

SUR LA TRIIODOTHYRONINE ET SA FORMATION PAR IODURATION
DE LA DIIODOTHYRONINE

par

JEAN ROCHE, SERGE LISSITZKY ET RAYMOND MICHEL

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

La thyroxine (3:5:3':5'-tétraiodothyronine) a été considérée jusqu'à ces derniers mois comme le seul dérivé de la thyronine présent dans le corps thyroïde, avant que GROSS ET PITT-RIVERS n'y aient identifié simultanément à nous la 3:5:3'-triiodothyronine¹. Le but de ce mémoire est d'exposer plus longuement que nous ne l'avons fait dans une note préliminaire nos recherches sur la formation de cet acide aminé en tant que produit intermédiaire de l'ioduration de la 3:5-diiodothyronine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Nous avons étudié successivement la formation de la 3:5:3'-triiodothyronine par halogénéation de la 3:5-diiodothyronine et l'évolution de cette réaction en présence de quantités croissantes d'iode.

Formation et isolement de la 3:5:3'-triiodothyronine

De la DL-3:5-diiodothyronine a été iodée à 20° en milieu ammoniacal par des quantités d'halogène marqué (¹²⁷I additionné de traces d'¹³¹I) comprises entre 1 et 20 atomes I par molécule d'acide aminé et analysé les produits de la réaction par radiochromatographie sur papier². Une série d'échantillons de DL-3:5-diiodothyronine pure (Hoffmann La Roche) (I% = 48.4) en solution 0.01 M dans l'ammoniaque concentrée a été traitée par l'iode marqué dissous dans l'éther³, aux doses de 0.5-1.0-2.0-2.5-3.0-4.0-5.0-6.0-8.0-10.0 et 20 atomes I par molécule d'acide aminé. Des chromatogrammes à une dimension des mélanges réactionnels ont été développés en prenant comme phase solvante du *n*-butanol saturé d'ammoniaque 2 N et révélés au moyen d'une solution de ninhydrine à 0.2% dans le *n*-butanol saturé d'eau contenant 5% d'acide acétique. La diiodothyronine et la thyroxine se séparent dans ces conditions en deux taches distinctes de $R_F = 0.69-0.70$ pour la première et 0.53-0.55 pour la seconde. Ces deux acides aminés sont présents à la fois sur les chromatogrammes de référence et sur ceux des mélanges réactionnels dans lesquels la diiodothyronine a été traitée par moins de 6 à 8 atomes I; la thyroxine est seule présente quand la quantité d'iode mise en oeuvre est plus grande. Or, la mesure de la radioactivité des chromatogrammes montre que la tache de $R_F = 0.69-0.70$ renfermant la diiodothyronine est radioactive. Comme l'évolution de réactions d'échange est peu probable, on devait envisager la formation d'un produit intermédiaire de l'halogénéation, de R_F identique ou très voisin de la diiodothyronine dans les conditions adoptées. Ce corps a été par la suite identifié à la 3:5:3'-

triiodothyronine en substituant l'isopentanol saturé d'ammoniaque 6 *N* au *n*-butanol ammoniacal comme phase solvante dans la préparation des chromatogrammes. Le R_f du nouvel acide aminé est alors de 0.27, tandis que ceux de la diiodothyronine et de la thyroxine sont respectivement de 0.38 et de 0.15.

Nous avons entrepris systématiquement l'étude de l'halogénéation de la DL-3:5-diiodothyronine par l'iode marqué en séparant les produits de cette réaction par chromatographie sur papier à l'aide de l'alcool isoamylique saturé d'ammoniaque 6 *N* comme phase solvante. L'établissement de radioautogrammes a permis de contrôler la position,

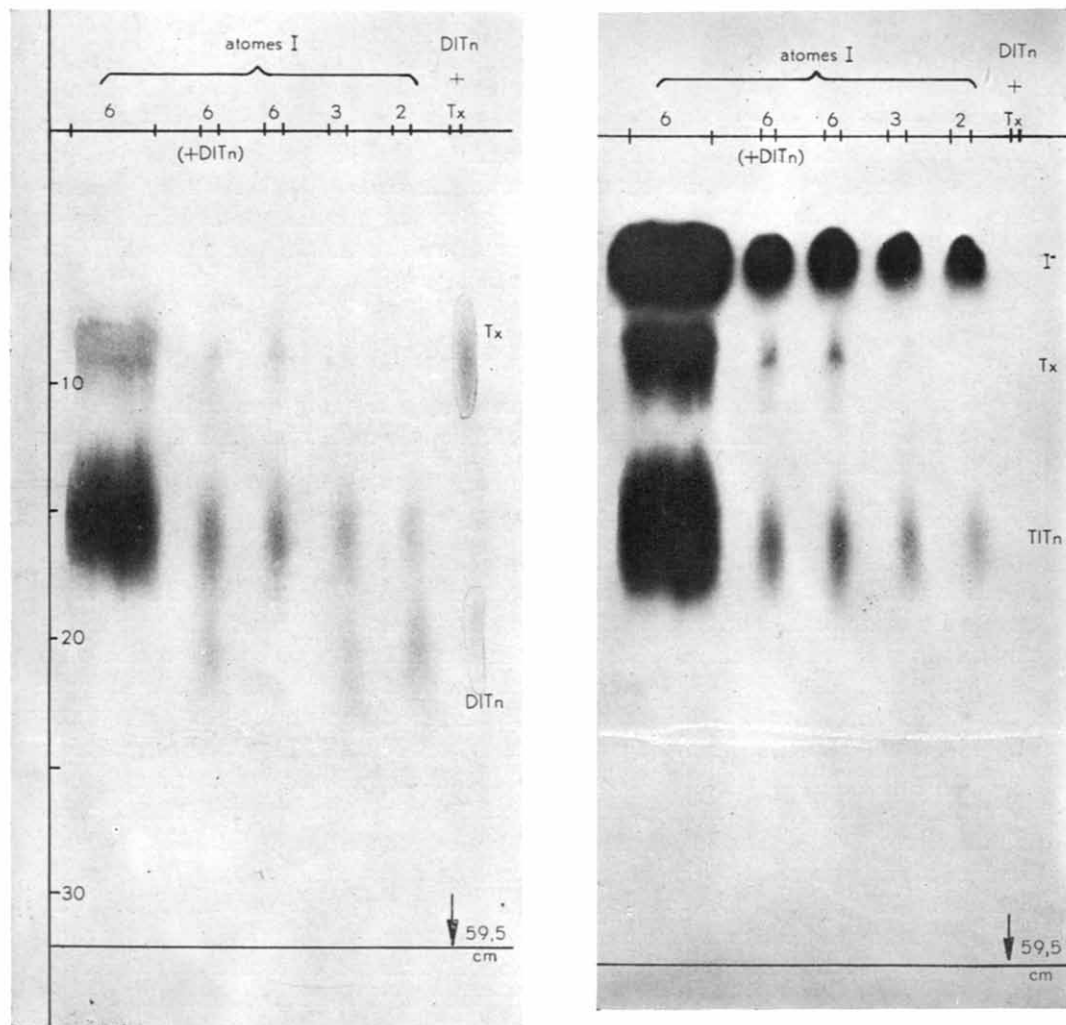


Fig. 1. *Partie gauche*: chromatogrammes (développement en isopentanol saturé d'ammoniaque 6 *N* et révélation à la ninhydrine) des produits de l'action de 2.0-3.0 et 6 atomes I sur une molécule de DL-3:5-diiodothyronine (à droite: corps purs de référence: diiodothyronine (DITn et thyroxine (Tx); à gauche: chromatographie sur un large front des produits de l'action de 6 atomes I sur une molécule de DITn. *Partie droite*: radioautogrammes du document formant la partie gauche de la figure (taches radioactives des iodures (I^-), de la triiodothyronine (TITn) et de la thyroxine (Tx).

des taches marquées et, par ailleurs, le dosage de la radioactivité des produits formés, a été opéré en mesurant au compteur de Geiger-Müller l'intensité du rayonnement émis par chacune de leurs taches. La Fig. 1, dans laquelle on trouvera les chromatogrammes et les radioautogrammes des produits formés par action de 2.0-4.0 et 6.0 atomes d'iode sur une molécule de DL-3:5-diiodothyronine, reproduit quelques uns des documents obtenus.

L'examen de cette figure montre qu'un corps radioactif de R_F 0.27 prend naissance aux dépens de la diiodothyronine ($R_F = 0.38$) lorsque la quantité d'iode mise en oeuvre est trop faible pour conduire à sa transformation totale en thyroxine ($R_F = 0.15$). La tache colorée de ce dérivé figurant sur les chromatogrammes, mais non sur les autogrammes, disparaît en effet progressivement des premiers, tandis que des taches d'un corps nouveau ($R_F = 0.27$) et de thyroxine ($R_F = 0.15$) s'y manifestent, en même temps que celle des iodures ($R_F = 0.10$, révélation à l'amidon selon²). Après action d'un excès d'halogène, la thyroxine n'est plus accompagnée que de ces derniers. Le produit de $R_F = 0.27$ a été isolé à l'état pur et identifié à la 3:5:3'-triiodothyronine au cours des essais suivants.

100.5 mg de DL-3:5-diiodothyronine pure (I% = 48.4) ont été traités par l'iode dans les conditions décrites plus haut (3.5 atomes I par molécule). Le milieu réactionnel a été fractionné par chromatographie sur papier sur un front de 50 cm en utilisant l'isopentanol saturé d'ammoniaque 6 N comme phase solvante. La bande de R_F 0.27 a été découpée et éluee par l'ammoniaque 2 N que l'on a ensuite évaporée sous vide. L'addition d'acide acétique dans le milieu y a provoqué la formation d'un précipité que l'on a recueilli, lavé trois fois à l'eau distillée et séché sur P_2O_5 . La solution de ce produit dans l'alcool renfermant 5% HCl additionné volume à volume d'eau distillée a laissé déposer à $+1^\circ$ en 24 heures des cristaux (aiguilles et mâcles biréfringentes) de P.F. (non corr.) = $210-212^\circ C$ et de composition élémentaire C% = 27.3, N% = 2.4, I% = 58.1 (composition théorique de la triiodothyronine C% 27.7, N% 2.15, I% 58.6)*.

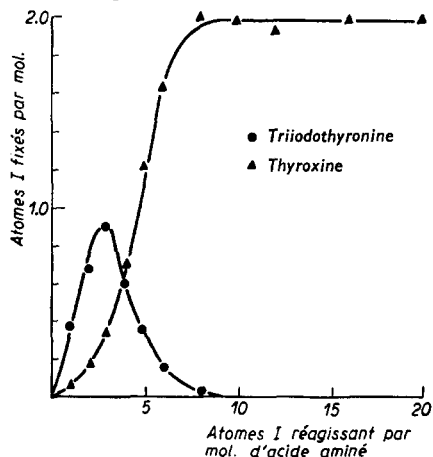


Fig. 2. Quantité d'iode fixée dans la thyroxine (Tx) et dans la triiodothyronine (TITn) en fonction du nombre d'atomes d'iode réagissant avec une molécule de 3:5-diiodothyronine.

Le produit est transformé quantitativement en thyroxine (caractérisation chromatographique) par un excès d'iode. Ses solutions dans la soude 0.1 N présentent une bande unique d'absorption dans l'ultraviolet (maximum à $\lambda = 2713 \text{ \AA}$, $\epsilon = 29,700$). Il donne la réaction de Millon et celles d'Ingvaldsen et Cameron (réaction des *o*-diiodophénol aux ions nitreux) et sa solubilité dans le *n*-butanol présente les mêmes caractères que celle de la thyroxine⁴.

Etude quantitative de l'ioduration de la 3:5-diiodothyronine

L'étude de la répartition de la radioactivité entre la triiodothyronine et la thyroxine sur les chromatogrammes des produits de l'action de I à 20 atomes d'iode marqué sur une molécule de DL-3:5-diiodothyronine a été poursuivie dans des con-

* Nous remercions M. le Professeur L. VELLUZ d'avoir autorisé M. POIRIER à opérer la micro-analyse de ce produit et M. le Professeur C. DUFRASSE d'avoir autorisé M. ETIENNE à en déterminer la courbe d'absorption au spectrophotomètre enregistreur Cary. On trouvera dans un travail d'ensemble publié par l'un de nous⁵ les microphotographies de cristaux de triiodothyronine et les courbes d'absorption de ce corps et des ses homologues di- et tétraiodés.

ditions diverses, voisines de celles adoptées plus haut. Les résultats obtenus dans une série d'essais ont permis d'établir la Fig. 2 selon le principe défini au cours de nos recherches antérieures sur l'ioduration de la tyrosine et de l'histidine⁶.

La formation du dérivé triiodé comme produit intermédiaire de l'halogénéation directe de la diiodothyronine en thyroxine est illustrée par cette figure. Celle-ci traduit en outre le fait qu'un fort excès d'iode (8 à 10 atomes I) est nécessaire à la saturation en 3':5' conduisant à la thyroxine. Comme la fixation d'un premier atome d'halogène aux cycles benzéniques des phénols s'opère en position 3^{6,7}, on peut admettre qu'il en est ainsi dans la réaction étudiée, au cours de laquelle la 3:5:3'-triiodothyronine prend naissance aux dépens de la 3:5-diiodothyronine.

DISCUSSION DES RESULTATS

L'action de l'iode⁶ ou du brome⁸ sur la tyrosine conduit à un dérivé cyclique mono-substitué en position 3, puis, en présence d'un excès d'halogène, à, un dérivé disubstitué en 3:5. Elle s'opère de même sur la 3:5-diiodothyronine, la 3:5:3'-triiodothyronine étant alors le précurseur de la thyroxine (3:5:3':5'-tétraiodothyronine). La nature du produit intermédiaire de la réaction ne saurait être mise en doute; il peut en effet être transformé quantitativement en thyroxine par ioduration après avoir été isolé à l'état pur cristallisé. Ses caractères analytiques étant très voisins de ceux de la thyroxine, les méthodes de dosage de celle-ci basées sur le principe de fractionnement des acides aminés iodés proposé par LELAND ET FOSTER⁴ ne peuvent pas être considérées comme spécifiques dans des mélanges de triiodothyronine et de thyroxine. En l'état actuel de nos connaissances, la séparation chromatographique préalable de ces corps est indispensable à leur dosage, irréalisable dans leurs mélanges. Cette méthode permet en outre, comme on l'a vu, de préparer la 3:5:3'-triiodothyronine dont le mémoire suivant étudie la biosynthèse*.

RÉSUMÉ

1. La 3:5:3'-triiodothyronine, acide aminé iodé non décrit jusqu'ici a été isolée à l'état pur, cristallisé, des produits de l'ioduration de la 3:5-diiodothyronine et ses caractères analytiques ont été établis.

2. La 3:5:3'-triiodothyronine est un produit intermédiaire de la transformation de la 3:5-diiodothyronine en thyroxine et l'halogénéation du cycle benzénique de la diiodothyronine en 3' est le premier stade d'un processus de substitution qui s'opère par le même mécanisme que l'ioduration de la tyrosine.

SUMMARY

1. 3:5:3'-triiodothyronine, an amino acid not previously described, has been prepared in a pure crystalline state from the iodination products of 3:5-diiodothyronine; its analytical properties have been described.

2. 3:5:3'-triiodothyronine is an intermediary product of the transformation of 3:5-diiodothyronine into thyroxine. The iodination of the benzene ring of diiodothyronine in 3' is the first step of the substitution reaction proceeding by the same mechanism as the iodination of tyrosine.

* La préparation de la triiodothyronine marquée en 3 et 5 on en 3' par l'iode radioactif a été réalisée à partir de la même méthode, en prenant comme produit de départ, dans le premier cas la 3:5-diiodothyronine marquée que l'on halogène par ¹²⁷I et, dans le second, le même corps non radioactif, sur lequel on fixe ¹³¹I⁹.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Eine bis jetzt nicht beschriebene Aminosäure, das 3:5:3'-Trijodthyronin, wurde in reinem kristallinem Zustand aus den Jodierungsprodukten von 3:5-Dijodthyronin dargestellt und seine analytischen Eigenschaften beschrieben.

2. 3:5:3'-Trijodthyronin ist ein Zwischenprodukt bei der Überführung des 3:5-Dijodthyronins in Thyroxin. Die Halogenierung des Benzolrings des Dijodothyronins in 3-Stellung ist der erste Schritt der Substitutionsreaktion, die nach demselben Mechanismus wie die Jodierung des Tyrosins verläuft.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. GROSS ET R. PITT-RIVERS, *Lancet*, 262 (1952) 249;
J. ROCHE, S. LISSITZKY ET R. MICHEL, *Compt. rend.*, 234 (1952) 997 et 2047.
- ² J. ROCHE, M. JUTISZ, S. LISSITZKY ET R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 257.
- ³ J. C. CLAYTON, A. A. FREE, J. R. RAGE, C. F. SOMMES ET A. E. WOOL, *Biochem. J.*, 44 (1950) 598.
- ⁴ J. LELAND ET G. L. FOSTER, *J. Biol. Chem.*, 95 (1932) 165.
- ⁵ S. LISSITZKY, Biochimie des acides aminés iodés marqués par ¹³¹I dans le corps thyroïde, *Thèse Doct. Sci. Nat.*, Paris 1952, n° d'ordre 3335, série A n° 2463, 1 vol. 116 p.
- ⁶ J. ROCHE, S. LISSITZKY, O. MICHEL ET R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 439.
- ⁷ R. VON ZEYNEK, *Z. physiol. Chem.*, 114 (1921) 275;
K. W. ROSENTHAL, W. KUHNHENN ET W. ZECHT, *Ber. deut. chem. Ges.*, 56 (1923) 2042.
- ⁸ Y. YAGI, R. MICHEL ET J. ROCHE, *Ann. pharm. franc.*, (1952).
- ⁹ J. ROCHE, R. MICHEL ET J. TATA, *Bull. soc. chim. biol.*, 34 (1952) 466.

Reçu le 9 janvier 1953