

SUR LA FORMATION DE LA THYROXINE ET DE SES PRÉCURSEURS DANS LES IODOPROTÉINES

par

JEAN ROCHE, RAYMOND MICHEL ET MARCELLE LAFON

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

• I. INTRODUCTION ET OBJET DU TRAVAIL

L'ioduration confère aux protéines les activités biologiques propres aux produits thyroïdiens; elle comporte, d'une part, la fixation de l'halogène au cycle de certains acides aminés et, d'autre part, la formation de thyroxine et diverses réactions d'oxydation. Le premier de ces processus a été étudié bien avant que les acides aminés iodés de la thyroglobuline n'aient été identifiés et l'isolement de la diiodotyrosine à partir de l'iodovalbumine, de l'iodocaséine et de l'iodogliadine, réalisé par OSWALD¹, a établi le rôle important joué par la tyrosine dans la fixation de l'iode aux protéines. Par la suite, BLUM et STRAUSS², BAUER et STRAUSS³, STRAUSS et GRÜTZNER⁴ ont cherché à relier quantitativement celle-ci à la teneur en tyrosine, en histidine et, accessoirement, en tryptophane des protéines, tous ces acides aminés participant à des réactions nucléaires de substitution. La formation de la thyroxine et de ses précurseurs dans les protéines iodées n'a été étudiée que plus récemment. Après les recherches d'orientation d'ABELIN et de ses élèves⁵, LUDWIG et VON MUTZENBECHER⁶ ont isolé de la monoiodotyrosine, de la diiodotyrosine et de la thyroxine dans les hydrolysats de diverses iodoprotéines. Les résultats de ces auteurs, confirmés et étendus par HARINGTON et PITT RIVERS⁷, par PITT RIVERS et RANDALL⁸, et ceux de REINEKE et TURNER^{9, 10}, ont démontré que la *l*-thyroxine des protéines iodées est à tous égards identique à celle extraite de la thyroglobuline ou préparée par synthèse, en sorte qu'il est légitime de rapporter à sa présence l'activité thyroïdienne des protéines halogénées par voie chimique.

L'étude quantitative de la formation de thyroxine dans celles-ci a été ébauchée par MUUS, COONS et SALTER¹¹, puis entreprise sur le plan chimique par REINEKE, TURNER et divers collaborateurs^{12, 13}. On doit aux premiers l'observation que la sérumalbumine iodée à divers degrés n'est active sur le métabolisme de base des myxoedémateux qu'à partir d'une teneur en iode minima de 6 % environ; elle ne renfermerait de thyroxine en quantité appréciable qu'après fixation de l'halogène à un taux important (6 à 10 % I). REINEKE, TURNER et leurs collaborateurs^{12, 13} ont étudié systématiquement la formation de thyroxine dans la caséine, les protéines totales du lait, du soja, et montré l'existence d'un optimum de rendement en thyroxine lorsque l'on fait agir sur les protéines 6 atomes d'iode par molécule de tyrosine en la présence de divers catalyseurs d'oxydation. Comme la tyrosine est la substance-mère de la thyroxine, la teneur d'une protéine en la première détermine dans une certaine mesure son aptitude à s'enrichir en la seconde. Le mécanisme de la formation du produit hormonal, tant dans le corps thyroïde que par voie chimique, est encore incomplètement connu; il a néanmoins été

possible d'en dissocier deux étapes indépendantes, à savoir: l'halogénéation de la tyrosine en 3,5-diiodotyrosine et la condensation de deux molécules de celle-ci avec perte du reste d'alanine fixé à l'une d'elles (HARRINGTON¹⁴). Des recherches quantitatives sur la formation de la thyroxine à partir de ses précurseurs au cours de l'ioduration des protéines nous ont paru devoir apporter une contribution utile à l'étude de ce problème. Le travail actuel expose celles que nous avons poursuivies dans ce but.

Il n'existe, à notre connaissance, que des documents qualitatifs sur l'évolution de la formation de la monoiodotyrosine et de la diiodotyrosine dans une protéine au cours de son halogénéation et l'étude quantitative de la formation de la thyroxine pendant celle-ci n'est qu'ébauchée^{12, 13}. Les microdosages de ces trois acides aminés proposés par deux d'entre nous¹⁵ ont permis d'aborder dans son ensemble l'étude de ce problème sur des caséines et des thyroglobulines soumises à l'action de quantités croissantes d'iode. On pouvait espérer saisir ainsi certaines des modalités présidant à la genèse de la thyroxine et aux transformations successives de ses précurseurs.

Par ailleurs, la réaction donnant naissance à la thyroxine étant distincte de celle conduisant à l'ioduration de la tyrosine, il y avait lieu de rechercher si l'une et l'autre peuvent également affecter la totalité des molécules de tyrosine présentes dans les protéines, le rendement en thyroxine de l'ioduration étant toujours faible en égard aux quantités de tyrosine mises en oeuvre. Dans la thyroglobuline, le rapport: Iode thyroxinien/Iode total, est pratiquement constant et égal à 0.3¹⁶, ce qui traduit un état d'équilibre entre les divers processus donnant physiologiquement naissance aux deux dérivés halogénés présents. Pareil équilibre ne saurait être respecté lors de l'ioduration des protéines par voie chimique; aussi l'étude de cette dernière doit-elle permettre de préciser le comportement de la tyrosine en présence de quantités croissantes d'halogène, et, éventuellement de restreindre à une fraction de cet acide aminé l'aptitude d'une protéine à donner naissance à de la thyroxine. Il y avait un intérêt particulier à comparer les résultats de l'ioduration progressive de la thyroglobuline et d'une protéine étrangère au corps thyroïde, afin de rechercher si la première présente des caractères lui permettant de donner plus facilement naissance à de la thyroxine. On admet en effet que l'affinité des protéines pour l'iode est fonction de leur teneur en tyrosine, mais il est probable que la réactivité des molécules de cet acide aminé et leur aptitude à se condenser en thyroxine est régie par leur position dans les chaînes peptidiques de la protéine soumise à l'halogénéation. Dès lors, il est possible que la thyroglobuline, dans laquelle la synthèse du produit hormonal s'opère physiologiquement, renferme certains restes de tyrosine exceptionnellement aptes à servir de précurseurs à la thyroxine.

En définitive, le but de ce travail est d'étudier l'évolution de la teneur en tyrosine, en monoiodotyrosine, en diiodotyrosine et en thyroxine de la caséine et de la thyroglobuline en fonction de leur degré d'ioduration et de discuter le mécanisme de la formation des trois acides aminés halogénés dans les protéines.

2. PARTIE EXPÉRIMENTALE

a. *Plan des recherches, matériel d'étude et techniques.* Nous nous sommes proposés de préparer des iodoprotéines de teneur plus ou moins élevée en iode, afin d'y doser la tyrosine, la monoiodotyrosine, la diiodotyrosine et la thyroxine. Deux principaux facteurs paraissaient susceptibles de modifier l'évolution de la formation de ces dérivés. D'une part, la monoiodotyrosine, produit initial de l'halogénéation, doit donner naissance à la

diiodotyrosine au fur et à mesure que les protéines s'enrichissent en iode. D'autre part, la synthèse de la thyroxine, réaction distincte de la précédente, doit être plus ou moins intense selon les conditions expérimentales adoptées. Les recherches de REINEKE et TURNER sont à cet égard significatives; elles ont en effet établi que la présence d'oxyde salin de manganèse, Mn_3O_4 , augmente le rendement en thyroxine des opérations poursuivies en mettant en oeuvre 6 atomes d'iode par molécule de tyrosine*. Ceci étant, nous avons institué deux séries d'expériences où l'ioduration a été réalisée dans des milieux de potentiels oxydants divers, à savoir: par de l'iode en poudre agissant à $p_H = 7.8$ et en présence de bicarbonate de sodium et par des solutions iodo-iodurées ajoutées à des protéines dissoutes dans de l'ammoniaque à 5 %.

Les protéines sur lesquelles ont porté nos recherches sont: la caséine de Vache purifiée par dissolution en milieu ammoniacal et précipitation à $p_H = 4.8$ et la thyroglobuline de Porc, isolée par précipitation à $p_H = 4.8$ d'extraits thyroïdiens préparés, par la technique de CAVETT, RICE et MACCLENDON¹⁸. La première renfermait 15.6 % N et la seconde 15.9 % N.

Une première série d'iodoprotéines a été obtenue par la méthode de REINEKE, WILLIAMSON et TURNER¹⁷ appliquée dans sa forme originale, à ceci près que le p_H du milieu a été assez rigoureusement maintenu à $p_H = 7.8$ par addition de bicarbonate de sodium au cours des opérations. L'ioduration a été réalisée en deux temps. Les solutions à 2.85 % de protéine renfermant 5 g CO_3NaH par 700 ml, portées à 37° et soumises à une agitation mécanique continue (hélice de verre, 300 tours/minute), ont été additionnées d'iode en poudre. L'halogène a été ajouté par petites portions en quantités diverses, correspondant à des rapports précis entre le nombre de molécules-gramme de tyrosine présentes et celui d'atomes-gramme d'iode que l'on désirait mettre en oeuvre. Après fixation de la totalité de l'iode sur la protéine, réalisée en 2 heures 30 minutes, la température a été portée à 70° et l'on a continué l'agitation et le chauffage pendant 20 heures, en vase clos. Après refroidissement à 15°, on a acidifié à $p_H = 4.8$ par HCl 4 N et centrifugé l'iodoprotéine précipitée. Celle-ci a été dissoute à $p_H = 8.5$ par addition de soude et dialysée pendant 3 à 4 jours contre de l'eau distillée, jusqu'à disparition d'iode libre et d'ions I^- . Elle a été ensuite précipitée à $p_H = 4.8$, lavée à l'eau acidulée par l'acide acétique et desséchée dans le vide, sur anhydride phosphorique, jusqu'à poids constant; cette dernière opération exige environ huit jours.

Une seconde série de produits a été préparée en faisant réagir à 0° les protéines en solution à 2 % dans l'ammoniaque diluée (5 %) avec des solutions iodo-iodurées (6 g température de 0° (MUTZENBECHER¹⁹). L'halogène, par la protéine en 10 à 30 minutes. Après séjour l'iodoprotéine est séparée par précipitation isoélectrique dans la première méthode de préparation. On voit que celles-ci comportent un temps d'incubation plus long que la protéine; ce mode opératoire est actuellement en accord avec REINEKE et TURNER qu'il conduit à un

ERRATUM

P. 455, ligne 34-35, il faut lire:

3 g I + 6 g IK

(au lieu de 6 g I + 3 g IK)

un processus complexe, dans lequel évoluent de

* REINEKE, WILLIAMSON et TURNER¹⁷ ont admis que le rendement maximum en thyroxine de l'ioduration des protéines est atteint dans l'action de 4.5 atomes d'iode par molécule de tyrosine. REINEKE et TURNER¹⁸ ont ensuite observé que la mise en oeuvre de 6 atomes d'iode par molécule de tyrosine donne les meilleurs résultats.

multiples réactions, on ne saurait plus admettre avec les anciens auteurs qu'elle conduit à des produits de composition rigoureusement constante; ses résultats sont reproductibles avec des écarts moyens de $\pm 5\%$ dans des conditions opératoires bien définies. Chacune des préparations obtenues a fait l'objet de dosages d'azote total (KJELDAHL), d'iode total (LEIPERT²⁰), de tyrosine (LUGG²¹), de monoiodyrosine, de diiodotyrosine et de thyroxine (ROCHE et MICHEL¹⁵). Les dosages ont été faits en double sur deux hydrolysats de chaque préparation, en sorte que les résultats doivent être considérés comme aussi satisfaisants que les méthodes employées permettent de l'espérer (erreur relative: 1 % pour N et I; 5 % pour la diiodotyrosine et la thyroxine). En ce qui concerne la tyrosine et la monoiodyrosine, la précision des données obtenues est dans une certaine mesure fonction des taux respectifs de ces corps. Le dosage de la tyrosine est exact à 3 % près, tant que cet acide aminé n'est pas accompagné de plus de 75 % de son dérivé monoiodyé. De même, le dosage de ce dernier comporte une erreur ne dépassant pas 7 % dans les produits renfermant au moins 1 partie de monoiodyrosine pour 4 de tyrosine. La précision est environ moitié moindre dans les préparations très pauvres en l'un ou en l'autre des deux acides aminés.

b. *Résultats expérimentaux.* Les résultats de nos dosages ont été réunis dans les Tableaux I et II.

TABLEAU I

TENEURS EN AZOTE TOTAL, EN IODE TOTAL, EN TYROSINE, EN MONIODYROSINE, EN DIODYROSINE ET EN THYROXINE D'IODOCASÉINES OBTENUES EN PRÉSENCE DE QUANTITÉS DIVERSES D'IODE

Atomes I mis en oeuvre par mol de tyrosine	N %	I %	Tyrosine %	Monoiodyrosine %	Diodyrosine %	Thyroxine %
0 (témoin)	15.62	0	7.20	0	0	0
I. ACTION DE L'IODE EN MILIEU BICARBONATE (pH = 7.8)						
0.95	13.20	1.95	4.53	2.22	1.04	0.22
2.83	12.40	5.12	1.10	6.00	2.97	0.47
4.50	12.60	6.76	0.20	3.63	4.23	1.45
6.90	12.00	8.08	0.10	1.66	6.52	1.66
10.00	11.92	9.20	traces	traces	5.30	0.85
17.00	10.10	7.93	néant	traces	5.49	0.82
II. ACTION DE L'IODE EN MILIEU AMMONIACAL						
1.00	14.08	1.62	4.19	2.35	0.49	0.42
2.75	12.45	4.67	0.85	6.95	1.82	0.65
4.50	12.30	7.85	0.10	6.22	3.76	1.05
7.00	11.95	11.50	traces	0.80	9.30	1.65
10.00	11.92	11.10	0	0	9.60	1.85

c. *Examen critique des résultats* La discussion des données expérimentales obtenues ne saurait être utilement entreprise sans un examen critique de leur ensemble. A cet égard, certains résultats se dégagent de figures ou de calculs qu'il convient tout d'abord de présenter.

On trouvera dans les Figures 1, 2 et 3, la représentation graphique des données rassemblées dans les Tableaux I et II. Ces figures illustrent la fixation de l'iode à la caséine et à la thyroglobuline, d'une part, la formation des dérivés iodés de la tyrosine en fonction de la quantité d'halogène réagissant avec ces protéines, d'autre part.

TABLEAU II

TENEURS EN AZOTE TOTAL, EN IODE TOTAL, EN TYROSINE, EN MONOIODOTYROSINE, EN DIIODOTYROSINE ET EN THYROXINE D'IODOTHYROGLOBULINES OBTENUES EN PRÉSENCE DE QUANTITÉS DIVERSES D'IODE.

ACTION DE L'IODE EN MILIEU BICARBONATÉ, $pH = 7.8$ *)

Atomes I mis en oeuvre par mol de tyrosine	N %	I %	Tyrosine %	Monoiodo-tyrosine %	Diiodo-tyrosine %	Thyroxine %
0 (témoin)	15.92	0.27	3.30	0	0.22	0.102
1.00	14.28	0.50	2.70	0.47	0.36	0.118
2.00	14.10	1.41	2.30	0.54	0.75	0.228
2.75	13.33	1.23	1.99	0.65	0.77	0.163
4.50	13.17	2.06	1.70	0.92	1.50	0.200
6.00	13.65	3.52	1.00	0.65	2.55	0.686
7.00	12.68	3.65	1.10	0.52	2.31	0.603
10.00	12.83	5.17	0.44	0	3.08	0.501

* La thyroglobuline de Porc utilisée pour ces recherches est pauvre en iode et de teneur en tyrosine normale, comme tel est en général le cas pour cette protéine au cours des mois d'hiver dans les élevages de la région marseillaise. Elle provenait de glandes fraîches, pesant en moyenne 12-14 grammes.

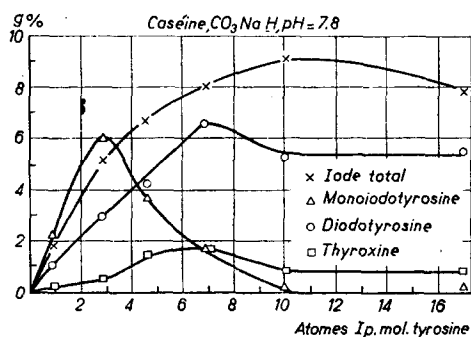


Fig. 1. Teneurs en iode total, en monoiodotyrosine, en diiodotyrosine et en thyroxine des iodocaséines en fonction du nombre d'atomes d'iode mis en oeuvre par molécule de tyrosine initialement présente. Halogénéation à $pH = 7.8$. Abscisses: atomes I par molécule de tyrosine.

Ordonnées: p. 100 des constituants dosés

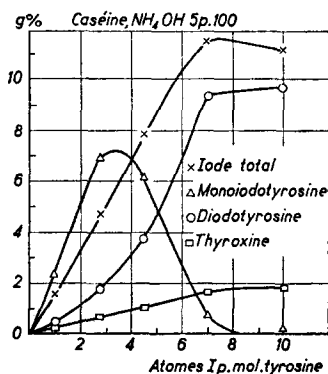


Fig. 2. Teneurs en iode total, en monoiodotyrosine, en diiodotyrosine et en thyroxine des iodocaséines en fonction du nombre d'atomes d'iode mis en oeuvre par molécule de tyrosine initialement présente. Halogénéation en milieu ammoniacal. Abscisses: atomes I par molécule de tyrosine. Ordonnées: p. 100 des divers constituants dosés

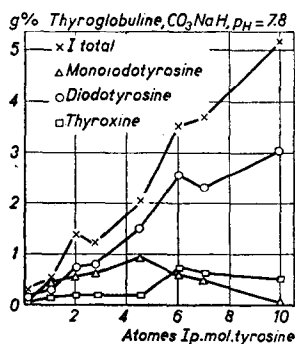


Fig. 3. Teneurs en iode total, en monoiodotyrosine, en diiodotyrosine et en thyroxine des iodothyroglobulines en fonction du nombre d'atomes d'iode mis en oeuvre par molécule de tyrosine initialement présente. Halogénéation à $pH = 7.8$. Abscisses: atomes I par molécule de tyrosine. Ordonnées: p. 100 des divers constituants dosés

L'ioduration de la caséine s'opère progressivement jusqu'à une sorte de saturation, atteinte lorsque l'on met en oeuvre 8 à 10 atomes d'iode par molécule de tyrosine. Ce phénomène a été signalé depuis longtemps par BLUM et STRAUSS². Il est plus net en milieu ammoniacal de faible potentiel oxydant, qu'en milieu bicarbonaté ($p_H = 7.8$), où un excès d'halogène conduit à une dégradation de la tyrosine entraînant une perte en iode. La moniodotyrosine prend naissance en abondance lorsque des quantités relativement faibles d'iode entrent en réaction et la diiodotyrosine se forme aux dépens de la première en présence d'un excès d'halogène. Le taux maximum en dérivé substitué a été atteint en milieu ammoniacal, où, contrairement à ce qui a lieu à $p_H = 7.8$, l'action de quantités massives d'iode ne l'abaisse pas. Il en est de même de la teneur en thyroxine des iodocaséines. Comme l'ont observé REINEKE et TURNER¹³, le rendement en thyroxine passe par un optimum lorsque l'on fait réagir 6 à 7 atomes d'iode par molécule de tyrosine à $p_H = 7.8$. Le même phénomène se manifeste dans le cas de la thyroglobuline et dans celui de la caséine. Par contre, il n'a pas lieu lorsque les protéines sont halogénées en solution ammoniacale. L'évolution de ces processus est très voisine dans les deux protides étudiés, à ceci près que la caséine, beaucoup plus riche en tyrosine, s'iodo à un degré plus élevé que la thyroglobuline. Les différences observées dans le comportement de ces protéines traduisent à la fois l'inégalité du rendement de leur halogénéation en dérivés iodés et la plus grande réactivité d'une partie de la tyrosine dans la caséine. La signification de ces faits sera examinée plus bas.

Il a paru important de ne pas limiter cet examen d'ensemble à la formation des dérivés iodés de la tyrosine, mais de le faire porter en outre, d'une part, sur l'ioduration de la protéine en dehors de cet acide aminé et, d'autre part, sur la dégradation de la tyrosine et de la thyroxine par action de l'halogène sur les protéines. Nous nous sommes tout d'abord attachés à préciser dans quelle mesure la fixation de l'iode aux protéines s'opère sur le cycle benzénique de la tyrosine et porte sur d'autres acides aminés de la caséine et de la thyroglobuline, à divers degrés d'ioduration de celles-ci. Pour cela, nous avons calculé les taux d'iode de la moniodotyrosine, de la diiodotyrosine et de la thyroxine de chaque échantillon, connaissant sa teneur en ces acides aminés et sachant que ceux-ci renferment respectivement 41.40 %, 58.63 % et 65.35 % I. La somme des valeurs obtenues pour chacun de ces corps, soit $e = b + c + d$, correspond à la teneur de la protéine en iode fixé aux iodotyrosines et à la thyroxine. La différence entre la teneur en iode total, a et e , indique la teneur de la protéine en iode combiné en dehors du cycle de la tyrosine (dérivés mono- et diiodé et thyroxine). Les résultats de ces calculs ont été rassemblés dans le Tableau III.

L'examen de ce tableau fait ressortir sans ambiguïté que, dans tous les cas étudiés, de l'iode s'unit aux protéines en dehors de la tyrosine avant que le cycle de celle-ci n'ait fixé deux atomes d'halogène. Néanmoins, la formation des combinaisons étrangères à la tyrosine est notablement plus intense après blocage par l'iode des positions 3 et 5 du cycle de cette dernière. Elle est plus importante en milieu ammoniacal et, par ailleurs, la thyroglobuline et la caséine s'iodent inégalement dans des conditions identiques, et cela en raison de leur diversité de composition et de structure.

Dans un autre domaine, nous avons cherché à mettre en évidence la dégradation éventuelle d'une partie de la tyrosine et de ses dérivés dans des réactions secondaires évoluant au cours de l'ioduration et auxquelles on peut attribuer la diminution du rendement en thyroxine en présence d'un fort excès d'halogène. Il convenait pour cela de calculer la teneur théorique en azote initialement apporté par la tyrosine dans chaque

TABLEAU III

TENEURS EN IODE TOTAL, EN IODE DE LA MONOIODOTYROSINE, DE LA DIIODOTYROSINE ET DE LA THYROXINE ET EN IODE COMBINÉ EN DEHORS DE CES ACIDES AMINÉS, DE CASÉINES ET DE THYROGLOBULINES À DIVERS DEGRÉS D'HALOGÉNATION

Atomes I mis en oeuvre par mol de tyrosine	I % (a)	I de monoiodotyrosine % (b)	I de diiodotyrosine % (c)	I de thyroxine % (d)	Somme (b+c+d = e)	I non comb. à tyrosine (a-e)
A. IODOCASÉINES OBTENUES EN MILIEU BICARBONATÉ (pH = 7.8)						
0.95	1.95	0.92	0.61	0.14	1.67	+ 0.28
2.83	5.12	2.48	1.74	0.31	4.53	+ 0.59
4.50	6.76	1.51	2.49	0.95	4.95	+ 1.81
6.90	8.08	0.69	3.82	1.02	5.53	+ 2.75
10.00	9.20	0	3.12	0.56	3.68	+ 5.52
17.00	7.93	0	3.22	0.53	3.75	+ 4.18
B. IODOCASÉINES OBTENUES EN MILIEU AMMONIACAL						
1.00	1.62	0.97	0.40	0.27	1.64	— 0.02
2.75	4.67	2.87	1.07	0.42	4.36	+ 0.31
4.50	7.85	2.57	2.21	0.69	5.47	+ 2.38
7.00	11.50	0.33	5.46	1.06	6.85	+ 4.85
10.00	11.10	0	5.63	1.18	6.81	+ 4.29
C. IODOTHYROGLOBULINES OBTENUES EN MILIEU BICARBONATÉ (pH = 7.8)						
1.00	0.50	0.19	0.21	0.08	0.48	+ 0.02
2.00	1.41	0.22	0.44	0.15	0.81	+ 0.60
2.75	1.23	0.27	0.45	0.11	0.83	+ 0.40
4.50	2.06	0.38	0.88	0.13	1.39	+ 0.67
6.00	3.52	0.27	1.50	0.45	2.22	+ 1.30
7.00	3.65	0.21	1.35	0.40	1.96	+ 1.69
10.00	5.17	0	1.81	0.33	2.14	+ 3.03

produit, d'une part, et celles en azote de la tyrosine, de la monoiodotyrosine, de la diiodotyrosine et de la thyroxine présentes dans les mêmes iodoprotéines, d'autre part. Lapremière doit, en effet, être identique à la somme des secondes si la tyrosine et ses dérivés n'ont pas été altérés au cours de la réaction. Dans le cas contraire, la différence entre ces deux données doit traduire l'existence et la grandeur de la perte en tyrosine initialement présente. La teneur en azote que cet acide aminé doit théoriquement apporter dans une iodoprotéine a été calculée par la formule :

$$\frac{[\text{N \% de l'iodoprotéine}] \cdot [\text{Tyrosine \% de la protéine non iodée}] \cdot [\text{N \% de la tyrosine}]}{[\text{N \% de la protéine non iodée}] \cdot 100}$$

Soit f la valeur obtenue. Soient respectivement a' , b' , c' et d' les teneurs en azote présent dans la tyrosine, la monoiodotyrosine, la diiodotyrosine et la thyroxine, calculées à partir du taux de ces acides aminés et sachant qu'ils renferment respectivement 7.74 %, 4.56 % et 3.23 % N. La somme $e' = a' + b' + c' + d'$, est égale à f si la tyrosine et ses dérivés n'ont pas été altérés au cours de l'ioduration. La différence: $e' - f$ est alors nulle, alors que sa valeur négative objectivise l'existence de pertes lorsque f est supérieur à e' . Ce calcul ne saurait être très rigoureux pour plusieurs raisons, entre autres la perte d'azote par désamination pouvant survenir au cours de l'halogénéation et l'imprécision du dosage de faibles taux d'acides aminés participant au bilan. Il permet néanmoins une approximation assez satisfaisante, comme il ressort de l'examen du Tableau IV.

TABLEAU IV

VALEURS EXPÉRIMENTALES DES TENEURS EN AZOTE DE LA TYROSINE, DE LA MONOIODOTYROSINE, DE LA DIIODOTYROSINE ET DE LA THYROXINE D'IODOCASÉINES ET D'IODOTHYROGLOBULINES À DIVERS DEGRÉS D'IODURATION ET TENEUR THÉORIQUE EN AZOTE APPORTÉ PAR LA TYROSINE INITIALEMENT PRÉSENTE DANS LES MÊMES PRODUITS

Atomes I mis en oeuvre par mol de tyrosine	N tyro- sine % (a')	N monoiodo- tyrosine % (b')	N diiodo- tyrosine % (c')	N thyro- xine % (d')	N de tyr. et dér. % (a' + b' + c' + d') = (e')	N théor. de tyro- sine % (f')	Bilan (e'—f')
A. IODOCASÉINES OBTENUES EN MILIEU BICARBONATÉ (pH = 7.8)							
0.95	0.351	0.101	0.034	0.0039	0.489	0.473	+ 0.016
2.83	0.085	0.274	0.096	0.0085	0.463	0.425	+ 0.038
4.50	0.016	0.166	0.137	0.0261	0.345	0.452	— 0.117
6.90	0.008	0.076	0.211	0.0281	0.324	0.430	— 0.106
10.00	0	0	0.171	0.0154	0.186	0.427	— 0.241
17.00	0	0	0.177	0.0147	0.191	0.362	— 0.171
B. IODOCASÉINES OBTENUES EN MILIEU AMMONIACAL							
1.00	0.324	0.107	0.022	0.0075	0.505	0.441	+ 0.064
2.75	0.066	0.317	0.059	0.0117	0.447	0.453	— 0.006
4.50	0.008	0.284	0.122	0.0191	0.442	0.433	+ 0.009
7.00	0	0.036	0.300	0.0292	0.428	0.365	— 0.063
10.00	0	0	0.310	0.0326	0.427	0.343	— 0.084
C. IODOTHYROGLOBULINES OBTENUES EN MILIEU BICARBONATÉ (pH = 7.8)							
1.00	0.209	0.0214	0.0116	0.0021	0.244	0.228	+ 0.016
2.00	0.178	0.0246	0.0242	0.0041	0.224	0.224	0
2.75	0.154	0.0296	0.0249	0.0029	0.211	0.212	+ 0.001
4.50	0.131	0.0419	0.0485	0.0036	0.225	0.209	+ 0.015
6.00	0.077	0.0296	0.0824	0.0123	0.219	0.202	+ 0.017
7.00	0.085	0.0237	0.0746	0.0109	0.194	0.201	— 0.007
10.00	0.033	0	0.0995	0.0090	0.141	0.204	— 0.063

Une fraction plus ou moins importante de la tyrosine est altérée dans tous les cas lorsque l'ioduration est réalisée en présence d'un assez grand excès d'halogène. Cette fraction est beaucoup plus faible dans les produits obtenus en milieu ammoniacal, l'iodeure d'azote étant dépourvu des propriétés oxydantes des hypiodites. Par ailleurs, la destruction de la tyrosine est sensiblement moins intense dans la thyroglobuline que dans la caséine, toutes choses étant égales en ce qui concerne les conditions opératoires et les quantités d'iode réagissant avec une molécule de l'acide aminé*.

3. DISCUSSION DES RÉSULTATS

Les données obtenues dans ce travail permettent de discuter brièvement divers problèmes dont les principaux sont: les modalités de la fixation de l'halogène aux protéines, l'évolution des réactions secondaires à l'ioduration proprement dite, en particulier la formation de thyroxine, et, enfin, le comportement de la caséine et de la thyroglobuline en présence d'iode.

a. *Sur la fixation de l'iode à la tyrosine dans les protéines.* Selon une conception développée par BAUER et STRAUSS³, lorsqu'une protéine réagit avec des quantités croissantes d'iode, celui-ci se fixe d'abord à la tyrosine, puis au carbone du cycle d'autres

* Les valeurs positives de certains bilans n'ont aucune signification absolue; elles correspondent à des bilans nuls et traduisent la marge d'erreur de l'ensemble des dosages.

acides aminés et, enfin, à l'azote nucléaire de ceux-ci. Cette hypothèse ne repose que sur des données à bien des égards incertaines et notre travail montre, d'une part, que la tyrosine ne fixe préférentiellement l'iode qu'à un très faible degré d'halogénéation et, d'autre part, que cette réaction comporte successivement la formation du dérivé monoiodé, puis celle du dérivé diiodé de l'acide aminé.

Les teneurs en iode de la caséine et de la thyroglobuline dans lesquelles la totalité de la tyrosine serait présente à l'état de dérivé monoiodé sont, respectivement : 4.80 et 2.25 % I, celle des mêmes protéines où la tyrosine serait complètement diiodée : 9.16 et 4.41 % I*. Or, la présence d'iode combiné en dehors de la tyrosine (Tableau III, dernière colonne) est toujours très notable bien avant que de pareils taux d'halogène ne soient atteints, fait qui illustre la stérilité d'anciennes discussions tendant à établir une relation directe entre un certain degré de saturation en iode d'une protéine et sa teneur initiale en tyrosine. Les iodocaséines à taux d'iode inférieur à 5 % I et les iodothyroglobulines iodées à moins de 1.5 % I renferment de 80 à 90 % de l'halogène à l'état de monoiodotyrosine. La première étape de la réaction de substitution porte donc principalement sur la tyrosine, mais elle n'aboutit même pas à la saturation du cycle en iode sur la position 3 et n'affecte qu'une fraction assez faible de l'acide aminé. La transformation de la totalité de la tyrosine en dérivé monoiodé conduirait à un taux d'halogène de 4.80 % dans la caséine et de 2.25 % dans la thyroglobuline ; or les protéines de cette teneur en iode contiennent de la diiodotyrosine et d'autres dérivés iodés en quantité appréciable. Toutefois, la dihalogénéation de la tyrosine ne devient importante qu'à des taux d'iode assez élevés. C'est en effet à partir de la mise en œuvre de 6 atomes I par molécule de tyrosine que le taux du produit diiodé augmente très sensiblement, en même temps que les réactions de substitution sur d'autres cycles (histidine, tryptophane, phénylalanine) deviennent plus intenses, comme nous le discuterons dans un prochain travail. Dans ces conditions, la monoiodotyrosine se sature en iode et de la thyroxine se forme plus abondamment. Toutefois, les dérivés protéiques obtenus alors ne renferment jamais à l'état de diiodotyrosine et de thyroxine la totalité de la tyrosine initialement présente.

La représentation du processus d'halogénéation des protéines proposée par BAUER et STRAUSS comporte donc une part de vérité, en ce sens que la tyrosine est l'acide aminé qui fixe le plus facilement l'iode par une réaction de substitution ; mais elle ne saurait être retenue, car elle n'objectivise que très grossièrement et de manière trop absolue les étapes successives de ce processus, sans tenir compte, par ailleurs, des pertes en tyrosine. L'évolution de celles-ci mérite d'être discutée en même temps que celle de la production de thyroxine.

b. *Sur la formation de la thyroxine et sur la dégradation de la tyrosine et de ses dérivés au cours de l'ioduration des protéines.* L'halogénéation de la tyrosine est une réaction de substitution distincte de la formation de la thyroxine, dont il convient d'examiner les modalités au cours de nos essais.

Pour REINEKE et TURNER¹³, REINEKE, WILLIAMSON et TURNER¹⁷, il existe un rende-

* Les teneurs maxima en monoiodotyrosine et en diiodotyrosine des iodocaséines et des iodothyroglobulines ont été calculées connaissant le poids moléculaire de la tyrosine et de ses dérivés (P.M. = 181 pour la tyrosine, 307 pour la monoiodotyrosine, et 433 pour la diiodotyrosine), le taux de tyrosine dans la caséine et dans la thyroglobuline (7.20 et 3.30 %) et les teneurs en iode des dérivés mono- et diiodé (41, 40 et 58.63 %), et en tenant compte des quantités d'iode théoriquement introduites par l'halogénéation de la totalité de la tyrosine (à 1 ou 2 atomes I). Par exemple, sachant que 1 g de tyrosine donne naissance à 2.39 g de dérivé diiodé, la quantité maxima de celui-ci pouvant exister dans la caséine est égale à : $(7.20 \cdot 2.39) \cdot 100 / (100 + [7.20 \cdot 2.39]) = 15.63 \%$. Le taux d'iode correspondant à la saturation totale de la tyrosine est égal à $15.63 \cdot 58.63 / 100 = 9.16 \%$ I.

ment optimum en thyroxine lorsque la caséine, les protéines du lait total ou du soja, sont soumises à l'action de 4.5 atomes d'iode par molécule de tyrosine en l'absence de catalyseur d'oxydation, à celle de 6 atomes d'halogène par reste du même acide aminé lorsque le milieu renferme Mn_2O_4 . Nos résultats traduisent le même phénomène, à ceci près que la caséine et la thyroglobuline y donnent naissance aux quantités les plus grandes de thyroxine lors de la réaction de 6 atomes d'iode avec chaque molécule de tyrosine de la protéine, à $p_H = 7.8$ en milieu bicarbonaté, sans adjonction d'aucun catalyseur. Par contre, il n'en est plus de même si la préparation de l'iodoprotéine est réalisée en solution ammoniacale: les produits les plus riches en iode ne sont pas plus pauvres en thyroxine que ceux obtenus en présence de 6 atomes d'halogène par molécule de tyrosine, mais ils sont plus riches en diiodotyrosine dans ces conditions.

Il est peu probable qu'il en soit ainsi parce que l'iode gêne alors la formation de la première et favorise celle de la seconde, puisque le rendement en ces deux dérivés passe par un maximum à un même degré d'halogénéation lorsque l'on réalise celle-ci en milieu bicarbonaté. On peut au contraire penser avec REINEKE et TURNER que, dans ce dernier cas, la thyroxine est oxydée par une réaction secondaire. Les données rassemblées dans le Tableau IV établissent que les autres dérivés de la tyrosine participent aussi à cette destruction. En effet, à partir d'un certain degré d'ioduration, la différence: N % de la tyrosine initialement mise en oeuvre dans la protéine — N % de la tyrosine et de ses trois dérivés iodés dans l'iodoprotéine, traduit un déficit d'azote de plus en plus grand en fonction du degré d'ioduration des produits. Cette perte peut atteindre jusqu'à 55 % de l'azote de la tyrosine lorsque l'halogénéation a été opérée en milieu bicarbonaté à $p_H = 7.8$; elle est très notablement moindre dans les produits obtenus en milieu ammoniacal. Elle ne correspond pas nécessairement à une destruction totale de l'acide aminé ou de ses dérivés; elle peut aussi traduire la transformation de ces corps en composés ne donnant plus les réactions caractéristiques sur lesquelles sont basés les dosages de la tyrosine et de ses produits d'ioduration. Pareil phénomène est peu important lorsque l'halogénéation est faible; il le devient quand 6 à 7 atomes d'iode réagissent avec 1 molécule de tyrosine présente dans une protéine. Or, une forte augmentation du rendement en thyroxine se manifeste alors simultanément*; aussi est-il probable que des processus d'oxydation participent à la genèse de ce produit en même temps qu'ils altèrent une partie de la diiodotyrosine et de la thyroxine présentes. Un certain degré d'hydrolyse des protéines favorise peut-être les réactions secondaires à l'halogénéation.

Ces observations illustrent la complexité des conditions exerçant une influence sur la formation de la thyroxine. Le rendement final en ce corps est lié à de multiples facteurs, entre autres à sa destruction partielle et à celle de ses précurseurs en même temps qu'à sa production. Il en découle que la quantité de thyroxine apparaissant au cours de l'ioduration d'une protéine dépend des modalités de l'action des réactifs. La signification des données obtenues dans ce domaine n'est donc jamais absolue; elle est fonction de la validité des comparaisons qu'il est permis de faire d'un essai à l'autre. Il sera très important à cet égard d'étudier indépendamment l'halogénéation d'une protéine et la transformation en thyroxine de la diiodotyrosine qu'elle renferme, au lieu de réaliser simul-

* Les rendements en thyroxine que nous avons obtenus sont en apparence inférieurs à ceux signalés par REINEKE et TURNER. Toutefois, comme la méthode de dosage employée par ces auteurs est moins spécifique que la nôtre, les résultats de REINEKE et TURNER doivent être considérés comme trop élevés. C'est là un point sur lequel nous avons déjà attiré l'attention¹⁶ et au sujet duquel nous reviendrons prochainement.

tanément ces deux réactions comme on l'a fait jusqu'ici. Nous espérons apporter bientôt les résultats d'expériences instituées dans ce but.

c. *Constitution des protéines et ioduration de la caséine et de la thyroglobuline.* Il n'existe aucun parallélisme étroit entre les teneurs d'une protéine en thyroxine et en ses précurseurs au cours de son halogénéation. Notre travail ne confirme pas sur ce point les données obtenues par RIVIÈRE, GAUTRON et THÉLY²² au moyen de méthodes de dosage moins spécifiques que les nôtres. L'existence d'un pareil rapport impliquerait, d'une part, que la formation des iodotyrosines et celle de la thyroxine évoluent avec des intensités proportionnelles, et, d'autre part, que la totalité des premières est susceptible de donner naissance au produit hormonal. Or, l'expérience montre que les protéines s'enrichissent en diiodotyrosine et s'appauvrissent en thyroxine en présence d'un excès de réactif. En outre, à des taux d'halogène relativement faibles, la plus grande partie de l'iode est présente dans de la monoiodotyrosine, laquelle n'est pas directement génératrice de thyroxine. Aussi, une constance du rapport : I thyroxinien / I diiodotyrosinien ou : I thyroxinien / I total, ne peut-elle être que fortuite.

L'absence d'une proportionnalité définie entre les teneurs en thyroxine et en iodotyrosines est manifeste dans nos essais. Par ailleurs, un excès du dérivé diiodé apparaît à un degré d'halogénéation plus grand que celui où le rendement en thyroxine est maximum. Il en découle que *toutes les molécules de tyrosine présentes dans la protéine ne réagissent pas identiquement avec l'iode*. L'interprétation la plus simple de ces faits est que la position et l'état (mode de combinaison) des molécules de tyrosine dans les chaînes peptidiques déterminent leur aptitude à participer à la réaction génératrice de thyroxine. Celle-ci n'est sans doute possible qu'entre deux restes de tyrosine voisins. Lorsque leur éloignement ou leur orientation empêche ceux-ci de réagir, l'acide aminé demeure à l'état de diiodotyrosine ou est détruit par des processus secondaires d'oxydation*. Dès lors, la notion d'un rapport étroit entre la teneur en tyrosine d'une protéine et son aptitude à donner naissance à de la thyroxine apparaît comme trop sommaire. Elle doit être complétée par celle de la présence de certaines molécules de tyrosine dans une position privilégiée favorable à leur condensation après ioduration. Il est possible que la réactivité de ces molécules soit aussi liée au blocage du groupement aminé ou carboxylique du reste d'alanine fixé au cycle benzénique; des essais poursuivis sur des peptides de la tyrosine de constitution convenablement choisie permettront sans doute d'établir à cet égard des données significatives.

La teneur en tyrosine et la structure d'une protéine déterminant son comportement en tant que corps générateur de thyroxine et de ses précurseurs, il n'est pas surprenant que l'ioduration de la caséine et celle de la thyroglobuline n'évoluent pas de manière rigoureusement identique. Toutes choses étant égales en ce qui concerne les modalités de l'ioduration, le rendement de la caséine en thyroxine est nettement supérieur à celui de la protéine thyroïdienne. Cependant, la teneur en azote thyroxinien de l'iodoprotéine, exprimée en pour 100 de celui initialement apporté par la tyrosine**, est très voisine dans les deux produits obtenus en milieu bicarbonaté avec un rendement optimum en thyroxine. En effet, l'azote thyroxinien représente alors 6,51 % de N de la tyrosine totale théoriquement présente dans l'iodocaséine (6,9 atomes I par molécule de tyro-

* Le fait que le rendement en thyroxine de l'oxydation de la diiodotyrosine libre par l'eau oxygénée est très faible (HARRINGTON et PITT RIVERS²³) est également en faveur de cette opinion.

** Cette donnée a été calculée à partir de valeurs figurant au Tableau IV; elle exprime le rapport : N de thyroxine % · 100/N de tyrosine initialement présente dans 100 parties de l'iodoprotéine étudiée.

sine) et 6.80 % dans la thyroglobuline iodée (6 atomes I par molécule du même acide aminé). Il en découle que, dans un cas comme dans l'autre, une fraction très peu différente de la tyrosine totale est génératrice de thyroxine dans des conditions identiques. Par contre, la teneur en azote de la diiodotyrosine (% de N de tyrosine initialement présente) est égale à 49.7 % dans la même iodocaséine et à 37.6 % dans la même iodothyroglobuline. Enfin, la teneur en azote de la monoiodotyrosine (% de N de la tyrosine initialement présente) est de 17.6 % dans la première et de 13.6 % dans la seconde. Tout se passe donc comme si la fraction génératrice de thyroxine réagissait identiquement dans les deux protéines et si l'autre fraction de la tyrosine présentait un comportement particulier dans la caséine et dans la thyroglobuline. Le fait que la formation de diiodotyrosine en abondance exige des quantités d'iode plus importantes dans la thyroglobuline que dans la caséine est favorable à cette hypothèse. De même, la réactivité de l'histidine et du tryptophane vis-à-vis de l'iode ne paraît pas être identique dans ces deux corps.

De toute manière, la structure de la protéine intervient directement dans l'aptitude de la tyrosine qu'elle renferme à donner naissance à de la thyroxine sous l'action de l'iode. A cet égard, la thyroglobuline ne présente aucun caractère particulier; mais il n'est pas certain que son ioduration physiologique procède par le même mécanisme que son halogénéation par voie chimique. Néanmoins, on peut se demander dans quelle mesure la spécificité du corps thyroïde en tant que lieu de formation de la thyroxine tient à la présence d'un système enzymatique d'ioduration efficace plutôt qu'à la nature de la protéine servant de substrat à ce dernier.

RÉSUMÉ

1. La formation de monoiodotyrosine, de diiodotyrosine et de thyroxine et la disparition de la tyrosine dans la caséine et dans la thyroglobuline soumises à l'action de quantités croissantes d'iode ont été étudiées dans diverses conditions.

2. L'iode participe à des réactions de *substitution*, particulièrement intenses en milieu ammoniacal, et à des réactions d'*oxydation*, plus importantes à $\text{pH} = 7.8$ et en présence de bicarbonate de sodium. Les premières portent préférentiellement sur la tyrosine, mais aussi sur d'autres acides aminés (histidine, tryptophane), et cela avec une intensité croissante en fonction des quantités d'halogène mises en oeuvre. L'ioduration d'une protéine n'affecte spécifiquement la tyrosine qu'à des taux d'halogène très faibles.

3. De la monoiodotyrosine est présente en abondance dans les produits faiblement iodés; elle se transforme progressivement en diiodotyrosine sous l'action de quantités plus grandes d'iode, une fraction du dérivé disubstitué donnant alors simultanément naissance à de la thyroxine. La formation de celle-ci n'est pas seulement fonction de la *teneur* en tyrosine d'une protéine, toutes choses étant égales du côté des conditions de l'ioduration. La *position* de cet acide aminé dans la molécule protéique détermine sa réactivité. Une fraction importante de la diiodotyrosine paraît inapte à donner naissance à de la thyroxine.

4. Des processus d'oxydation altèrent la thyroxine au cours de l'halogénéation des protéines surtout en milieu bicarbonaté à $\text{pH} = 7.8$; ils décomposent également une partie de la tyrosine et de ses dérivés de substitution. L'existence d'un optimum de rendement en thyroxine en présence de 6-7 atomes d'iode par molécule de tyrosine illustre l'importance de ces réactions lors de la mise en oeuvre d'un excès d'halogène.

5. La caséine s'iodo plus facilement et plus intensément que la thyroglobuline, toutes choses étant égales du côté des quantités d'halogène réagissant avec une même quantité de tyrosine. Néanmoins, l'une et l'autre donnent naissance à des quantités de thyroxine correspondant à des proportions très voisines de la tyrosine totale qu'elles renferment. Il en découle que la thyroglobuline ne présente aucune aptitude particulière à la formation de thyroxine par ioduration chimique.

SUMMARY

1. The formation of mono-iodotyrosine, of di-iodotyrosine and of thyroxine, and the disappearance of tyrosine from casein and thyroglobulin under the action of increasing quantities of iodine have been studied under various conditions.

Bibliographie p. 465.

2. The iodine takes part in *substitution* reactions, particularly intense in ammoniacal medium, and in *oxidation* reactions, more important at pH 7.8 and in the presence of sodium bicarbonate. The former are concerned preferentially with tyrosine, but also with other amino acids (histidine, tryptophan) and to an extent that increases with the quantity of halogen. Iodination of a protein is confined specifically to tyrosine only at very low concentrations of halogen.

3. Mono-iodotyrosine is abundantly present in the products of weak iodination, but it is progressively transformed into di-iodotyrosine under the action of greater quantities of iodine, and at the same time part of the di-substitution product gives rise to thyroxine. Thyroxine formation is a function not only of the tyrosine *content* of the protein but also of the *position* of this amino acid in the molecule. An important fraction of the di-iodotyrosine appears incapable of giving rise to thyroxine.

4. Oxidation processes alter the thyroxine during the halogenation of proteins, especially in a bicarbonate medium at pH 7.8; similarly, they decompose part of the tyrosine and its substitution products. The existence of an optimum yield of thyroxine in the presence of 6-7 atoms of iodine per molecule of tyrosine illustrates the importance of such reactions when the halogen is present in excess.

5. When the same quantities of halogen react with a given quantity of tyrosine casein is iodinated more easily and more intensely than thyroglobulin. Nevertheless, both give rise to thyroxine in quantities corresponding closely to the proportions of their tyrosine total contents. It thus appears that thyroglobulin has no special aptitude for the formation of thyroxine by chemical iodination.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Bildung von Monojodtyrosin, Dijodtyrosin und Thyroxin und die Abnahme des Tyrosins in Casein und Thyreoglobulin, die der Einwirkung von steigenden Jodmengen ausgesetzt waren, wurden untersucht.

2. Das Jod nimmt an *Substitutionsreaktionen* teil, die in ammoniakalem Milieu besonders stark sind, und an *Oxydationsreaktionen*, die bei pH 7.8 und bei Anwesenheit von Natriumbicarbonat am wichtigsten sind. Die ersteren Reaktionen betreffen vorzugsweise das Tyrosin, aber auch andere Aminosäuren (Histidin, Tryptophan), und zwar mit steigender Intensität als Funktion der benutzten Halogenmengen. Die Jodierung eines Proteins trifft das Tyrosin spezifisch nur bei sehr geringen Halogenmengen.

3. Das Monojodtyrosin ist in den schwach jodierten Produkten in grosser Menge anwesend; unter dem Einfluss grösserer Jodmengen wird es fortschreitend in Dijodtyrosin umgesetzt, und ein Teil dieses disubstituierten Produktes verursacht nun gleichzeitig das Entstehen von Thyroxin. Dessen Bildung hängt nicht nur von dem Tyrosingehalt eines Eiweisskörpers ab, wenn alle anderen Jodierungsbedingungen gleichbleiben. Die *Lage* dieser Aminosäure im Eiweissmolekül bestimmt ihre Reaktivität. Ein bedeutender Teil des Dijodtyrosins erweist sich als zur Thyroxinbildung ungeeignet.

4. Oxydationsprozesse verändern das Thyroxin im Laufe der Eiweisshalogenierung, vor allem in Bicarbonatmilieu von pH 7.8; sie bauen in gleichem Masse einen Teil des Tyrosins und seiner Substitutionsderivate ab. Die Existenz eines Optimumthyroxinertrages bei Anwesenheit von 6-7 Atomen Jod pro Tyrosinmolekül zeigt die Bedeutung dieser Reaktionen, sobald man Halogenüberschuss benutzt.

5. Das Casein ist leichter und stärker zu jodieren als das Thyreoglobulin, wenn alle Bedingungen gleich sind und gleiche Mengen Jod mit derselben Tyrosinmenge reagieren. Trotzdem entstehen bei beiden Stoffen Thyroxinmengen, die zu den Tyrosinmengen, die die Stoffe enthalten, in engem Verhältnis stehen. Daraus folgt, dass das Thyreoglobulin keine besondere Eignung zur Thyroxinbildung durch chemische Jodierung besitzt.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. OSWALD, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 70 (1910) 310; 71 (1911) 200; 74 (1911) 290.
- ² F. BLUM UND E. STRAUSS, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 112 (1921) 111; 127, (1923) 199.
- ³ H. BAUER UND E. STRAUSS, *Biochem. Ztschr.*, 284 (1936) 197; 284 (1936) 231.
- ⁴ E. STRAUSS UND R. GRÜTZNER, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 112 (1921) 167.
- ⁵ I. ABELIN, *Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol.*, 175 (1934) 146; 181, (1936) 250; *Helv. chim. Act.*, 25 (1942) 1421.
- ⁶ W. LUDWIG UND P. VON MUTZENBECHER, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 258 (1939) 195.
- ⁷ C. R. HARRINGTON AND R. PITT RIVERS, *Nature*, 144 (1939) 205.
- ⁸ R. PITT RIVERS AND S. S. RANDALL, *J. of Endocrinol.*, 4 (1945) 221.
- ⁹ E. P. REINEKE ET C. W. TURNER, *J. of biol. Chem.*, 149 (1943) 555; 149 (1943) 563.
- ¹⁰ E. P. REINEKE ET C. W. TURNER, *Endocrinol.*, 36 (1945) 200.

- ¹¹ J. MUUS, A. H. COONS, AND W. T. SALTER, *J. of biol. Chem.*, 139 (1941) 135.
- ¹² E. P. REINEKE ET C. W. TURNER, *J. of biol. Chem.*, 161 (1945) 613.
- ¹³ E. P. REINEKE, C. W. TURNER, G. O. KOHLER, R. D. HOOVER, AND M. B. BEEZLEY, *J. of biol. Chem.*, 161 (1945) 599.
- ¹⁴ C. R. HARRINGTON, *Proc. Roy. Soc., B*, 132 (1944) 223.
- ¹⁵ J. ROCHE ET R. MICHEL, *Ann. Pharm. franç.*, 4 (1946) 1; *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 335. sous presse.
- ¹⁶ R. MICHEL ET M. LAFON, *C. R. Soc. Biol.*, 140 (1946) 635.
- ¹⁷ E. P. REINEKE, M. B. WILLIAMSON, AND C. W. TURNER, *J. of biol. Chem.*, 143 (1942) 285; 147 (1943) 115.
- ¹⁸ J. W. CAVETT, C. O. RICE, AND J. F. MACCLENDON, *J. of biol. Chem.*, 110 (1935) 673.
- ¹⁹ P. VON MUTZENBECHER, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 261 (1939) 253.
- ²⁰ T. LEIPERT, *Mikrochem.* (PREGL's Festschrift) (1929) 266.
- ²¹ J. W. H. LUGG, *Biochem. J.*, 32 (1938) 775.
- ²² C. RIVIÈRE, G. GAUTRON ET M. THELY, *C. R. Acad. Sc.*, 224 (1947) 423.
- ²³ C. R. HARRINGTON AND R. PITT RIVERS, *Biochem. J.*, 39 (1945) 157.

Reçu le 28 Mai 1947