l'on a procédé à l'extraction butanolique de l'hydrolysate acidifié à $p_H = 3.5$. Après lavage à la soude de l'extrait et évaporation du butanol, la thyroxine a été dosée d'une part au moyen de notre méthode colorimétrique et, d'autre part, en déterminant la teneur en iode total de la fraction ainsi séparée (REINEKE, BLAU). Une partie aliquote du résidu de la première extraction butanolique repris par de l'eau acidulée à $p_H = 3.5$ a été soumise à une seconde extraction opérée dans les mêmes conditions que la première et l'on a répété les dosages de thyroxine et d'iode total sur une partie du résidu sec. De même sur le produit d'une troisième extraction. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

EXEMPLES DE RÉSULTATS DU DOSAGE DE LA THYROXINE PAR COLORIMÉTRIE ET PAR DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN IODE, DANS LES PRODUITS D'EXTRACTIONS BUTANOLIQUES SUCCESSIVES D'HYDROLYSATS D'IDOCASÉINES

Iodo- caséine	Thyroxine p. 100 déterminée sur le résidu						Thyroxine p. 100 (méthode de REINEKE)
	d'une extraction		de 2 extractions		de 3 extractions		
	par colorim.	par I tot.	par colorim.	par I tot.	par colorim.	par I tot.	
A	2.16	2.90	1.45	1.40	1.45	1.38	1.72
B	2.65	3.67	1.56	1.61	1.46	1.57	2.00

Il est donc indispensable de procéder à la double extraction que nous avons adoptée, la méthode de REINEKE et ses collaborateurs n'en comportant qu'une à la suite d'une hydrolyse réalisée dans des conditions différentes*. Une troisième extraction se révèle par contre inutile. La non-concordance entre les données déterminées par colorimétrie et par dosage de l'iode total dans les fractions solubles dans le butanol à $p_H = 3.5$ avant purification des extraits est significative. Elle traduit le fait qu'une partie de l'iode considéré par les auteurs américains comme thyroïdien est fixé à d'autres combinaisons ne donnant pas la réaction des *o*. diiodophénols.

B. Dosage de la diiodotyrosine

Le dosage que nous proposons s'applique aux protéines thyroïdiennes comme aux protéines artificiellement iodées; aussi le mode opératoire décrit ne comporte-t-il pas de variantes, comme dans le cas de la thyroxine. Sa mise au point a exigé de nombreux essais, sur lesquels nous nous étendrons tout d'abord.

Justification des divers temps du dosage. La première opération devant être réalisée est l'hydrolyse alcaline des protéines. En raison des différences de stabilité de la thyroxine et de la diiodotyrosine dans les milieux barytiques ou sodiques et de l'inégale solubilité dans le butanol des sels barytique et sodique de ces acides aminés, l'hydrolyse par la baryte peut légitimement être retenue pour le dosage du premier, mais celle par la soude permet seule un dosage correct du second. En effet, le thyroxinate de baryum est peu soluble dans le butanol et, par ailleurs, l'extraction des hydrolysats à $p_H =$

* Nous reviendrons dans un prochain travail sur la signification des résultats obtenus par la méthode de REINEKE et de ses collaborateurs, résultats dont nous confirmons l'exactitude analytique sans adopter l'interprétation de leurs auteurs.

= 3.5—4.0 entraîne de 60 à 80 pour 100 de la diiodotyrosine en même temps que la totalité de la thyroxine. Nous avons adopté une hydrolyse de 8 heures par la soude 5 N au bain d'huile à 115—120°, classiquement employée pour libérer la tyrosine des protéines non iodées. Les données du tableau IX, établies sur des solutions de diiodotyrosine pure, en justifient l'usage.

TABLEAU IX
STABILITÉ DE LA DIIODOTYROSINE DANS NaOH 5 N AU BAIN D'HUILE A 115°

Temps de chauffage (heures et minutes)	Quantité de diiodotyrosine (γ)		Ecart pour 100
	mise en oeuvre	retrouvée (colorimétrie)	
4.00	190	196	+ 2.9
5.50	190	184	— 3.1
8.00	80	84	+ 1.2
8.00	206	202	— 2.0
14.00	79	68	— 13.9
18.03	206	162	— 21.3

Il convient, l'hydrolyse achevée, d'éliminer la thyroxine, car elle donne la même réaction colorée que la diiodotyrosine en présence d'ions nitreux. La solubilité dans le butanol du sel sodique de la première permet ce fractionnement (LELAND et FOSTER, BLAU). Comme nous nous en sommes assurés, la thyroxine est aussi efficacement éliminée d'un mélange des deux acides aminés purs que d'un hydrolysât protéique par l'extraction butanolique d'une solution sodique. De plus, les produits de sa dégradation pouvant se former au cours de l'hydrolyse alcaline n'interviennent pas dans le dosage, car ils sont ou solubles comme elle dans le butanol ou non-chromogènes en présence d'ions nitreux.

Par contre, d'autres acides aminés sont alors susceptibles de gêner et il convient ou de les éliminer, ou de tenir compte de leur présence en introduisant un facteur de correction.

Deux observations sont à retenir dans le domaine. Comme nous l'avons déjà signalé, le tryptophane et la tyrosine donnent naissance à des pigments jaunes dans les conditions où l'on se place pour opérer la réaction de la diiodotyrosine au nitrite de sodium. Néanmoins, la coloration due au tryptophane est si faible qu'elle ne gêne pas les mesures si la prise d'essai renferme moins de 2 mg de celui-ci. C'est là une condition très facile à réaliser en pratique, les thyroglobulines renfermant de 2.0 à 2.3 pour 100 de cet acide aminé et les iodoprotéines artificielles étant d'une teneur en diiodotyrosine toujours assez élevée pour que l'on puisse opérer sur des quantités très faibles. Il n'en est pas de même de la réaction de la tyrosine, environ 80 fois moins intense que celle de

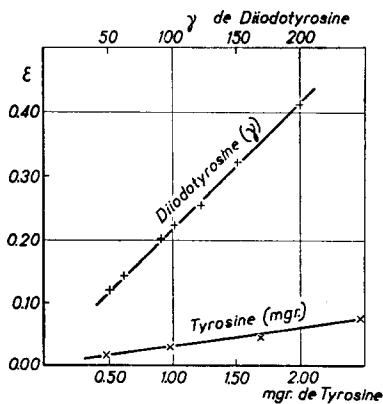


Fig. 4. Courbes d'étalonnage de la réaction colorée de la diiodotyrosine et de la tyrosine (écran S_{80} , 2 cm d'épaisseur). Abscisses: gamma de diiodotyrosine et mg de tyrosine. Ordonnées: coefficient d'absorption (ϵ)

son dérivé diiodé (filtre S_{50}), mais non négligeable, surtout dans les thyroglobulines, renfermant en général 3.2 pour 100 de tyrosine et environ 0.4 pour 100 du dérivé diiodé. L'expé-

rience a montré que l'absorption des pigments provenant des deux acides aminés suit la loi de BEER-LAMBERT entre 50 et 200 γ de diiodotyrosine et 0.5 et 4.0 mg de tyrosine. Par ailleurs, elle est égale à la somme de celles propres à chaque constituant dans le mélange des deux corps. Ceci étant, on peut doser la diiodotyrosine en présence de tyrosine en se reportant à un système de deux courbes d'étalonnage dont un exemple, correspondant aux valeurs expérimentales citées p. 338 et 339, est reproduit sur la Figure 4. Il suffit pour cela de soustraire de la valeur d' ϵ lue au photomètre de PULFRICH (filtre S_{30} , cuve de 2 cm) lors du dosage d'un mélange, de celle d' ϵ correspondant à la quantité de tyrosine présente dans la prise d'essai. Cette dernière valeur est déterminée par extrapolation sur une courbe d'étalonnage établie sur l'acide aminé pur, la quantité de tyrosine présente étant au préalable dosée par la méthode de BERNHARDT¹. Quelques exemples justifiant ce mode opératoire ont été rassemblés dans le tableau X.

TABLEAU X

INTENSITÉ DE LA RÉACTION COLORÉE DE LA TYROSINE AUX IONS NITREUX DANS LES HYDROLYSATS DE DIVERSES PROTÉINES (FILTRE S_{30} , 2 cm)

Quantité et nature de la protéine hydrolysée	mg de tyrosine présents (méthode de BERNHARDT)	Valeur de ϵ	
		déterminée par réaction aux ions NO_2	calculée à partir du taux de tyrosine
40 mg caséine*	1.64	0.07	0.06
70 mg caséine	2.87	0.09	0.09 ₅
100 mg caséine	4.10	0.13	0.13 ₅
50 mg fibrine	2.45	0.08	0.07 ₅
40 mg gélatine	traces indos.	0.00	0.00
70 mg gélatine	traces indos.	0.00	0.00
100 mg gélatine	traces indos.	0.01	0.00

* Caséine brute, non desséchée, renfermant 12.2 p. 100 N.

Une seconde difficulté a été rencontrée dans l'application du dosage de la diiodotyrosine aux protéines. La faible teneur des produits thyroïdiens en ce dérivé rend inéluctable la nécessité de le doser en présence de quantités importantes d'autres acides aminés. Il était possible que ceux-ci faussent les résultats même s'ils ne se colorent pas sous l'influence des réactifs. Tel est en effet le cas, comme en rend compte l'examen des quelques exemples résumés dans le tableau XI.

Un excès de certains acides aminés gêne donc le dosage sans donner lieu à une réaction colorée, probablement en réagissant avec les ions nitreux par leur radical aminé, ce qui provoque la destruction d'une partie de ces ions*. Les faits observés limitent à 50 mg environ la quantité d'acides aminés en présence de laquelle il est possible d'opérer; la méthode est donc directement applicable à toutes les protéines renfermant plus de 0.1 pour 100 de diiodotyrosine, c'est-à-dire aux produits thyroïdiens normaux et aux iodoprotéines artificielles. On peut néanmoins doser la diiodotyrosine dans les thyroglobulines pathologiques exceptionnellement pauvres en iode en ajoutant à leur hydrolysat une quantité connue de l'acide aminé, dont on tient compte dans le calcul des résultats. L'ensemble de ces observations a permis d'adopter la technique suivante, laquelle

* Les produits de dégradation des acides aminés se formant en milieu alcalin, entre autres l'ammoniaque, les sulfures, les iodures, l'urée, ne modifient pas l'intensité de la réaction au taux où ils sont présents dans les hydrolysats.

comporte le dosage sur un même hydrolysât de la somme: diiodotyrosine et tyrosine (réaction aux ions nitreux) et de la tyrosine (méthode de BERNHARDT)* et le calcul, par différence, de la teneur en diiodotyrosine.

TABLEAU XI

INFLUENCE D'UN EXCÈS D'ACIDES AMINÉS DIVERS SUR LA RÉACTION COLORÉE DE LA DIIODOTYROSINE AUX IONS NITREUX (FILTRE S_{50} , 2 cm)

Quantité de diiodotyrosine en expérience (gamma)	Quantité (mg) et nature du produit ajouté	Quantité de diiodotyrosine retrouvée (gamma)*	Erreur pour 100
103	33 mg glyocolle	103	0
103	100 mg „	83	— 19.4
187	33 mg „	184	— 1.6
187	66 mg „	178	— 4.8
187	100 mg „	164	— 12.2
187	100 mg histidine	185	— 1.0
187	100 mg phénylalanine	172	— 8.5
95	50 mg caséine hydrolysée	96	+ 1.0
96	100 mg „ „	72	— 25.1
200	50 mg „ „	203	+ 1.5
200	100 mg „ „	162	— 18.0

* Compté tenu de la tyrosine présente dans les hydrolysats de caséine.

Réactifs nécessaires. On doit disposer des réactifs destinés aux dosages de la diiodotyrosine et de la tyrosine. Les premiers sont:

Solution I: ajouter à 10 ml NaOH 10 N, 10 ml HCl 10.5 N et H_2O q.s.p. 50 ml.

Solution II: solution de nitrite de sodium à 1 pour 100 fraîchement préparée.

NaOH 5 N; NaOH 10 N; HCl pur ($d = 1.19$, titrant 10.5 N); éthanol à 95°; butanol.

Les seconds sont:

Solution A: dissoudre 15 g SO_4Hg purifié dans 95 ml SO_4H_2 5 N, filtrer sur verre fritté et compléter à 100 ml avec SO_4H_2 5 N.

Solution B: solution de nitrite de sodium à 1 pour 100 fraîchement préparée.

SO_4H_2 7 N; SO_4H_2 0.5 N.

Mode opératoire. 100 mg de protéine sont chauffés pendant 8 heures au bain d'huile à 115—120° en présence de 2.0 ml NaOH 5 N sous réfrigérant à reflux. Après refroidissement, on transvase dans un tube à centrifuger conique de 16 ml portant un trait de jauge correspondant à un volume de 7.5 ml. On ajoute 2 ml NaOH 10 N et, après avoir complété à 7.5 ml avec de l'eau distillée, on ajoute 7.5 ml de butanol. On agite énergiquement tous les quarts d'heure pendant 2 heures, on centrifuge et l'on siphonne le butanol surnageant, lequel renferme la thyroxine. On transvase la couche aqueuse dans un ballon jaugé de 15 ml, on ajoute 3 ml HCl concentré et l'on complète à 15 ml avec de l'eau distillée. On prélève une partie aliquote (2 à 4 ml) renfermant de 50 à 200 γ de diiodotyrosine, à laquelle on ajoute le nombre de ml de solution I nécessaire pour la porter à 5 ml, puis 2.5 ml d'éthanol à 95° et 1 ml de solution II. On abandonne pendant 10 minutes, au cours desquelles il se développe une coloration jaune orangé. On ajoute ensuite 1.5 ml d'ammoniaque à 20 pour 100, ce qui provoque un virage au rouge. On centrifuge et l'on détermine, dans les 15 minutes qui suivent l'alcalinisation du milieu, l'intensité de l'absorption au photomètre de PULFRICH (filtre S_{50} , cuve de 2 cm). Soit a la valeur obtenue.

* La méthode de BERNHARDT, bien que sensiblement moins précise que celle de LUGG, convient pour ce dosage. Elle est très rapide, d'exécution très simple, et permet d'opérer sur des quantités minimes de produit (50 à 200 γ de tyrosine).

Bibliographie p. 355.

La tyrosine est dosée sur une partie aliquote de l'hydrolysate renfermant de 50 à 200 γ de cet acide aminé. Pour cela, on place dans un tube à centrifuger de 10 ml 1 ou 2 ml de ce milieu acidifié à 1.5 N par SO_4H_2 et, si besoin est, on complète à 2 ml par SO_4H_2 0.5 N. On ajoute 0.5 ml de solution A, on porte 10 minutes au bain-marie bouillant et, après refroidissement, on ajoute, dans l'ordre, 1 ml SO_4H_2 7 N et 1 ml de réactif B. Il se forme en la présence du premier un précipité dans lequel le tryptophane est entraîné à l'état de dérivé mercurique, tandis que la combinaison mercurique de la tyrosine demeure en solution et donne par la suite la réaction de MILLON. Après centrifugation, on mesure au photomètre de PULFRICH (filtre S_{50} , cuve de 2 cm) l'intensité de celle-ci dans les 15 minutes et l'on repère sur la courbe d'étalonnage de la méthode de BERNHARDT, établie au préalable sur des solutions titrées de tyrosine, la quantité de cet acide aminé présente dans la prise d'essai.

Connaissant la teneur en tyrosine de l'hydrolysate par unité de volume, on calcule celle accompagnant la diiodotyrosine dans l'échantillon mis en oeuvre pour le dosage de celle-ci au premier temps des opérations. On détermine ensuite l'absorption due à cet acide aminé dans la prise d'essai en se reportant à la courbe d'étalonnage de la réaction colorée de la tyrosine en présence d'ions nitreux (Figure 4). Soit b la valeur obtenue. La quantité de diiodotyrosine est égale à la différence: $a - b$.

La correction ainsi introduite dans le calcul des résultats pour éliminer l'erreur par excès due à la tyrosine est de 6 à 7 pour 100 dans le cas des protéines thyroïdiennes; elle est moindre, souvent nulle, dans celui des protéines artificiellement iodées*. En raison de la nécessité dans laquelle on se trouve de l'appliquer aux premières, la précision de la méthode ne dépasse pas alors ± 5 pour 100, tandis qu'elle atteint ± 3 pour 100 quand on la met en oeuvre sur les secondes.

C. Dosage de la monoiodotyrosine

La monoiodotyrosine est un constituant des protéines artificiellement iodées et les protéines thyroïdiennes en sont dépourvues, ou tout au moins si pauvres que cet acide aminé n'a pas pu y être mis en évidence; aussi est-ce aux premières seules que s'applique son dosage.

Divers contrôles ont tout d'abord été institués pour choisir un agent d'hydrolyse. La monoiodotyrosine est décomposée avec libération d'iode et de tyrosine par les acides minéraux à 100°. Elle ne subit par contre qu'une perte d'iode minime, ne dépassant pas 3 pour 100, lorsqu'elle est chauffée pendant 8 heures au bain d'huile à 115—120° dans de la soude 5 N. Par ailleurs, la tyrosine soumise à la même opération est quantitativement retrouvée en fin de celle-ci. La méthode de dosage de ces deux corps dans leurs mélanges décrite plus haut doit donc pouvoir être adaptée aux produits de l'hydrolyse sodique des protéines, si les autres acides aminés présents n'en altèrent pas la précision. Une hydrolyse de 8 heures à 100° par la soude 5 N libérant la totalité de la tyrosine, on peut admettre qu'il en est de même du dérivé monoiodé et nous avons étudié dans quelle mesure les produits de destruction de la diiodotyrosine et de la thyroxine peuvent gêner le dosage

* Une fraction minime de la tyrosine étant extraite par le butanol en milieu alcalin, cette correction est théoriquement un peu trop forte; en fait, elle est si minime que l'on peut à bon droit la considérer comme correcte. L'exactitude de cette manière de voir ressort de l'observation, citée plus haut, que de la diiodotyrosine ajoutée à des hydrolysats de caséine est retrouvée quantitativement en appliquant cette correction.

de ce dernier. Les expériences que nous avons instituées dans ce but ont montré que la diiodotyrosine chauffée pendant 6 heures au bain d'huile à 115—120° dans la soude 5 N ne donne naissance qu'à des traces de monoiodotyrosine, correspondant à 2 pour 100 environ du dérivé diodé (dosage de celui-ci par la réaction aux ions nitreux et dosage de la première par la réaction de MILLON). La dégradation de la thyroxine au cours d'essais identiques est importante; elle peut atteindre 50 pour 100, mais ne libère qu'à très faible taux des corps donnant la réaction de MILLON, sans doute surtout de la thyroxine. Environ 4 pour 100 de la thyroxine sont alors transformés en „extratyrosine". Le tryptophane donnant une réaction colorée analogue à celle de MILLON, il y a lieu de l'éliminer, ce que la méthode de LUGG réalise en assurant la précipitation du dérivé mercurique de cet acide aminé dans des conditions où ceux de la tyrosine et de la monoiodotyrosine demeurent en solution. Enfin, nous sommes assurés que le dosage de la tyrosine en lumière filtrée par les écrans S_{33} et S_{47} du photomètre de PULFRICH donne les mêmes résultats en solution pure et dans un hydrolysats protéique, en sorte que la présence d'un certain excès d'acides aminés ne constitue pas une cause d'erreur. Les résultats de ces essais justifient la méthode de dosage de la monoiodotyrosine dans les protéines iodées que nous proposons.

Réactifs nécessaires. Solution I: dissoudre dans 770 ml H_2O additionnés de 79 ml SO_4H_2 concentré 75 g SO_4Hg purifié, 55 g $HgCl_2$, 70 g SO_4Na_2 et compléter à 1000 avec H_2O .

Solution II: solution I diluée au demi par SO_4H_2N .

Solution III: solution à 6.9 pour 100 de nitrite de sodium fraîchement préparée.

SO_4H_2 10 N; SO_4H_2 0.7 N; NaOH 5 N.

Mode opératoire. 100 à 500 mg de protéine iodée sont additionnés de NaOH 5 N (2 ml par 100 mg) et chauffés pendant 8 heures au bain d'huile à 115—120° sous réfrigérant à reflux. Après refroidissement, on transvase dans un ballon jaugé de 10—15 ml et l'on ajoute SO_4H_2 10 N en quantité suffisante pour réaliser une acidité 0.7 N. On prélève une prise d'essai de 5 ml au maximum dans un tube à centrifuger (en complétant au besoin à 5 ml par SO_4H_2 0.7 N) et l'on ajoute 5 ml de solution A. Après un séjour de 30 minutes à 60° et de 1 heure à 20°, on centrifuge le précipité renfermant le tryptophane. Le liquide surnageant est transvasé dans un ballon jaugé de 25 ml, réuni aux eaux de lavage du précipité traité par 10 ml de solution II et complété à 25 ml par cette dernière. On ajoute ensuite 0.5 ml de solution III, ce qui provoque le développement de la réaction de MILLON. On agite, on centrifuge et l'on mesure au photomètre de PULFRICH sous 2 cm d'épaisseur, l'intensité de la réaction dans les deux régions du spectre délimitées par les écrans S_{53} et S_{47} , de cinq à quinze minutes après le mélange des réactifs. Les valeurs du coefficient d'absorption ainsi obtenues, M avec l'écran S_{53} et m avec l'écran S_{47} , permettent de calculer les quantités x de monoiodotyrosine et y de tyrosine présentes au moyen des formules:

$$x = \frac{2.10 M - 1.84 m}{0.97} \cdot 3.07 \text{ mg de monoiodotyrosine, et}$$

$$y = \frac{1.25 m - 0.90 M}{0.97} \cdot 1.81 \text{ mg de tyrosine.}$$

Des exemples de données déterminées par cette méthode sur des iodocaséines préparés par la technique de REINEKE et TURNER (ioduration en milieu bicarbonaté)²² et par

celle de LUDWIG et VON MUTZENBECHER (ioduration en milieu ammoniacal)¹⁵ figurent dans le tableau XII.

TABLEAU XII

EXEMPLES DE TENEURS EN MONOIODOTYROSINE ET EN TYROSINE D'IDOOCASÉINES DE TENEURS EN IODE DIVERSES

Caséine iodée selon le procédé de	Iode total p. 100	Monoiodotyrosine p. 100	Tyrosine p. 100
REINEKE et TURNER	4.89	6.10	0.93
REINEKE et TURNER	6.76	3.60	0.20
LUDWIG et MUTZENBECHER	4.67	7.00	0.85
LUDWIG et MUTZENBECHER	7.85	6.25	0.07

Les conditions d'application du dosage de la monoiodotyrosine sont celles décrites à propos de son étude sur des mélanges de cet acide aminé et de tyrosine. Les quantités de ces corps qu'il convient de mettre en oeuvre sont de 0.20 à 1.00 mg du dérivé iodé et de 0.50 à 2.00 mg de tyrosine dans la prise d'essai. Les remarques faites au sujet de la sensibilité maxima des lectures photométriques (p. 343) s'appliquent aussi bien au cas des acides aminés purs qu'à celui des hydrolysats protéiques et il est recommandé de faire un dosage en double sur deux échantillons d'une même iodoprotéine. L'erreur relative moyenne est alors de ± 7 pour 100; elle permet de définir avec sécurité et avec un degré d'approximation assez grand la teneur en monoiodotyrosine des protéines.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les méthodes colorimétriques* décrites dans ce travail méritent d'être brièvement discutées et comparées à celles actuellement en usage.

Le dosage de la thyroxine que nous proposons repose sur une réaction colorée de ce corps spécifique dans les conditions adoptées, alors que tel n'est pas le cas pour ceux qui sont basés sur le dosage de l'iode total d'une fraction des hydrolysats protéiques (HARRINGTON et RANDALL; LELAND et FOSTER; BLAU; REINEKE, TURNER, KOHLER, HOOVER et BEEZLEY) ou sur la réaction de MILLON (BRAND et KASSEL). Il donne sur les préparations thyroïdiennes des résultats identiques à ceux de la méthode de BLAU, considérée à bon droit comme la plus précise des méthodes antérieures, mais présente l'avantage de pouvoir être utilisé sur de beaucoup plus petites quantités de produits. Son application aux protéines artificiellement iodées appelle des commentaires particuliers. En effet, le dosage de la thyroxine dans celles-ci offre des difficultés dont témoignent les écarts considérables obtenus par diverses techniques chimiques ou biologiques^{5, 14, 21, 24}. Comme nous l'avons déjà signalé, la seule méthode chimique adaptée au cas des iodoprotéines artificielles, due à REINEKE et à ses collaborateurs, fournit des résultats trop élevés. Il n'est pas douteux que le dosage de l'iode total d'une fraction des hydrolysats constitue alors une technique moins fidèle que la nôtre dans les conditions où se sont placés ces auteurs. Quant à la méthode de BRAND et KASSEL, elle ne tient pas compte de la présence de

* Il va de soi que l'on peut substituer au photomètre de PULFRICH tout autre instrument de mesure colorimétrique, à condition de disposer des écrans sélectifs en présence desquels nous avons opéré. Dans les cas de la thyroxine et de la diiodotyrosine, la colorimétrie peut être réalisée sans écran, par comparaison de l'essai avec un témoin (solution titrée).

monoiodotyrosine; cette dernière, donnant la réaction de MILLON moins intensément avant qu'après sa désioduration par les acides, fausse les dosages de tyrosine sur lesquels repose le calcul de la teneur en diiodotyrosine et en thyroxine. Aussi les résultats de nos recherches ont-ils permis de mettre au point une méthode plus satisfaisante que celles antérieurement décrites pour doser la thyroxine dans les protéines iodées.

Jusqu'ici la diiodotyrosine a été dosée dans les protéines thyroïdiennes par voie indirecte, à savoir: par différence entre l'iode total et l'iode thyroïdique (HARINGTON et RANDALL; LELAND et FOSTER, BLAU) ou entre l'intensité de la réaction de MILLON avant et après désioduration (BRAND et KASSEL); elle ne l'a pas été dans les iodoprotéines artificielles. Or, le principe même des méthodes employées les expose à des erreurs par excès, en ce sens qu'elles rapportent à la diiodotyrosine l'halogène provenant de la décomposition de la thyroxine et celui de la monoiodotyrosine, très abondante dans certains produits. La méthode colorimétrique proposée est donc à la fois plus exacte et plus générale. Elle permettra à coup sûr des recherches pratiquement irréalisables par les techniques antérieures.

La monoiodotyrosine n'avait pas encore été dosée dans les protéines artificiellement iodées. L'application de notre méthode aux préparations thyroïdiennes permet d'affirmer que, comme l'avait prévu HARINGTON, celles-ci sont pratiquement dépourvues de cet acide aminé*, alors que certaines iodoprotéines obtenues par voie chimique en renferment à des taux importants, pouvant maintenant être précisés.

En dehors de leur intérêt analytique, les méthodes de dosage des trois acides aminés iodés à l'étude desquelles est consacré ce travail en présentent un autre. Leur application aux produits de l'ioduration chimique ou biologique des protéines permettra de suivre l'évolution de cette réaction dans des conditions diverses et, par là, d'étudier les modalités de la formation de la thyroxine. Nous exposerons dans un prochain mémoire un ensemble de résultats obtenus dans ce domaine.

RÉSUMÉ

1. Ce travail décrit un microdosage colorimétrique de la thyroxine, de la diiodotyrosine et de la monoiodotyrosine en solution pure et dans les protéines iodées, naturelles ou artificiellement iodées.

2. La thyroxine et la diiodotyrosine seules donnent en présence d'ions nitreux la réaction colorée propre aux *o*. diiodophénols, tandis que la réaction de MILLON n'est positive qu'en présence de monoiodotyrosine. Par ailleurs, la thyroxine peut être quantitativement séparée de la diiodotyrosine grâce à sa solubilité dans le butanol et la monoiodotyrosine traitée par le réactif de MILLON donne naissance à un dérivé coloré dont les caractères spectraux ne sont pas identiques à ceux du dérivé de la tyrosine. Ces faits ont été mis à profit pour établir le dosage des trois acides aminés iodés purs et dans leurs mélanges, additionnés ou non de tyrosine.

3. L'étude quantitative des réactions colorées de la thyroxine, de la diiodotyrosine et de la monoiodotyrosine en présence de divers acides aminés et celle de leur stabilité dans les conditions de l'hydrolyse alcaline des protéines a permis d'appliquer à ces dernières les méthodes de dosage des dérivés établies sur leurs solutions pures.

4. Des techniques particulières ont été élaborées pour les produits thyroïdiens, pauvres en thyroxine et en diiodotyrosine et probablement dépourvus de monoiodotyrosine, et pour les protéines artificiellement iodées, renfermant les trois acides aminés iodés à des taux relativement élevés. Elles permettent de doser la thyroxine sur 50 à 200 mg de produit avec ± 3 pour 100 d'erreur, la diiodotyrosine sur 100 mg avec ± 4 pour 100 d'erreur et la monoiodotyrosine à ± 7 pour 100 près sur 100 à 200 mg.

* La monoiodotyrosine pure ajoutée aux hydrolysats protéiques est retrouvée quantitativement, que ces hydrolysats proviennent de thyroglobuline ou de toute autre protéine. La sensibilité de notre méthode atteignant 20 gamma de cet acide aminé, il nous paraît certain que la thyroglobuline renferme moins de 0.1 pour 100 de ce corps; toutefois, il n'est pas possible d'affirmer qu'elle en est rigoureusement dépourvue.

SUMMARY

1. A colorimetric microestimation of thyroxine, diiodotyrosine, and monoiodotyrosine in pure solution and in naturally and artificially iodinated proteins is described.

2. Thyroxine and diiodotyrosine alone give the colour reaction of *o*-diiodophenols, while the MILLON reaction is positive only with monoiodotyrosine. Moreover, thyroxine can be quantitatively separated from diiodotyrosine by its solubility in butanol, and monoiodotyrosine treated with MILLON's reagent gives rise to a coloured derivative whose spectral characteristics are not identical with those of the tyrosine derivative. These facts have been made use of in estimating the three iodinated aminoacids, pure or mixed, and with or without the presence of tyrosine.

3. The quantitative study of the colour reaction of thyroxine, diiodotyrosine, and monoiodotyrosine in the presence of various aminoacids, and the study of their stability under the conditions of alkaline hydrolysis of proteins, makes possible the application to proteins methods of estimation of iodine derivatives established with pure solutions of the latter.

4. Special techniques have been elaborated for thyroid products poor in thyroxine and diiodotyrosine and probably lacking in monoiodotyrosine, and for artificially iodinated proteins containing the three iodinated aminoacids in relatively high proportions. By these techniques thyroxine can be estimated in 50 to 200 mg of product (with $\pm 3\%$ error), diiodotyrosine in 100 mg (with $\pm 4\%$ error), and monoiodotyrosine in 100 to 200 mg (with $\pm 7\%$ error).

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die vorliegende Arbeit behandelt eine kolorimetrische Mikrobestimmung des Thyroxins, Dijodtyrosins und Monojodtyrosins, in reiner Lösung und in jodhaltigem Eiweiss, natürlich oder künstlich jodiert.

2. Nur Thyroxin und Dijodtyrosin geben in Anwesenheit von Nitriten die für *o*-Dijodphenole typische Farbreaktion, während die MILLON'sche Reaktion nur bei Monojodtyrosin positiv ausfällt. Ausserdem kann Thyroxin durch seine Löslichkeit in Butanol quantitativ von Dijodtyrosin getrennt werden, und Monojodtyrosin gibt mit MILLON's Reagens einen Farbstoff, dessen spektraler Charakter mit dem von Tyrosin abgeleiteten Farbstoff nicht identisch ist. Diese Tatsachen gestatten es, die drei jodhaltenden Aminosäuren in reinem Zustand und in Gemischen, mit oder ohne Zufügung von Tyrosin, zu bestimmen.

3. Die quantitative Untersuchung der Farbreaktionen des Thyroxins, Dijodtyrosins und Monojodtyrosins in Anwesenheit verschiedener Aminosäuren, und die Untersuchung der Stabilität der drei Stoffe unter den Umständen der alkalischen Eiweisshydrolyse, ermöglichte es, die Bestimmungsmethoden aus reinen Lösungen auf Eiweiss zu übertragen.

4. Besondere Methoden wurden noch ausgearbeitet für thyroxin- und diiodtyrosinarme Schilddrüsenprodukte, die wahrscheinlich ausserdem arm an Monojodtyrosin sind, und für künstlich jodierte Eiweisstoffe, die die drei Aminosäuren in erhöhten Mengen enthalten. Sie gestatten es, Thyroxin in 50 bis 200 mg Ausgangsstoff mit $\pm 3\%$ Fehler zu bestimmen, Dijodtyrosin in 100 mg mit $\pm 4\%$ Fehler und Monojodtyrosin in 100 à 200 mg mit $\pm 7\%$ Fehler.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ F. W. BERNHARDT, *Proc. Amer. Soc. biol. Chem.*, T. 32, 1938, x, cité d'après R. J. BLOCK, *The determination of aminoacids*, 1 vol., 91 p., Minneapolis 1938.
- ² N. F. BLAU, *J. biol. Chem.*, 102 (1933) 259.
- ³ N. F. BLAU, *J. biol. Chem.*, 110 (1935) 351.
- ⁴ E. BRAND et B. J. KASSEL, *J. biol. Chem.*, 131 (1939) 489.
- ⁵ R. DEANESLY, J. EMMETT et A. J. PARKES, *J. Endocrin.*, 4 (1945) 312.
- ⁶ C. R. HARRINGTON, *Biochem. J.*, 20 (1926) 293.
- ⁷ C. R. HARRINGTON et P. V. PITT RIVERS, *Biochem. J.*, 38 (1944) 320.
- ⁸ C. R. HARRINGTON et S. S. RANDALL, *Biochem. J.*, 23 (1929) 373.
- ⁹ C. R. HARRINGTON et S. S. RANDALL, *Quarterl. J. biol. Chem.*, 2 (1929) 501.
- ¹⁰ R. HERRIOTT, *J. gen. Physiol.*, 25 (1941) 185.
- ¹¹ T. INGVALDSEN et A. T. CAMERON, *Proc. Trans. roy. Soc. Canada* (3), Sect. V, 20 (1926) 297.
- ¹² A. C. KENDALL et A. T. OSTERBERG, *J. biol. Chem.*, 40 (1919) 269.
- ¹³ J. P. LELAND et G. L. FOSTER, *J. biol. Chem.*, 95 (1932) 165.
- ¹⁴ J. LERMAN et W. T. SALTER, *Endocrin.*, 25 (1939) 712.
- ¹⁵ W. LUDWIG et P. VON MUTZENBECHER, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 258 (1939) 195.
- ¹⁶ J. W. H. LUGG, *Biochem. J.*, 32 (1938) 775.
- ¹⁷ R. MICHEL, *Bull. Soc. Chim.*, (5 ème sér.), 12 (1945) 546.
- ¹⁸ R. MICHEL et M. LAFON, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 27 (1945) 644.
- ¹⁹ M. E. MORTON et I. L. CHAIKOFF, *J. biol. Chem.*, 147 (1943) 1.

- ²⁰ H. PAAL et G. MOTZ, *Biochem. Ztschr.*, 279 (1935) 106.
²¹ E. P. REINEKE et C. W. TURNER, *Endocrin.*, 29 (1941) 667.
²² E. P. REINEKE et C. W. TURNER, *J. biol. Chem.*, 161 (1945) 613.
²³ E. P. REINEKE, C. W. TURNER, G. O. KOHLER, R. D. HOOVER, AND M. B. BEEZLEY, *J. biol. Chem.*, 161 (1945) 599.
²⁴ A. N. RICHARDS et L. W. COLLINSON, *J. Physiol.*, 66 (1928) 229.

Reçu le 31 janvier 1947