

TENEUR EN THYROXINE ET ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DE DIVERSES PROTÉINES ARTIFICIELLEMENT IODÉES (CASÉINE, INSULINE, THYROGLOBULINE) ET DE LA THYROGLOBULINE

par

JEAN ROCHE, GUY-H. DELTOUR, RAYMOND MICHEL ET SABINE MAYER

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

I. INTRODUCTION

Des protéines artificiellement iodées d'égale teneur en halogène présentent, selon leur mode de préparation, une activité plus ou moins intense sur la métamorphose des Batraciens, les échanges respiratoires, la créatinurie, la sécrétion lactée et le rythme cardiaque. Cette notion, souvent discutée dans des travaux anciens¹, a été soumise à un nouvel examen^{2, 3, 4, 5}, après que LUDWIG ET VON MUTZENBECHER⁶ eurent démontré la formation de thyroxine par ioduration des protéines. Or, s'il est certain que les effets physiologiques de l'administration des iodoprotéines sont dus à cet acide aminé, un problème demeure posé en ce qui concerne les conditions de sa formation et de son efficacité dans les molécules protéiques.

Pour REINEKE ET TURNER⁷, REINEKE, WILLIAMSON ET TURNER⁸, il existe un parallélisme étroit entre l'intensité de l'activité biologique des iodoprotéines et leur teneur en thyroxine, dosée par une méthode établie par REINEKE, TURNER, HOOVER, BEEZLEY ET KOHLER⁸ et dérivant de celle de LELAND ET FOSTER⁹. Les techniques de préparation des iodoprotéines actives conduiraient seules à la formation de quantités importantes de cet acide aminé. Pour PITT-RIVERS ET RANDALL⁵, pour DEANESLY ET PARKES¹⁰, au contraire, l'iode acido-insoluble, lequel correspond à l'iode thyroxinien dans les thyroglobulines, présente dans les iodoprotéines un taux sans relation avec les effets physiologiques de celles-ci. Or, ROCHE ET MICHEL¹¹, étudiant le dosage des acides aminés iodés dans les protéines artificiellement halogénées, ont montré que les méthodes de dosage employées dans ces divers travaux comportent une erreur par excès plus ou moins grande et proposé une technique plus spécifique. La mise en œuvre de celle-ci dans des conditions diverses¹² a permis de constater que la formation de thyroxine n'exige pas l'incubation prolongée des iodoprotéines en présence d'iode, opération qui fait apparaître ou renforce leur activité^{2, 3}. Aussi devait-on se demander dans quelle mesure les propriétés physiologiques de ces produits ne sont fonction que de leur teneur en thyroxine.

REINEKE ET TURNER¹³ ont observé que l'action métabolique d'iodocaséines ingérées par des ruminants correspond à celle d'une très faible fraction de la thyroxine présente (5% chez le Mouton), en sorte que l'assimilation de ces produits paraît commander l'efficacité de leur ingestion. Ainsi s'expliquerait que l'administration à des rats de

quantités importantes d'iodoprotéines n'augmente pas leur métabolisme respiratoire, alors que celle de petites quantités de l'hydrolysat enzymatique de celles-ci est active à cet égard¹⁴. BRANDT, MATTIS ET NOLTE¹⁵ semblent avoir les premiers formulé cette réserve, que l'on peut faire reposer sur le fondement théorique suivant. La réaction d'oxydation allant de pair avec celle d'halogénéation modifie la structure de la protéine (ouverture de cycles, désamination, déméthylation). Elle doit, en conséquence modifier leur sensibilité aux protéinases digestives ou tissulaires, lesquelles ne libéreraient plus alors la thyroxine qu'avec une extrême lenteur. Le degré d'oxydation des protéines, variable selon les conditions de l'ioduration, paraît donc susceptible d'exercer une action importante sur l'utilisation de la thyroxine présente dans celles-ci. Il en découle que la relation entre l'activité biologique des iodoprotéines et leur teneur en thyroxine n'est pas encore entièrement définie et qu'il y a intérêt à préciser si, comme le pensent REINEKE et ses collaborateurs, la synthèse de la thyroxine est régie par les facteurs qui commandent aussi la formation de produits biologiquement actifs. L'étude chimique de cette réaction pourrait alors tirer profit des données établies dans le domaine biologique.

En dehors de son aspect général, ce problème doit être envisagé sur un autre plan. Le rendement en thyroxine des protéines soumises à l'ioduration, calculé à partir de données établies par voie chimique, n'est pas seulement fonction de leur teneur en tyrosine, mais aussi de leur structure¹². Il y avait lieu de rechercher en outre si l'activité biologique de diverses protéines halogénées dans des conditions identiques est proportionnelle à leur teneur en thyroxine. Le cas de la thyroglobuline méritait à cet égard d'être particulièrement étudié, car cette protéine pouvait, en raison de sa fonction physiologique, présenter des propriétés spécifiques.

Au demeurant, une question est depuis longtemps posée au sujet de l'activité de la thyroglobuline. BARNES¹⁶, LERMAN ET SALTER¹⁷, MEANS, LERMAN ET SALTER¹⁸ ont constaté que l'effet de la thyroxine sur les échanges respiratoires est plus fort lorsque cet acide aminé est présent dans la thyroglobuline que lorsqu'il est libre. Il y avait lieu de confirmer ce fait en ce qui concerne le pouvoir antigoitrogène des produits thyroïdiens, afin de préciser si l'activité des protéines iodées doit être rapportée directement à leur teneur en thyroxine, comme le font REINEKE ET TURNER. Cette question, à l'étude de laquelle nous espérons apporter une contribution, est importante à résoudre, en ce sens que l'on ne pourra définir l'activité absolue de la thyroglobuline, en l'exprimant par rapport à la thyroxine, que dans la mesure où une réponse lui sera donnée.

Le but de ce travail est de rechercher: 1. dans quelle mesure la voie d'administration, orale ou intrapéritonéale, et la digestion préalable des iodoprotéines modifie leur activité biologique; 2. si la caséine, l'insuline et la thyroglobuline iodées par une même technique sont actives proportionnellement à leur teneur en thyroxine et si leur mode de préparation modifie au même degré cette dernière et leur efficacité physiologique; 3. si l'activité biologique de l'unité de poids de thyroxine est identique dans les préparations de thyroglobuline et dans celles de l'acide aminé pur.

II. PARTIE EXPÉRIMENTALE

A. Techniques

Nous avons préparé une série d'échantillons d'iodoprotéines par des techniques diverses et nous en avons étudié l'activité sur la métamorphose de tétrards de Batraciens et sur le goitre expérimental du Rat préalablement traité au 6-N propylthiouracile.

Trois types d'essais ont été réalisés au cours de ce travail; ils ont comporté respectivement l'ingestion d'iodoprotéines, celle de leurs hydrolysats trypsiques et l'injection intrapéritonéale des premières.

Les procédés d'ioduration employés sont, soit l'halogénéation en milieu ammoniacal par l'iodure d'azote^{2, 19}, laquelle donne naissance à des produits inactifs ou peu actifs, que nous désignerons au cours de ce travail sous le nom d'iodoprotéines A, soit l'ioduration à $p_H = 7.5-8.0$ en solution renfermant du bicarbonate de sodium à un taux voisin de 1%. Cette opération a été réalisée dans des conditions diverses. Pour REINEKE et ses collaborateurs, l'addition d'iode en poudre à des solutions de caséine en milieu bicarbonaté de $p_H = 7.8$, opérée par petites portions en 2 heures à 37°, conduirait à la fixation de l'halogène sans conférer à la protéine d'activité importante et sans provoquer une synthèse notable de thyroxine. Cette dernière évoluerait par contre en 20 heures, lorsque le milieu est, dans un second temps, chauffé à 70° sous agitation continue. Aussi avons-nous préparé des iodocaséines soit par la méthode originale des auteurs américains appliquée dans ses deux temps (produits B), soit en arrêtant les opérations à la fin du premier (produits C). Enfin, nous avons réalisé dans un certain nombre de cas l'ioduration en milieu bicarbonaté par l'iode en solution agissant à 45° pendant 30 minutes¹², les produits D obtenus étant inactifs sur les échanges respiratoires, bien que relativement riches en thyroxine. Dans tous les cas choisis comme exemples, nous avons fait réagir 6 atomes I par molécule de tyrosine, le rendement le plus élevé en thyroxine étant alors obtenu^{3, 7, 12, 16}.

Des caséines, des insulines et des thyroglobulines pures ont été iodées par ces diverses techniques. La caséine (Vache) a été préparée par la méthode de LINDESTRÖM-LANG²⁰, la thyroglobuline par celle de DERRIEN, MICHEL ET ROCHE²¹; l'insuline était un produit cristallisé de diverses origines, dont les échantillons employés renfermaient tous 12.2% de tyrosine*. Les dérivés iodés de ces protéines ont été analysés, leur teneur en iode total étant déterminée par la méthode de LEIPERT²² et leur teneur en thyroxine par les méthodes de REINEKE, TURNER, KOHLER, HOOVER ET BEEZLEY⁸ et de ROCHE ET MICHEL¹¹. Cette dernière donne seule des résultats ne comportant probablement pas d'erreur par excès; il a néanmoins paru utile d'opérer dans un certain nombre de cas le dosage décrit par REINEKE et ses collaborateurs, afin de tenir compte de ses résultats dans la discussion. On trouvera dans le Tableau I les valeurs obtenues, auxquelles nous avons joint des données relatives à des préparations de thyroglobuline, les unes pures, les autres brutes (extrait thyroïdien total).

L'activité de ces produits sur la métamorphose du têtard de *Bufo bufo* et sur le poids du corps thyroïde de rats porteurs d'un goître expérimental au 6.N-propylthiouracile a été étudiée. Les essais poursuivis sur Batracien ont constitué une recherche d'orientation, car le manque de spécificité de la réponse des têtards à de multiples composés iodés empêche de lui attribuer une valeur absolue. Néanmoins, la valeur relative des informations que l'on peut recueillir par son étude quantitative dans des conditions soigneusement standardisées ne saurait être mise en doute. Nous avons poursuivi cette étude par la méthode de DEANESLY, EMMETT ET PARKES²³. Pour cela, des lots de cinq têtards de *Bufo bufo* mesurant de 28 à 32 mm de long, immergés dans 250 ml d'eau

* Nous remercions très vivement les Professeurs J. C. DRUMMOND (Nottingham), E. JORPES (Stockholm) et K. LINDESTRÖM-LANG (Copenhague) et les firmes BOOTS, VITRUM ET LEO, de nous avoir adressé les échantillons d'insuline cristallisée utilisée pour l'ensemble de nos travaux sur les iodoprotéines.

TABLEAU I
TENEURS EN IODE TOTAL ET EN THYROXINE DE DIVERSES IODOPROTÉINES

No. et nature de la protéine étudiée	I %	Thyroxine % dosée selon	
		ROCHE ET MICHEL	REINEKE et collaborateurs
Caséine iodée A No. 1	10.40	0.85	—
Caséine iodée A No. 1bis	10.20	0.83	1.70
Caséine iodée B No. 2	8.80	1.27	2.20
Caséine iodée B No. 12	9.23	1.23	2.90
Caséine iodée C No. 8	8.80	1.25	—
Caséine iodée C No. 9	7.98	0.86	—
Caséine iodée C No. 12bis	8.60	1.33	2.70
Caséine iodée D No. 17	8.40	1.25	—
Insuline iodée C	14.80	1.35	—
Thyroglobuline pure iodée C*	3.65	0.65	—
Thyroglobuline pure (Porc)*	0.41	0.21	—
Thyroglobuline brute (Porc)	0.38	0.21	—

* Valeurs moyennes de trois préparations de compositions très voisines

TABLEAU II

ACTION DU 6.N-PROPYLTHIOURACILE SUR LE POIDS ET LA TENEUR EN IODE DU CORPS THYROÏDE DE RATS MÂLES DE 60 À 80 g PLACÉS A 22° PENDANT 10 JOURS

Nombre d'animaux mis en expérience	Quantité de 6.N-propylthiouracile administrée par jour et par 100 g de poids corporel	Poids du corps thyroïde frais (mg par 100 g de poids corporel)	Iode total thyroïdien (mg par 100 g d'organe frais)
15 (témoins)	0	17.5	57
3	0.02	21.5	45
3	0.05	19.0	28
3	0.18	27.9	16
3	0.50	60.6	6
3	0.50	53.0	—
3	1.17	58.3	2
12	2.00	57.8	traces
9	2.35	55.7	..
3	4.90	57.0	..
3	7.50	74.5	..
3	20.00	60.2	..

ont reçu pendant un jour une dose définie d'iodoprotéine ajoutée à l'eau dans laquelle ils baignent. Les lots d'animaux ayant ingéré totalement le produit sont ensuite placés pendant deux jours dans la même quantité d'eau à 25° et l'on mesure leur taille en fin d'expérience. Les lots de têtards ayant incomplètement absorbé les produits offerts sont éliminés. Les essais ont été en général poursuivis sur quatre doses différentes de chaque protéine et se sont montrés reproductibles.

L'action antigoitrogène de la thyroxine a été démontrée par DEMPSEY ET ASTWOOD²⁴ et mise à profit par REINEKE, MIXNER ET TURNER²⁵ pour établir un test biologique précis d'activité sur lequel il a été possible de baser le dosage de celle-ci. Nous inspirant de leurs travaux et de ceux de FRIEDEN ET WINZLER²⁶, nous avons mis en œuvre comme agent goitrogène le 6.N-propylthiouracile. La dose quotidienne minima de ce produit faisant disparaître l'iode du corps thyroïde et provoquant une hypertrophie importante de cet organe en dix jours a tout d'abord été déterminée. On trouvera dans le Tableau II

les résultats d'expériences que nous avons poursuivies dans ce but sur des rats mâles d'un même élevage, pesant de 60 à 80 grammes, placés dans une pièce climatisée à 22° et ingérant la substance goitrogène mélangée à leur régime alimentaire (ratigène fourni par *Alimentation équilibrée*, Commentry).

Ces résultats ont permis de choisir l'administration quotidienne pendant 10 jours de 2 mg de 6.N-propylthiouracile comme la condition la plus favorable à la constitution d'un goitre important sans risquer d'intoxication due à l'excès de la substance active*. Les animaux ainsi traités ont en outre reçu pendant 10 jours des doses croissantes des produits dont nous cherchions à définir l'activité ou des substances de référence: DL-thyroxine, thyroglobuline pure ou brute (extrait thyroïdien). On a déterminé le poids frais de leur corps thyroïde en fin d'expérience et celui d'animaux normaux mis au régime de base dans les mêmes conditions. Chaque dose a été administrée à trois ou six rats et la comparaison des poids des organes provenant d'animaux traités a été faite avec le poids moyen du corps thyroïde de douze témoins n'ayant reçu que l'agent goitrogène pendant 10 jours et avec celui de douze animaux normaux ingérant le régime de base pur. La différence Δ entre le gain de poids par 100 g de poids corporel de la glande des rats recevant l'agent goitrogène seul ou en présence d'un produit iodé (par rapport aux rats normaux) a été calculée. Ce mode opératoire nous a donné des résultats très satisfaisants, à condition d'employer des lots homogènes d'animaux et de maintenir constante à 22° la température des locaux où sont placés ceux-ci. Il y a lieu, néanmoins, de ne considérer comme rigoureuses les comparaisons qu'il permet de faire, que si elles sont opérées avec des séries témoins établies pour chaque essai. L'action antigoitrogène, mise en œuvre selon la technique dont la justification vient d'être présentée, nous a permis d'étudier l'efficacité comparée de produits administrés par voie digestive ou intrapéritonéale et celle de leurs hydrolysats trypsiques, alors que les dosages biologiques basés sur la métamorphose des Batraciens ne sont faciles à réaliser avec des têtards de petite taille que par administration orale de la substance⁵ à étudier.

Celle-ci a été soit ingérée, soit injectée par voie intrapéritonéale. Dans le premier cas, elle a été mélangée à une certaine quantité de régime dont on a contrôlé l'utilisation quantitative par les animaux. Dans le second, elle a été mise en solution à $p_H = 7.5-7.8$ et injectée sous un volume ne dépassant pas 2 ml. Les hydrolysats enzymatiques d'iodocaséines ont été préparés par action de la trypsine à $p_H = 7.8$ et à 37° pendant 12 heures environ, près de 40% de l'azote total de ces produits étant alors libéré à l'état aminé, comme nous avons pu nous assurer par le dosage de N aminé par la méthode de VAN SLYKE**.

B. Résultats expérimentaux

Notre étude a porté sur quinze cents têtards et cinq cent vingt rats et ses résultats ne sauraient être présentés que sous forme abrégée. Les essais sur Batracien seront très brièvement résumés, car ils ont surtout servi à orienter ceux basés sur l'action anti-goitrogène des dérivés iodés chez le Rat. Les uns et les autres ne sont comparables avec précision que s'ils ont été poursuivis avec un même lot homogène d'animaux et à peu près simultanément; tel est toujours le cas pour ceux que nous avons réunis dans une

* La teneur en iodé du corps thyroïde des animaux ayant reçu pendant 10 jours une dose quotidienne de 2 mg de 6.N-propylthiouracile tend à redevenir normale après 6 à 8 jours de régime non additionné d'agent goitrogène. C'est pourquoi nous avons administré simultanément celui-ci et ses antagonistes.

** L'incubation à 37° dans les mêmes conditions, mais en l'absence de trypsine, ne modifie pas l'activité des iodocaséines; l'augmentation de celle-ci décrite plus bas après hydrolyse trypsique des produits B est donc bien due à la protéolyse.

même figure. En ce qui concerne les essais sur le Rat, un lot d'animaux témoins a été adjoint à chaque série d'expériences, car la réponse du corps thyroïde au 6.N-propyl-thiouracile et aux produits iodés présente des différences non négligeables d'une saison à l'autre. Par exemple, l'ingestion quotidienne de 2 mg du premier pendant 10 jours a provoqué chez nos animaux une hypertrophie thyroïdienne par 100 g de poids corporel plus forte (de 14.2 à 62.0 mg en moyenne) en octobre qu'en mai (de 17.5 à 57.0 mg en moyenne). De plus, le pouvoir antigoitrogène des iodoprotéines naturelles ou artificielles s'est montré sensiblement plus élevé au printemps qu'à l'automne. Ces faits expliquent

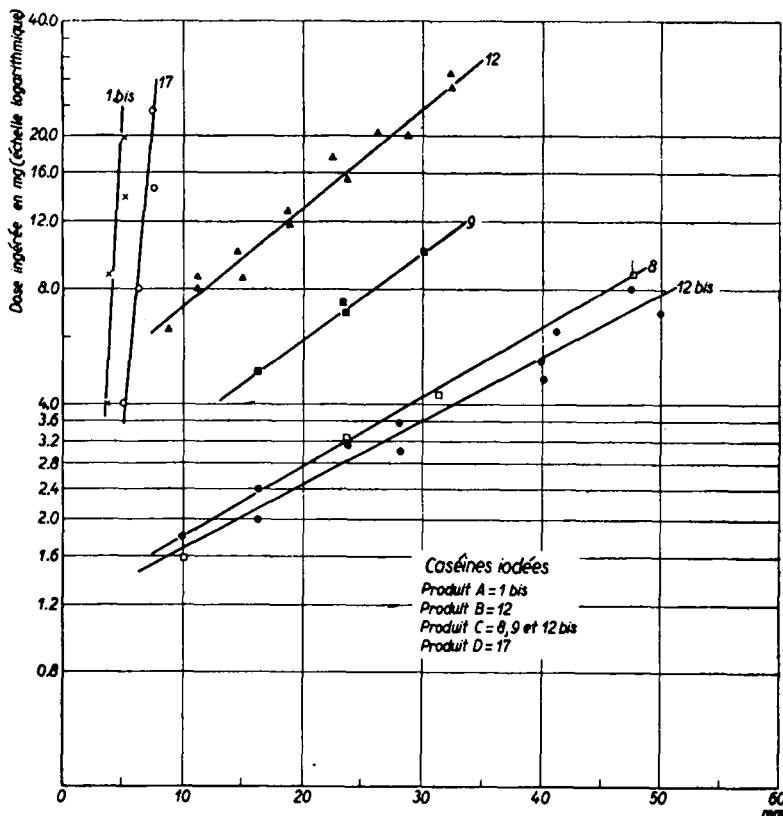


Fig. 1. Activité de caséines iodées préparées par des techniques diverses (voir Tableau I) sur la métamorphose du têtard de *Bufo bufo*. Abscisses: diminution de la longueur totale en millimètres (lot de 5 animaux). Ordonnées: logarithme de la dose d'iodoprotéine administrée, exprimée en milligrammes ingérés par lot de 5 têtards

pourquoi les courbes traduisant l'activité des produits étudiés présentent des différences d'une figure à l'autre pour un même corps. Ces différences sont parfois notables dans les valeurs des témoins (Fig. 9); néanmoins, elles sont sans conséquence sur l'exactitude comparée des résultats déterminés sur un seul lot d'animaux.

Les Figs 1, 2 et 3 ont été établies à partir d'exemples choisis parmi ceux illustrant les résultats des quatre-vingts expériences poursuivies. Leur mode de présentation, traduisant le raccourcissement corporel en fonction du logarithme de la dose de produit administrée, objective l'efficacité de celui-ci et la régularité de son action.

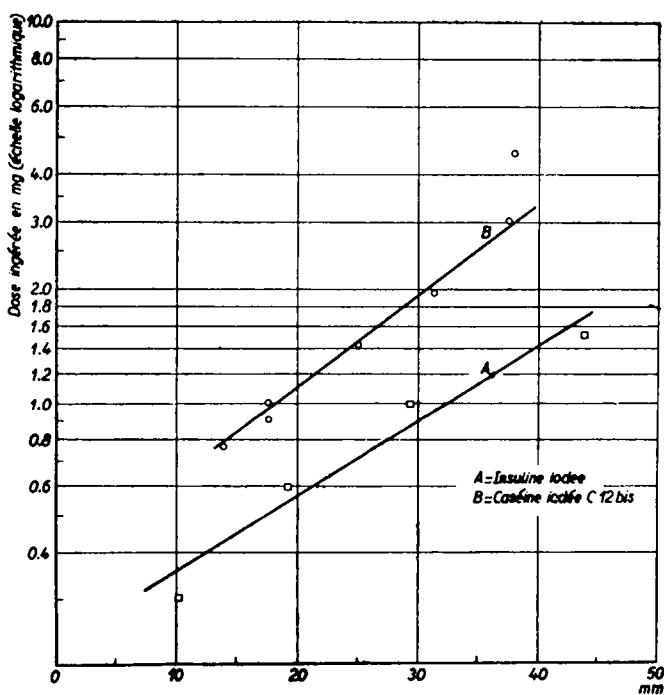
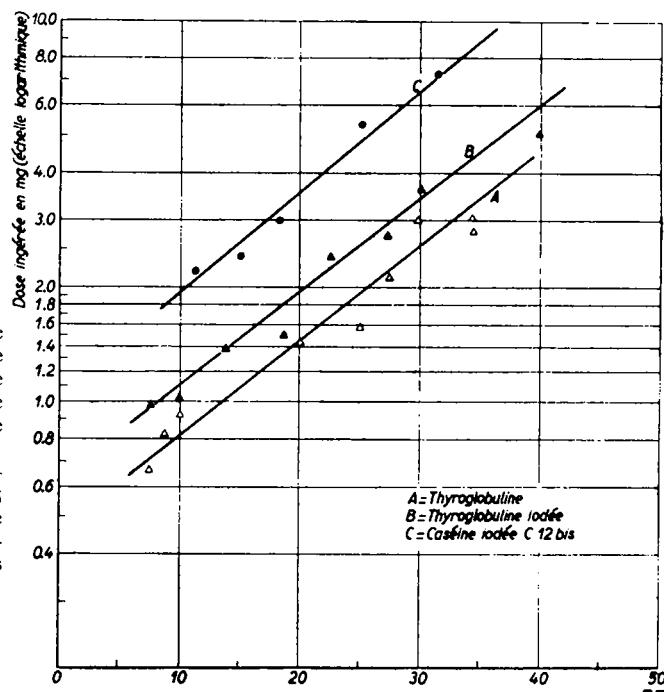


Fig. 3. Activité de l'insuline iodée (A) et d'une caséine iodée choisie comme produit de référence (B) sur la métamorphose du têtard de *Bufo bufo*

Abscisses: diminution de la longueur totale en millimètres (lot de 5 animaux). Ordonnées: logarithme de la dose d'iodoprotéine administrée, exprimée en milligrammes ingérés par lot de 5 têtards

L'examen de la Fig. 1 fait ressortir l'inégalité d'action des iodocaséines selon leur mode de préparation. Les produits A (ioduration en milieu ammoniacal) et D (ioduration rapide en milieu bicarbonaté par I en solution) n'accélèrent pratiquement pas la métamorphose du têtard de *Bufo bufo*, bien que renfermant de la thyroxine. Par ailleurs, le produit B (ioduration par le premier temps de la méthode de REINEKE et collaborateurs) est, à égalité de teneur en celle-ci, beaucoup moins actif que les produits C, et dans le cadre de ceux-ci l'efficacité des préparations 8, 9 et 12 bis, étudiées s'ordonne selon leur richesse en thyroxine. La Fig. 2 illustre les résultats obtenus avec la thyroglobuline

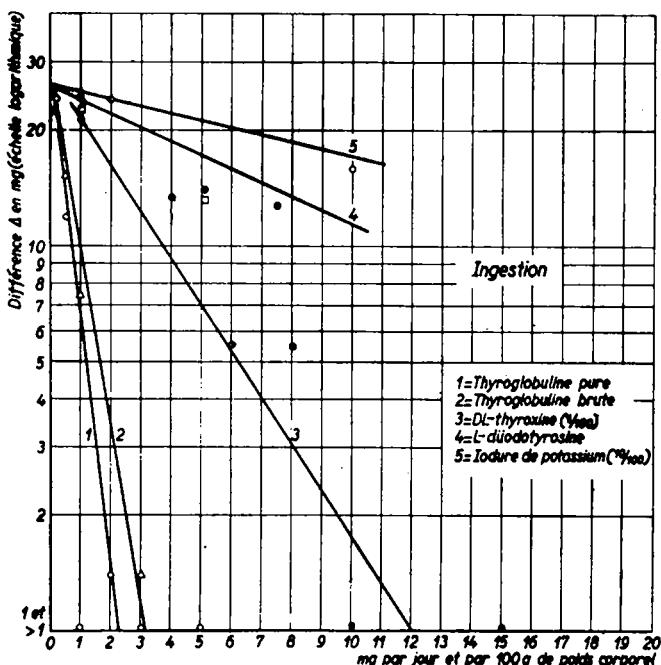


Fig. 4. Activité antigoitrogène (6-N-propylthiouracile) de thyroglobuline brute et pure (Porc) de L-diiodotyrosine, de DL-thyroxine et d'iode de potassium. Abscisses: mg par jour et par 100 g de poids corporel ingérés (protéines administrées en substances, L-diiodotyrosine pure, DL-thyroxine diluée à 1% dans la caséine et iode de potassium dilué à 10% dans cette dernière). Ordonnées: Δ, différence (mg) du gain de poids du corps thyroïde, en 10 jours d'expérience, chez les témoins goitreux et chez les animaux traités* (échelle logarithmique)

naturelle et avec son produit d'ioduration et permet de les comparer avec ceux donnés par l'étude d'une caséine choisie comme produit de référence. La caséine iodée C 12 bis a été retenue en cette qualité, comme étant la plus active de celles que nous ayons préparées sur une large échelle.

Plusieurs faits sont objectivés par cette figure. D'une part la thyroglobuline est, à poids égal, plus active que la caséine iodée C 12 bis, bien qu'environ six fois moins riche en thyroxine. D'autre part l'enrichissement de la thyroglobuline en celle-ci par ioduration n'augmente pas son activité; il paraît au contraire la diminuer. Enfin, la Fig. 3 établit que l'insuline iodée est, à égalité de teneur en thyroxine, à peu près deux fois plus active sur la métamorphose du têtard de *Bufo bufo* que la caséine iodée C 12 bis.

* Gain de poids de l'organe p 100 g de poids corporel, calculé à partir de données de référence établies sur des animaux témoins normaux de même poids corporel.

Fig. 5. Activité antigoitrogène (6.N-propylthiouracile) de caséines iodées par diverses techniques

Abscisses: mg par jour et par 100 g de poids corporel ingérés. Ordonnées: A , différence (mg) du gain de poids du corps thyroïde, en 10 jours d'expérience, chez témoins goitreux et chez les animaux traités (échelle logarithmique)

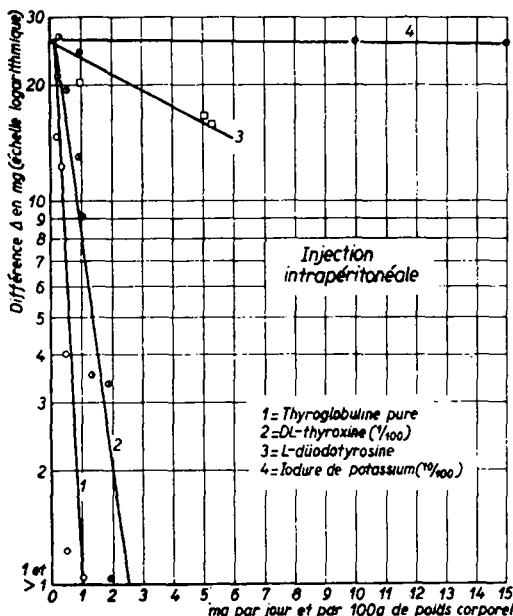
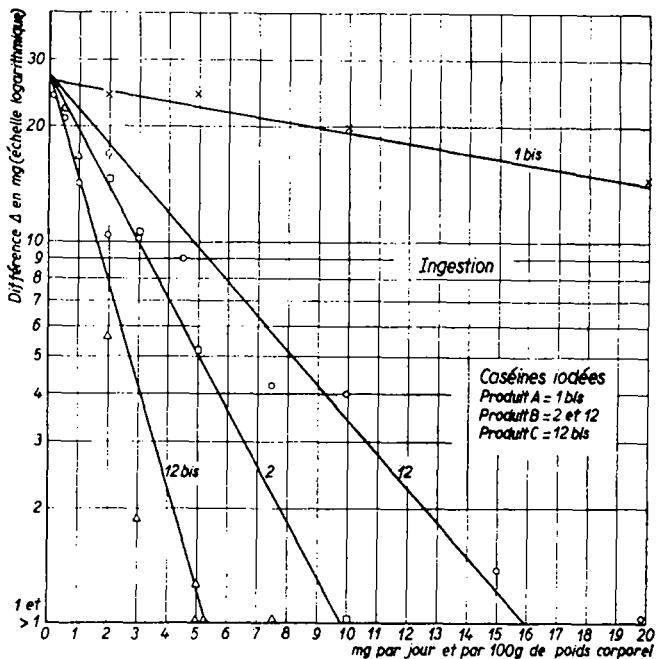


Fig. 6. Activité antigoitrogène (6.N-propylthiouracile) de la thyroglobuline pure (Porc); de la DL-thyroxine, de la L-diiodotyrosine et de l'iodure de potassium administrés par injection intrapéritonéale. Abscisses: mg par jour et par 100 g de poids corporel ingérés (thyroglobuline administrée en substance, L-diiodotyrosine pure, DL-thyroxine diluée à 1% dans la caséine et iodure de potassium dilué à 10% dans cette dernière. Ordonnées: A , différence (mg) du gain de poids du corps thyroïde en 10 jours d'expérience chez les témoins goitreux et chez les animaux traités (échelle logarithmique)

Les Figs 4, 5, 6, 7, 8 et 9 rapportent un ensemble de résultats obtenus dans l'étude de l'action antigoitrogène (6.N-propylthiouracile) d'iodoprotéines et de dérivés iodés divers administrés par voie buccale ou parentérale, certaines iodoprotéines ayant subi au préalable une hydrolyse partielle sous l'action de la trypsine. Un mode de présentation uniforme a été adopté dans ces figures. La réduction du gain de poids du corps thyroïde

par rapport à la glande des témoins goitreux a servi de test de l'efficacité des produits iodés. Il convenait de la rapporter objectivement à la quantité de ceux-ci administrés dans les conditions précisées plus haut. Après divers essais, nous avons choisi comme système de coordonnées, en abscisses le nombre de milligrammes de produit iodé administré par jour et par 100 grammes de poids corporel et, en ordonnées, la différence Δ , du gain de poids du corps thyroïde après 10 jours d'expérience chez les témoins goitreux recevant uniquement du 6.N-propylthiouracile, et chez les animaux traités en outre par des produits iodés le poids de l'organe étant dans tous les cas rapporté à 100 g de poids corporel. Δ a été exprimé en milligrammes et reporté sur une échelle logarithmique. Le gain du poids de l'organe a été calculé par la différence: poids moyen du corps thyroïde des animaux normaux témoins — poids moyen de l'organe des animaux recevant à la dose indiquée soit l'antigoitrogène seul, soit celui-ci et un produit iodé. Les Figs 4 et 5 résument les données obtenues lors de l'ingestion d'iodoprotéines et de produits de référence divers. Les thyroglobulines, l'iodoinsuline et les iodocaséines ont été administrées à des doses ne dépassant pas 20 mg par jour et par 100 g de poids corporel, la diiodotyrosine à celle de 1 à 10 mg. La DL-thyroxine* a été ingérée à l'état de dilution au centième dans de la caséine et l'iode de potassium mélangé à 90% de cette protéine. Il en découle que les abscisses des Figs 4 et 5 correspondent à l'ingestion quotidienne de mg de produits, les uns purs (thyroglobulines, iodocaséines, diiodotyrosine), les autres (thyroxine, iode de potassium), dilués dans un excipient inactif.

Les faits observés dans cette première série d'essais corroborent ceux que l'étude des mêmes produits sur la métamorphose du têtard de *Bufo bufo* avait établis. L'action antigoitrogène de la caséine 1 bis (produit A, iodé en milieu ammoniacal) est presque nulle, celle de la caséine 12 bis (produit C, iodé par la méthode de REINEKE et collaborateurs) étant plus élevée que celle des préparations 2 et 12, halogénées par application du premier temps (chauffage de 2 heures à 37°) de la même méthode. La thyroglobuline est, à égalité de poids, plus active que la caséine C 12 bis, puisque 2 à 3 mg par jour de la première empêchent le développement du goitre expérimental en 10 jours, alors que 5 à 6 mg de la seconde, pourtant six fois plus riche en thyroxine, sont nécessaires pour atteindre le même résultat. L'iode de potassium et la diiodotyrosine sont à peu près inefficaces. Quant à l'action de la DL-thyroxine ingérée, elle présente des irrégularités depuis longtemps connues, mais est néanmoins plus faible, pour cet acide aminé libre que pour le même poids de ce corps compris dans la thyroglobuline. En effet, 12 mg d'une dilution au centième de thyroxine dans la caséine, soit 0.12 mg de l'hormone (DL) font disparaître en 10 jours le goitre expérimental, alors que 0.004 à 0.006 mg de celle-ci (soit 2 à 3 mg de thyroglobuline) conduisent au même résultat. La signification de ce fait sera discutée plus bas.

Les Figs 6, 7 et 8 résument les résultats obtenus lors de l'injection intrapéritonéale des mêmes produits dissous en milieu neutre ou très faiblement alcalin ($p_H = 7, 6-7, 8$) et d'iodoinsuline.

L'iode injecté à l'état d'iode est inactif, la diiodotyrosine très peu active; les iodocaséines le sont à des degrés divers, la thyroglobuline et l'iodoinsuline intensément, comme en témoigne l'examen de la Fig. 6. La thyroglobuline est beaucoup plus efficace que la thyroxine, puisque 2.5 mg d'une dilution à 1% de l'hormone (DL), soit 0.025 mg, ont la même action antigoitrogène que 1 à 2 mg de la protéine, c'est-à-dire à 0.004 mg

* Nous remercions la maison HOFFMANN-LA ROCHE (Bâle) d'avoir mis à notre disposition la thyroxine pure utilisée dans ces recherches.

de thyroxine au maximum. L'action de cette dernière est, comme il est depuis longtemps établi, beaucoup plus régulière par voie parentérale que par voie digestive.

Parmi les iodocaséines, les produits A (halogénéation en milieu ammoniacal) demeurent les moins actifs; les effets des produits B (halogénéation selon le premier temps de la méthode de REINEKE et ses collaborateurs) sont inégaux pour les caséines 2 et 12. Il est remarquable que l'injection de celle-ci soit équivalente à celle de la caséine C 12 préparée par la méthode de REINEKE et ses collaborateurs, alors que son ingestion est beaucoup moins efficace. Enfin, le pouvoir antigoitrogène de l'iodoinsuline est environ

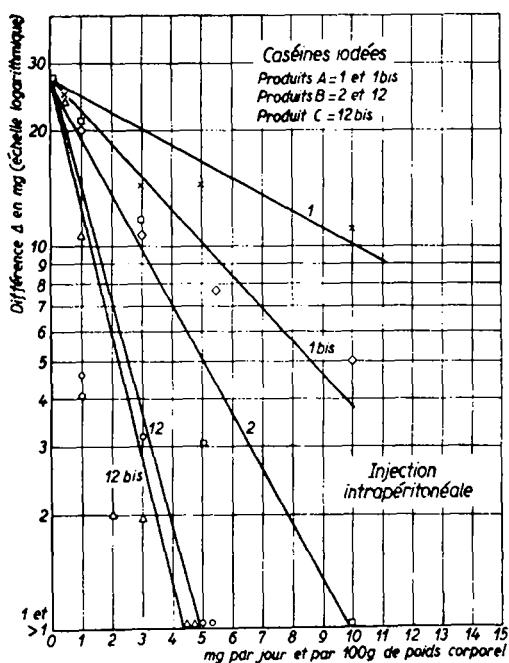


Fig. 7. Activité antigoitrogène (6.N-propylthiouracile) de caséines iodées par diverses techniques, administrées par injection intrapéritonéale. Abscisses: mg par jour et par 100 g de poids corporel injectés. Ordonnées: Δ , différence (mg) du gain de poids du corps thyroïde, en 10 jours d'expérience, chez les témoins goitreux et chez les animaux traités (échelle logarithmique)

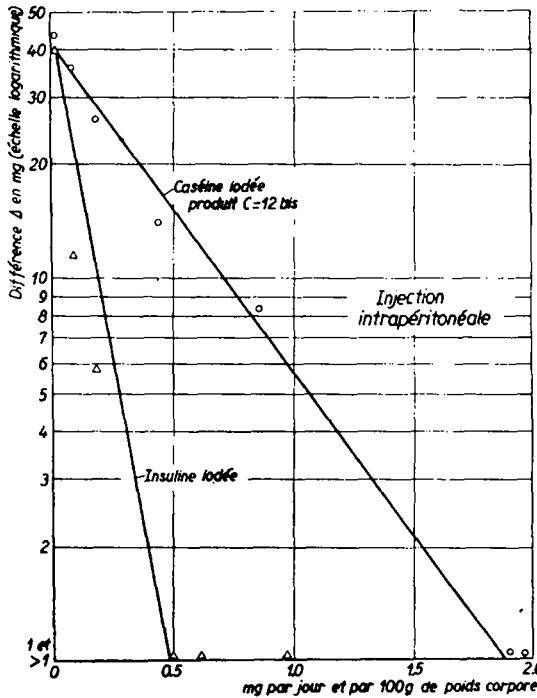


Fig. 8. Activité antigoitrogène (6.N-propylthiouracile) de l'insuline iodée et d'une caséine iodée (C 12 bis) prise comme produit de référence, administrées par injection intrapéritonéale. Abscisses: mg par jour et par 100 g de poids corporel injectés. Ordonnées: Δ , différence (mg) du gain de poids du corps thyroïde en 10 jours d'expérience, chez les témoins goitreux et chez les animaux traités (échelle logarithmique)

quatre fois plus forte que celui de l'iodocaséine C 12 bis, également riche en thyroxine; il est, à poids égal, supérieur à celui de la thyroglobuline. Néanmoins, cette dernière demeure nettement la plus active par unité de poids d'hormone, puisque 0.007 mg de thyroxine présente dans l'iodoinsuline équivalent au plus à 0.004 mg du même corps dans la thyroglobuline (valeurs approchées).

Ces observations ont orienté nos recherches vers le rôle de l'utilisation digestive des iodoprotéines comme facteur de leur efficacité; aussi y avait-il intérêt à étayer cette notion sur les résultats d'expériences plus précises, à partir desquels a été établie la

Fig. 9. Un premier essai a été poursuivi sur l'action de la même préparation de thyroglobuline pure administrée par ingestion et par injection intrapéritonéale. Par ailleurs, comme les caséines B 12 et C 12 bis, inégalement actives par voie buccale, présentent une activité voisine par voie parentérale, une expérience devait être entreprise pour démontrer que leur comportement dans le premier cas est dû à leur utilisation digestive incomplète. Nous l'avons réalisée en soumettant ces deux caséines à une hydrolyse trypsique *in vitro* avant de la faire ingérer avec le 6.N-propylthiouracile. On trouvera rassemblées dans la Fig. 9 les courbes traduisant l'activité de la thyroglobuline ingérée

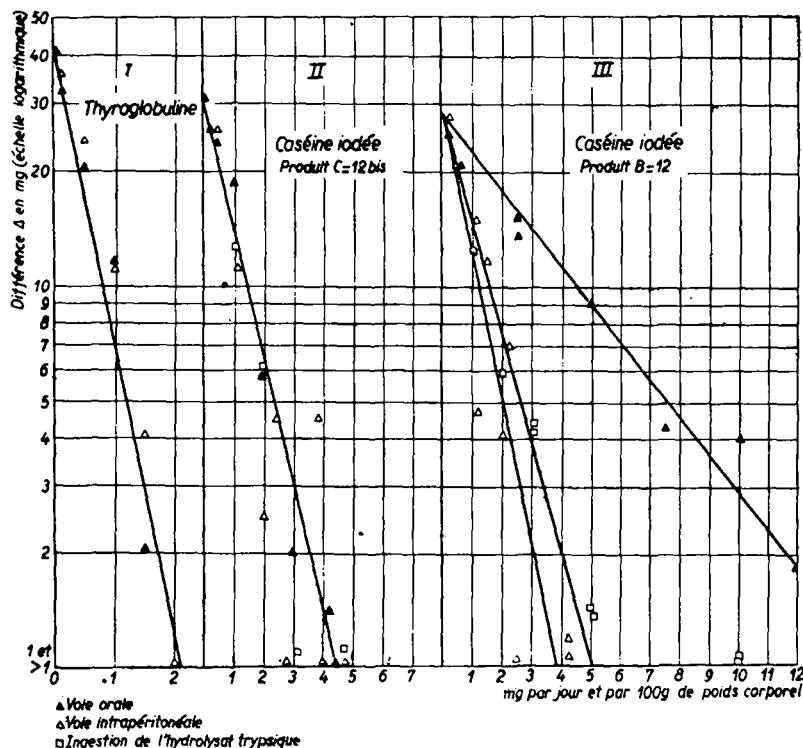


Fig. 9. Activité antigoitrogène (6.N-propylthiouracile): I, de la thyroglobuline de Porc administrée par voie orale et par injection intrapéritonéale; II, de la caséine C 12 bis ingérée sans traitement préalable ou après digestion trypsique et injectée; III, de la caséine B 12 ingérée sans traitement préalable ou après digestion trypsique et injectée. Abscisses: mg par jour et par 100 g de poids corporel injectés. Ordonnées: A, différence (mg) du gain de poids du corps thyroïde chez les témoins goitreux et chez les témoins traités (échelle logarithmique)

ou injectée et celle des caséines B 12 et C 12 bis ingérées avant ou après hydrolyse trypsique et injectées.

Ces essais, poursuivis dans des conditions particulièrement précises, puisqu'ils ont comporté l'administration de nombreuses doses de produits actifs dans une marge de quantité assez étroite, ont donné des résultats significatifs. D'une part, ils ont montré que la thyroglobuline est aussi bien utilisée par voie orale que par voie parentérale chez le Rat. D'autre part, la caséine C 12 bis, identiquement efficace par injection ou par ingestion et qu'elle soit ou non hydrolysée au préalable par la trypsine, présente une activité que son assimilation digestive ne paraît pas limiter. Il n'en est pas de même

de celle de la caséine B 12, puisque ce produit, relativement peu efficace par voie buccale s'il n'a subi aucune digestion trypsinique, le devient beaucoup plus après celle-ci; il est alors presque aussi actif qu'injecté par voie intrapéritonéale. La résorption commande donc, dans une certaine mesure, le pouvoir antigoitrogène des iodoprotéines.

III. DISCUSSION

Le commentaire des figures ci-dessus a rendu compte des faits observés, dont il convient maintenant de dégager la signification. Celle-ci peut-être discutée sur les plans biochimique et physiologique, après avoir défini dans quelle mesure les résultats obtenus dans l'étude des deux propriétés biologiques mises en œuvre peuvent être coordonnés.

L'action des produits iodés les plus divers sur la métamorphose des Batraciens ne permet d'attribuer au test basé sur ce phénomène qu'un intérêt limité. Des discordances entre les résultats obtenus dans son étude et dans celle des échanges gazeux d'animaux recevant les mêmes produits ont été fréquemment signalées; aussi n'est-il pas surprenant qu'il en existe entre eux et ceux de l'action antigoitrogène sur le plan quantitatif. Par exemple, la thyroglobuline est à poids égal environ deux fois plus active sur la métamorphose du têtard que la caséine C 12 bis, alors qu'elle l'est sensiblement plus sur le poids du corps thyroïde des rats. De même, l'iodoinsuline est deux fois plus active que la caséine C 12 bis dans le premier test, quatre fois plus dans le second. Il en est sans doute ainsi parce que d'autres produits iodés que la thyroxine présents dans les protéines halogénées exercent une action indirecte sur la métamorphose, en tant que source d'iode pour la synthèse de thyroxine réalisée par le têtard. Il demeure par ailleurs possible que les Amphibiens soient doués d'une susceptibilité particulière à certains dérivés thyroxiniens résultant de l'hydrolyse des iodoprotéines²⁷. En outre, la détermination de la dose quotidienne de produit actif empêchant totalement la formation du goitre, objectivée par la présentation des résultats que nous avons adoptée, permet une mesure quantitative de l'activité des corps étudiés. Celle-ci comporte une marge d'imprécision due au fait que la réponse des animaux et le comportement des témoins varie sensiblement d'une série à l'autre d'essais, mais les comparaisons que l'on peut opérer dans le cadre de chacune de celles-ci sont significatives. Pour ces diverses raisons, nous avons attribué aux données établies sur la métamorphose du têtard de *Bufo bufo* un caractère d'orientation, et nous avons surtout retenu pour la discussion de ce travail les résultats exprimant l'action antigoitrogène des corps étudiés.

La mesure la plus précise que l'on puisse donner de celle-ci est de la rapporter à la dose quotidienne (mg p. 100 g de poids corporel) minima inhibant l'action goitrogène 2 mg de 6-N-propylthiouracile ingérés quotidiennement pendant 10 jours. La quantité ainsi déterminée n'est pas rigoureusement constante d'une expérience à l'autre, mais son ordre de grandeur le demeure, en sorte que l'on peut baser sur elle une approximation satisfaisante. On trouvera dans le Tableau III un ensemble de données significatives à ce sujet, établies en admettant avec PITT RIVERS ET LERMANN²⁸, que la L-thyroxine est 10 fois plus active que l'isomère D, du même corps.

La discussion des résultats peut être abordée à partir des faits que traduit l'examen des Tableaux I et III et des Figs 1 à 9.

a. Teneur en thyroxine et activité biologique des protéines artificiellement iodées. On ne saurait mettre en doute le fait que la méthode de préparation des iodoprotéines commande leur efficacité physiologique, mais le déterminisme des faits observés doit être

TABLEAU III
ACTIVITÉ ANTIGOITROGÈNE RELATIVE DE DIVERS PRODUITS RAPPORTÉE A CELLE DE LA
L-THYROXINE (MOYENNES)

Produit et voie d'administration	Quantité minima antigoitrogène (mg/j/100 g) (A)	Quantité de L-thyroxine présente dans (A) (B)	Activité de (B) rapportée à la quantité minima de L-thyroxine douée du même pouvoir antigoitrogène (inject.) (C)
DL-thyroxine (orale)	0.12	—	0.18
(intrapéritonéale)	0.02	—*	1.00
Thyroglobuline (orale)	2.0	0.004	2.75
(intrapéritonéale)	2.0	0.004	2.75
Iodoinsuline (intrapéritonéale)	0.5	0.007	1.57
Caséine iodée B 12 (orale)	16.0	0.191	0.06
(intrapéritonéale)	4.0	0.049	0.22
Caséine iodée 12bis (orale)	4.0	0.043	0.25
(intrapéritonéale)	4.0	0.043	0.25

* Activité correspondant à 0.01 mg de L-thyroxine administrée avec le racémique et à 0.01 mg de dérivé D, soit à 0.001 mg de l'isomère-L. Valeur de (B) pour 0.02 mg de DL-thyroxine = 0.011 mg de dérivé L, choisie comme unité dans la colonne (C). Cette définition de la valeur de (B) pour la DL-thyroxine est imposée par le fait que l'activité du racémique est comparée dans la colonne (C) à celle de la thyroxine des iodoprotéines, qui est l'isomère L (REINEKE ET TURNER) dans le cas des produits obtenus par action de l'iode en milieu neutre.

précisé. Pour REINEKE, TURNER, KOHLER, HOOVER ET BEEZLEY⁸, il existe une concordance satisfaisante entre l'activité métabolique (augmentation des échanges respiratoires) des iodoprotéines et leur teneur en L-thyroxine, déterminée par voie biologique (augmentation des échanges respiratoires après injection intrapéritonéale de l'hormone ou par la méthode chimique qu'ils ont proposée). Nos résultats ne sont pas entièrement favorables à cette manière de voir, puisque certains produits riches en thyroxine sont d'une activité nulle ou minime et que, par ailleurs, leur digestibilité est très inégale.

L'efficacité d'une iodoprotéine injectée par voie intrapéritonéale est nécessairement liée à son hydrolyse, sans laquelle la thyroxine ou des peptides diffusibles de celle-ci ne peuvent entrer dans le sang et les humeurs. Or, nous avons constaté que diverses iodocaséines de même teneur en thyroxine, également actives après digestion trypsique, ne le sont pas quand on les ingère sans qu'elles aient subi cette opération (Fig. 9). Il est donc logique d'admettre que les protéases humorales ou cellulaires permettant aux tissus d'assimiler les iodoprotéines injectées se comportent vis-à-vis de celles-ci comme les enzymes du tractus digestif, en sorte que *l'activité d'une iodoprotéine est commandée non seulement par sa teneur en thyroxine, mais par la vitesse de libération enzymatique de l'hormone*. Ainsi, des produits riches en thyroxine, mais résistants à l'hydrolyse digestive, peuvent-ils être rejetés avant que l'acide aminé iodé ait été assimilé et, s'ils sont injectés, la libération de celui-ci ne s'opère qu'avec une lenteur telle que son action est répartie sur un temps trop long pour qu'elle apparaisse intense.

Il est possible que REINEKE et ses collaborateurs aient obtenu des produits dont l'activité réponde aux normes indiquées par eux, mais celles-ci traduisent l'utilisation intégrale de la thyroxine présente dans les iodoprotéines injectées et il est peu probable que ce fait doive être observé dans tous les cas, même dans les conditions les plus favorables. La méthode adoptée par REINEKE ET TURNER pour préparer des iodopro-

téines actives est à coup sûr la plus satisfaisante et le second des temps qu'elle comporte augmente très sensiblement l'activité des produits obtenus administrés par voie orale; mais il n'en est ainsi qu'en raison de l'augmentation de leur degré d'assimilation, non de leur enrichissement en thyroxine. L'étude de l'iodoinsuline préparée par la même méthode apporte un autre argument défavorable à l'opinion dont nous discutons le bien-fondé. A égalité de teneur en thyroxine, la caséine C 12 bis, halogénée selon la méthode des auteurs américains, est, en effet, environ huit fois moins active en injection intrapéritonéale*. Un facteur important autre que la teneur en thyroxine doit donc participer au déterminisme des effets physiologiques et pharmacologiques des iodoprotéines. La sensibilité de ces dérivés à l'hydrolyse enzymatique doit être mise en cause à la suite de nos essais. Elle explique que deux produits puissent être inégalement actifs, bien que renfermant une même quantité de thyroxine. L'étude de l'activité de la thyroxine et de la thyroglobuline a seule permis de discuter sous ses divers aspects le problème étudié.

b. *Activité relative et activité absolue des protéines iodées et de la thyroglobuline.* Rapporter l'activité biologique de la thyroxine à son unité de poids et la considérer comme une constante physiologique implique l'acceptation d'un postulat: à savoir que les effets de ce produit se manifestent avant qu'il ait été métabolisé. Or, ABELIN ET WEHREN²⁹ ont montré que son injection est suivie rapidement de sa fixation partielle dans le foie, fait confirmé par l'étude de la destinée de l'hormone marquée par de l'iode radioactif en position 3' et 5'³⁰. Un important travail d'ensemble sur la fixation en fonction du temps de la thyroxine marquée, poursuivi par GROSS ET LEBLOND³¹, a établi que chez le Rat, environ 50% de ce produit injecté (0.8 mg) par voie intraveineuse sont fixés et excrétés en deux heures par le foie et le tube digestif, le premier opérant alors la désioduration de 25% de l'hormone avec libération d'ions I⁻. Par ailleurs, HARRINGTON³², passant récemment en revue les résultats des recherches consacrées à l'action pharamodynamique de la thyroxine, en particulier sur des organes isolés, attache une grande importance au fait qu'elle n'est pas instantanée, mais comporte un temps perdu assez long pour que l'on doive se demander si l'hormone n'est pas au préalable métabolisée par un processus lent. Dès lors, il apparaît très difficile de définir l'activité *absolue* de la thyroxine et de lui rapporter celle d'une iodoprotéine.

Ces réserves devaient être formulées avant de discuter les résultats obtenus sur la thyroglobuline. Comme l'avaient observé sur le plan qualitatif divers auteurs^{16, 17, 18}, l'unité de poids de thyroxine présente dans cette protéine, également efficace quelle que soit sa voie d'administration (voir Fig. 9), est beaucoup plus active que l'acide aminé libre. Ce dernier, en partie détruit dans l'intestin quand il est ingéré, exerce alors une action antigoitrogène irrégulière (voir Fig. 4), tandis que son injection va de pair avec une diminution de poids du corps thyroïde hypertrophié assez constante pour une même dose, dans une même série d'essais. Une interprétation englobant ces divers faits peut être proposée. Puisque la thyroxine injectée est partiellement détruite, on peut admettre que sa dégradation s'opère régulièrement dans des conditions expérimentales identiques; de ce fait son activité biologique par unité de poids est peu variable, mais ne correspond en réalité qu'à celle d'une fraction du produit administré. Par ailleurs, l'injection de l'hormone provoque une augmentation très forte et très brutale de la thyroxinémie et,

* Les essais sur têtard de *Bufo bufo*, résumés sur la Fig. 2, montrent que l'ioduration de la thyroglobuline en diminue l'activité, bien que l'enrichissant en thyroxine. Nous nous bornons à signaler cette observation, n'ayant pas étudié le pouvoir antigoitrogène de la thyroglobuline iodée.

par là même, à la fois une saturation des récepteurs et un ensemble de "fuites" (fixation hépatique, élimination digestive et urinaire). Si, au contraire, la thyroxine ne pénètre dans les humeurs que lentement et à dose très faible dans l'unité de temps, son utilisation sera probablement meilleure et ses pertes par les émonctoires seront minimes. L'hydrolyse enzymatique de la thyroglobuline dans le tractus digestif ou dans la cavité péritonéale et dans le sang conduit à cette pénétration lente de l'hormone dans les humeurs, laquelle est probablement à l'origine des faits que nous discutons; *l'unité de poids de la thyroxine est sans doute plus efficace dans la thyroglobuline qu'à l'état libre parce qu'elle est plus complètement utilisée dans la première.*

L'étude du cas particulier de la thyroxine permet une interprétation générale de nos résultats, en ce sens que l'activité thyroxinienne d'une iodoprotéine naturelle ou artificiellement halogénée est, dans tous les cas, liée à deux facteurs principaux: sa teneur en thyroxine et la vitesse de pénétration de celle-ci dans les humeurs qui la véhiculent aux cellules. Alors que la thyroxine libre injectée à dose physiologiquement efficace est partiellement détruite ou éliminée, celle apportée par la thyroglobuline non dénaturée ou par l'iodoinsuline C que nous avons étudiée, est sans doute mieux utilisée, parce qu'elle pénètre dans les humeurs avec une vitesse permettant aux cellules de la fixer moins incomplètement. Les préparations de caséine iodée préparées en vue de ce travail renferment, par contre, de la thyroxine paraissant moins active que l'acide aminé libre, en raison de son faible coefficient d'utilisation. La valeur de celui-ci domine l'efficacité biologique des iodoprotéines et, par là même, leurs applications thérapeutiques ou zootechniques.

RÉSUMÉ

1. L'action de diverses iodoprotéines artificielles (iodocaséine, iodoinsuline, iodothyroglobuline) de la thyroglobuline naturelle et de la thyroxine sur la métamorphose du têtard de *Bufo bufo* et sur le goître expérimental du Rat au 6.N-propylthiouracile a été étudiée dans des conditions permettant de comparer les effets propres à ces divers produits.

2. Des iodocaséines préparées par diverses méthodes et de teneurs en thyroxine voisines présentent une activité biologique très inégale par unité de poids d'hormone lorsqu'elles sont ingérées; ces différences s'atténuent et peuvent même disparaître lorsque les mêmes protéines sont injectées ou soumises à l'action de la trypsine préalablement à leur ingestion. Il en découle que l'efficacité biologique de ces produits est liée non seulement à leur teneur en thyroxine, mais à l'assimilation de celle-ci. Des travaux antérieurs ont sans doute attribué à une augmentation de la première des phénomènes dus à une amélioration de la seconde.

3. L'iodoinsuline et la thyroglobuline naturelle présentent une activité biologique plus élevée que celle de l'acide aminé libre par unité de poids de thyroxine. La discussion des faits observés permet de conclure qu'il en est ainsi parce que l'hormone contenue dans ces protéines est plus complètement utilisée que la thyroxine libre, en raison de son passage progressif dans les humeurs au cours de la protéolyse.

SUMMARY

1. The action of various iodinated proteins (iodocasein, iodoinsulin, iodothyroglobulin), of natural thyroglobulin and of thyroxin on the metamorphosis of tadpoles of *Bufo bufo* and on experimental goitre in rats fed on a diet containing 6.N-propylthiouracil has been studied under strictly comparative conditions.

2. Iodocaseins prepared by various methods and containing nearly the same thyroxin percentage are of very different activities when administered by mouth; these differences are less marked and can even disappear when the same products are injected or when submitted to tryptic hydrolysis. The biological efficiency of the iodinated proteins, thus, depends not only on their thyroxin content, but also on the assimilation of the hormone. Previous researches have given results interpreted as showing differences in thyroxin content of iodoproteins when an increase of assimilation was obtained.

3. Iodoinsulin and natural thyroglobulin show, per unit weight of thyroxin, a biological activity greater than free thyroxin. The data obtained in this work lead to the conclusion that the hormone present in these proteins is better utilized than free thyroxin, owing to its progressive penetration in the body fluids during the proteolysis.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Wirksamkeit verschiedener künstlicher Jodproteine (Jodcasein, Jodinsulin, Jodthyroglobulin) und des Thyroxins auf die Metamorphose der Kaulquappe von *Bufo bufo* und auf den experimentellen Kropf der gleichzeitig mit der Nahrung 6.N-Propyl-thiouracil empfangenden Ratte wurde untersucht, unter Bedingungen welche einen Vergleich der Eigenwirkungen dieser verschiedenen Substanzen gestatten.

2. Auf verschiedene Art bereitete und in ihrem Thyroxingehalt ähnliche Jodcaseine zeigen eine sehr ungleichmässige biologische Wirksamkeit per Hormon-Gewichtseinheit wenn sie per Os verabfolgt werden; diese Unterschiede werden schwächer und können sogar verschwinden wenn die gleichen Proteine eingespritzt oder vor ihrer Verabsorgung der Trypsin-Einwirkung ausgesetzt werden. Daraus folgt, dass die biologische Wirksamkeit dieser Produkte nicht nur von ihrem Thyroxingehalt abhängt, sondern dazu noch von der Assimilierung des Hormons. Frühere Untersuchungen haben, zweifellos irrtümlich, Erscheinungen auf einen höheren Thyroxingehalt zurückgeführt, welche auf einer besseren Thyroxin-Assimilierung beruhten.

3. Jodinsulin und natürliches Thyroglobulin zeigen per Thyroxin-Gewichtseinheit eine höhere biologische Wirksamkeit als die freie Aminosäure selbst. Die Betrachtung der beobachteten Tatsachen gestattet den Schluss, dass das in diesen Proteinen enthaltene Hormon besser verwendet wird als freies Thyroxin, wegen seines allmählichen Eindringens in die Körperflüssigkeit im Verlauf der Proteolyse.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 On trouvera un exposé d'ensemble de ces travaux dans: E. P. REINEKE, *Vitamins and Hormones*, 4 (1946) 207 et J. ROCHE ET R. MICHEL, *Exp. ann. biochim. méd.*, 8 (1948) 127.
- 2 P. VON MUTZENBECHER, *Z. physiol. Chem.*, 261 (1939) 253.
- 3 E. P. REINEKE, M. B. WILLIAMSON ET C. W. TURNER, *J. Biol. Chem.*, 143 (1942) 285; 147 (1943) 115.
- 4 S. BLAIZOT, J. BLAIZOT, L. DONTCHEFF, R. JACQUOT ET H. TUCHMANN-DUPLESSIS, *Arch. sci. physiol.*, 1 (1947) 181.
- 5 R. PITT RIVERS ET S. S. RANDALL, *J. Endocrinol.*, 4 (1945) 221.
- 6 LUDWIG ET P. VON MUTZENBECHER, *Z. physiol. Chem.*, 258 (1939) 195.
- 7 E. P. REINEKE ET C. W. TURNER, *J. Biol. Chem.*, 149 (1943) 555; 149 (1943) 363.
- 8 E. P. REINEKE, C. W. TURNER, G. O. KOHLER, R. D. HOOVER, ET M. B. BEEZLEY, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 599.
- 9 J. P. LELAND ET G. L. FOSTER, *J. Biol. Chem.*, 95 (1932) 165.
- 10 R. DEANESLY ET A. S. PARKES, *J. Endocrinol.*, 4 (1945) 355.
- 11 J. ROCHE ET R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 335.
- 12 J. ROCHE, R. MICHEL, M. LAFON ET D. P. SADHU, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 648.
- 13 E. P. REINEKE ET C. W. TURNER, *J. Dairy Sci.*, 27 (1944) 642.
- 14 I. ABELIN, *Arch. expkl. Path. Pharmacol.*, 176 (1934) 151.
- 15 W. BRANDT, H. MATTIS ET E. NOLTE, *Biochem. Z.*, 243 (1931) 369.
- 16 B. O. BARNES, *Am. J. Physiol.*, 108 (1932) 583.
- 17 J. LERMAN ET W. T. SALTER, *Endocrinology*, 18 (1934) 317; *J. Clin. Invest.*, 16 (1937) 678 et 18 (1939) 493.
- 18 J. H. MEANS, J. LERMAN ET W. T. SALTER, *J. Clin. Invest.*, 12 (1933) 683.
- 19 J. ROCHE, R. MICHEL ET M. LAFON, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 453.
- 20 K. LINDESTRØM-LANG, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg*, 17 (1929) No. 9, 115.
- 21 Y. DERRIEN, R. MICHEL ET J. ROCHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 454.
- 22 T. LEIPERT, *Mikrochemie* (Pregl's' Festschrift) (1926) 266.
- 23 R. DEANESLY, J. EMMETT ET A. S. PARKES, *J. Endocrinol.*, 4 (1945) 312.
- 24 E. W. DEMPSEY ET E. B. ASTWOOD, *Endocrinology*, 32 (1943) 599.
- 25 E. P. REINEKE, J. P. MIXNER ET C. W. TURNER, *Endocrinology*, 36 (1944) 64.
- 26 E. FRIEDEN ET R. S. WINZLER, *Endocrinology*, 43 (1948) 40.
- 27 E. FRIEDEN ET R. S. WINZLER, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 155.
- 28 R. PITT RIVERS ET J. LERMAN, *J. Endocrinology*, 5 (1948) 223.
- 29 I. ABELIN ET E. WEHREN, *Arch. internat. Pharmacodynamie*, 64 (1940) 156.
- 30 F. JOLIOT, R. COURRIER, A. HOREAU ET P. SÜE, *Compt. rend. soc. biol.*, 138 (1944) 325.
- 31 J. GROSS ET C. P. LEBLOND, *J. Biol. Chem.*, 171 (1947) 309.
- 32 C. R. HARINGTON, *Proc. Roy. Soc. London*, B, 132 (1944) 223 et *J. Chem. Soc.* (1944) 193.

Reçu le 5 février 1949