

SUR L'EXCRÉTION BILIAIRE ET LA GLYCOURCONJUGAISON
DE LA 3:5:3'-TRIIODOTHYRONINE

par

JEAN ROCHE, RAYMOND MICHEL ET JAMSHED TATA

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

L'injection au rat de faibles doses de thyroxine marquée par ^{131}I est suivie de l'excrétion biliaire d'une fraction de l'iode radioactif administré¹. Trois combinaisons renfermant celui-ci ont été individualisées par chromatographie sur papier. Elles sont constituées par la thyroxine elle-même, associée à son glycuroconjugué et à un produit dont la nature est encore inconnue². L'emploi de thyroxine marquée au moyen de ^{14}C dans le carboxyle a, par ailleurs, permis de préciser que la conjugaison porte sur la fonction phénol de l'acide aminé³. La récente identification de la 3:5:3'-triiodothyronine comme constituant de la sécrétion hormonale thyroïdienne⁴ nous a conduit à entreprendre sur le métabolisme de ce produit des recherches, dont celles consacrées à son élimination biliaire sont décrites dans ce travail. Elles ont porté principalement sur la formation éventuelle de ses glycuroconjugué et sulfoconjugué dans le foie.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Techniques

On fait subir à des rats mâles pesant de 280 à 300 g un cathétérisme du canal biliaire au moyen d'un tube de polythène de 0.5 mm de diamètre intérieur, afin de recueillir leur bile pendant une période de 24 heures, pendant laquelle on les maintient sous anesthésie au pentotal (30 mg dans 2 ml H₂O administrés par portions successives). On injecte à trois d'entre eux, par voie sous-cutanée, 8.8 µg de L-3:5:3'-triiodothyronine marquée en 3' par ^{131}I (15 µc)⁵ et trois autres reçoivent en outre du sulfate de sodium marqué par ^{35}S , sans entraîneur (8 µc).

La bile a été recueillie quantitativement à la huitième et à la vingt-quatrième heure d'expérience et des chromatogrammes ont été réalisés sur des échantillons individuels de 50 à 80 µl (chromatographie ascendante sur papier Whatman N° 1, en présence d'un mélange de 100 p. de collidine et de 35.5 p. d'eau et dans une atmosphère saturée d'ammoniaque). La radioactivité propre à ^{131}I et à ^{35}S a été mesurée dans la bile totale et sur les chromatogrammes au moyen d'un compteur cloche, type CEA, avec et sans un écran d'aluminium (18 mg Al/cm²) retenant totalement le rayonnement β de ^{35}S et celui d' ^{131}I dans une proportion que l'on a déterminée à l'aide d'un étalon d' ^{131}I de radioactivité connue. L'exécution des deux mesures sur un même matériel permet d'y doser ^{131}I et ^{35}S .

Excrétion biliaire de la 3:5:3'-triiodothyronine et de ses dérivés

Quelques-uns des résultats obtenus ont été rassemblés dans le Tableau I, avec des données comparatives établies après injection de thyroxine marquée en 3':5' à trois rats (12.4 à 18 µc ^{131}I)⁶.

Environ 30% d' ^{131}I injecté avec la 3:5:3'-triiodothyronine marquée en 3' sont éliminés en 24 heures, tandis que ^{35}S n'est excrété qu'à un taux minime (3.4%) et uniquement au cours des premières heures d'expérience. L'injection de thyroxine marquée en 3:5 conduit à des résultats analogues, l'élimination d' ^{131}I portant toutefois sur une fraction sensiblement moindre de la radioactivité.

TABLEAU I

IODE RADIOACTIF TOTAL (^{131}I) ET SOUFRE RADIOACTIF TOTAL (^{35}S) ÉLIMINÉS PAR LA BILE APRÈS INJECTION AU RAT DE THYROXINE, DE 3:5:3'-TRIIODOTHYRONINE ET DE SULFATE DE SODIUM MARQUÉS (% DE LA DOSE INJECTÉE)

Produit marqué injecté	Temps de récolte de la bile (heures)	Volume de bile recueilli (ml)	^{131}I éliminé %	^{35}S éliminé %
Tx	0-8	4.2	9.3	—
Tx	8-24	5.8	13.7	—
TRITH	0-8	4.6	14.0	—
TRITH	8-24	7.5	14.3	—
TRITH + $\text{S}^*\text{O}_4\text{Na}_2$	0-8	5.1	11.7	3.4
TRITH + $\text{S}^*\text{O}_4\text{Na}_2$	8-24	8.6	15.2	0

Fig. 1. Répartition d' ^{131}I sur des radiochromatogrammes (collidine aqueuse) de la bile d'un rat (300 g) après injection de 8.8 μg de 3:5:3'-triiodothyronine marquée en 3'. (Abcisses: longueur des chromatogrammes en cm; ordonnées: ^{131}I % total de la prise d'essai dans la bile secrétée au cours des 8 premières heures ou entre 8 et 24 heures après l'injection.

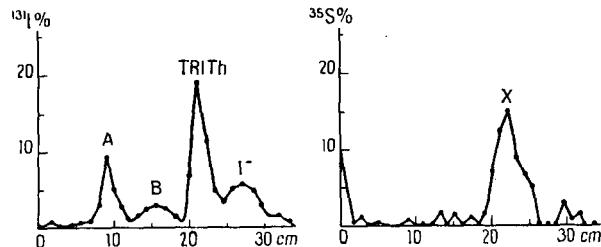
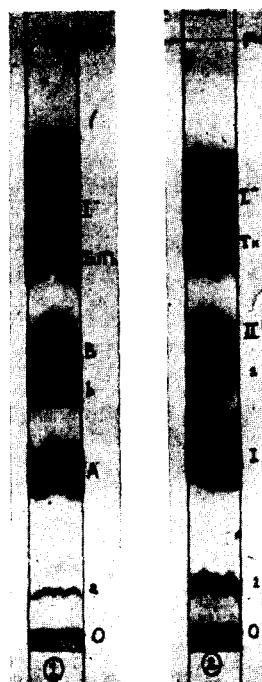
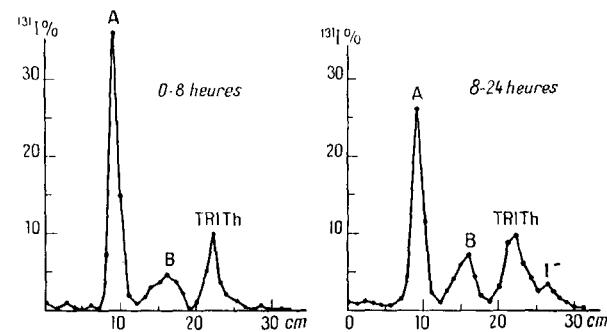


Fig. 2. Répartition d' ^{131}I et de ^{35}S sur un radiochromatogramme (collidine aqueuse) de la bile d'un rat (280 g) huit jours après l'injection de 8.8 μg de 3:5:3'-triiodothyronine (TRITH) marquée en 3' et de $\text{S}^*\text{O}_4\text{Na}_2$. (Abcisses: longueur du chromatogramme en cm; ordonnées: ^{131}I % et ^{35}S % total de la prise d'essai).

Fig. 3. Radioautogrammes des produits iodés (^{131}I) secrétés par la bile d'un rat (300 g) dans les huit premières heures après l'injection: 1, de 8.8 μg de 3:5:3'-triiodothyronine marquée en 3'; 2, de 12.4 μg de thyroxine marquée en 3' et 5' (solvant: collidine aqueuse). F = front du solvant; I- = iodures; Tx = thyroxine; TRITH = 3:5:3'-triiodothyronine; corps inconnus = A, B, a et b dans le cas de la 3:5:3'-triiodothyronine et I, II, 1 et 2 dans celui de la thyroxine; O = origine du chromatogramme.

Abréviations valables pour toutes les figures:

TRITH = 3:5:3'-triiodothyronine, A et B = corps inconnus, I- = iodures.

L'analyse radiochromatographique⁷ de la bile a conduit à l'établissement de courbes dont quelques-unes ont été reproduites dans les Figs. 1 et 2, auxquelles nous avons joint un document radioautographique (Fig. 3).

L'examen de la Fig. 1 traduit l'existence d'un mélange de corps iodés radioactifs, parmi lesquels la 3:5:3'-triiodothyronine a été identifiée par son R_F . En dehors de celle-ci deux produits, désignés respectivement par A et B, sont régulièrement présents et des traces d'iodures peuvent les accompagner. Les proportions dans lesquelles la substance injectée et les corps A et B sont éliminés varient d'un sujet à l'autre et au cours de l'expérience. Dans l'ensemble, le corps A prédomine fortement au début de celle-ci, tandis que le taux de B augmente par la suite. Les pourcentages respectifs de la radioactivité des divers constituants iodés de la bile sont, 8 heures après l'injection: A = 60, B = 13, TRITH = 21 et, entre 8 et 24 heures: A = 37, B = 23, TRITH = 32, I⁻ = 7 sur les chromatogrammes de la Fig. 1. La 3:5:3'-triiodothyronine est, par contre, plus abondante dans la bile dont le graphique 1 de la Fig. 2 illustre la composition (A = 21, B = 10, TRITH = 46, I⁻ = 18).

Les produits A et B ne renferment pas de soufre radioactif, lequel est fixé à des taches occupant des positions différentes (Fig. 2, graphique 2). L'une de celles-ci correspond aux sulfates minéraux (absence de migration en collidine aqueuse) et une autre, importante, est intermédiaire à celle du dérivé triiodé et des iodures. Comme nous avons observé qu'elle est présente même si les animaux ont reçu S^{*}O₄Na₂ non associé à la 3:5:3'-triiodothyronine, il est peu probable qu'elle renferme un dérivé de celle-ci mélangé à d'autres dérivés soufrés normalement excrétés par la bile*.

On remarquera que les radioautogrammes obtenus (Fig. 3) présentent une complexité plus grande que les chromatogrammes correspondants (Fig. 1). Il en est ainsi parce que des radioactivités trop faibles pour être mesurées avec précision au compteur de Geiger-Müller sont révélées sur les premiers, l'autographie étant à cet égard d'une extrême sensibilité. En dehors des iodures, du dérivé injecté et des corps A ou I et B ou II, il y a lieu de signaler que les biles étudiées renferment à de très faibles taux d'autres dérivés iodés, l'un de R_F très petit (1 et a), l'autre de R_F voisin de celui du corps B ou II (2 ou b). L'existence du corps 1, déjà signalée après administration de thyroxine², mérite d'être rapprochée de celle du corps a, survenant après injection du dérivé triiodé. L'analogie des deux autogrammes reproduits dans la Fig. 3 est à tous égards très grande.

Caractérisation d'un glycuroconjugué de la 3:5:3'-triiodothyronine

0.5 ml de bile provenant d'un rat ayant reçu 8 heures auparavant le dérivé triiodé marqué est déposé sur une ligne de départ de 19 cm d'une feuille de papier Whatman N° 1 (20 × 35.5 cm). On enroule celle-ci dans un tube cylindrique renfermant un mélange de collidine (100 p.) et d'eau (35.5 p.) servant à la chromatographie ascendante (atmosphère saturée de NH₄OH, $t = 16^\circ$). Après 42 heures, on séche le chromatogramme à l'air chaud ($t < 40^\circ$) et l'on en mesure la radioactivité afin d'y localiser le corps A. On découpe la bande renfermant celui-ci que l'on élue par l'ammoniaque (NH₄OH concentrée diluée à 1/100, deux éluations successives par 10 ml, rendement: 95%). La radiochromatographie d'un échantillon de la solution permet de contrôler la sélectivité de la séparation du corps A (voir Fig. 4, graphique 1).

* Cette expérience ne préjuge pas de la formation éventuelle de sulfoconjugués à partir du soufre organique des tissus.

L'éluat ammoniacal est concentré sous vide ($t < 35^\circ$) et son résidu sec repris par 0.5 ml d'une solution de β -glycuronidase de rate de veau renfermant 1500 unités Fishmann de cet enzyme*, ajusté à pH = 4.6 et mis à l'étuve à 37° sous toluène pendant 18 heures. Ce temps écoulé, on amène à pH = 2.0 par HCl 0.1 N et l'on extrait à trois reprises par 5 ml de *n*-butanol saturé par HCl 0.1 N, que l'on concentre ensuite sous vide. Le résidu sec est repris par 0.3 ml de *n*-butanol neutre et des radiochromatogrammes en collidine aqueuse et en *n*-butanol saturé d'ammoniaque 2 N sont établis sur cette solution. Les graphiques 2 et 3 de la Fig. 4 illustrent les résultats obtenus.

L'action de la β -glycuronidase sur le corps A libère de la 3:5:3'-triiodothyronine avec un rendement de 80 p. 100 environ dans les conditions où nous nous sommes placés, la caractérisation de cette dernière par son R_F en présence de deux solvants appropriés étant techniquement satisfaisante. Il y a donc lieu de considérer le corps A comme un glycuroconjugué du produit injecté.

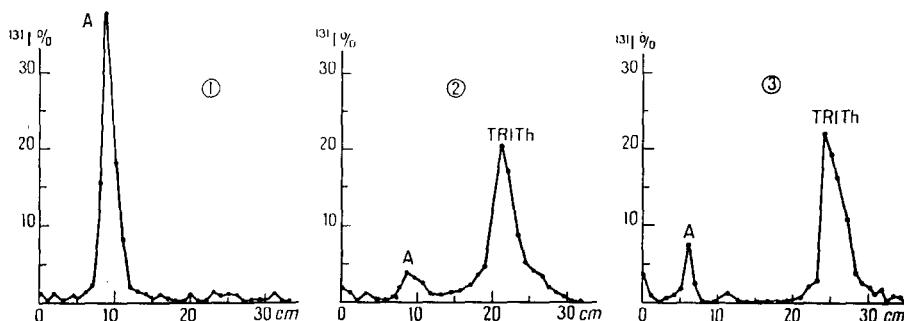


Fig. 4. Radiochromatogrammes: 1, du corps A élue (solvant: collidine aqueuse); 2 et 3, du produit de l'action de la β -glycuronidase sur le corps A (solvant: collidine aqueuse pour 2 et *n*-butanol ammoniacal pour 3).

DISCUSSION DES RÉSULTATS

L'injection au rat de doses de 3:5:3'-triiodothyronine très faibles (environ 3 μ g p. 100 g), bien que sensiblement supérieures à celles d'ordre physiologique, provoque l'excrétion biliaire rapide d'une partie de ce corps, de deux de ses dérivés et, éventuellement, de très petites quantités d'iode. L'un des produits inconnus individualisés dans la bile s'est révélé être, très probablement, un glycuroconjugué de la 3:5:3'-triiodothyronine et, par ailleurs, la formation de sulfoconjugués n'est susceptible de porter, si elle a lieu, que sur une fraction minime de celle-ci. Ces résultats méritent d'être rapprochés de ceux obtenus antérieurement sur l'élimination hépatique de la thyroxine et de ses dérivés^{2,3}. Dans un cas comme dans l'autre, le rôle du foie dans le métabolisme des deux hormones paraît être le suivant: en dehors d'une désioduration dont l'intensité ne peut pas être précisée à partir de la seule élimination des iodures, l'organe élimine en nature une fraction des hormones et en transforme une autre en dérivés d'excrétion, parmi lesquels des glycuroconjugués ont pu être caractérisés. On peut penser que ces processus sont physiologiquement peu importants et qu'ils constituent les éléments d'une sorte de mécanisme de sécurité contre la présence d'un excès des hormones thyroïdiennes dans le sang. Toutefois, le fait que la radiothyroxine administrée à dose

* Nous remercions Mr. le Professeur MAX JAYLE d'avoir bien voulu mettre à notre disposition la préparation titrée d'enzyme utilisée dans ce travail.

physiologique est en partie retrouvée dans les fèces⁸ montre que ce mécanisme doit être d'une extrême sensibilité et, de ce fait, participer à la régulation du taux sanguin des deux hormones. A ce titre, les résultats du travail actuel méritent de retenir l'attention dans l'étude du métabolisme de ces corps et dans leur utilisation thérapeutique. La grande analogie que présentent le comportement de la thyroxine et celui de la 3:5:3'-triiodothyronine en ce qui concerne l'excrétion hépatique de ces corps ressort par ailleurs de nos recherches, lesquelles complètent à cet égard celles que nous poursuivons sur le métabolisme des mêmes produits⁹.

RÉSUMÉ

1. L'injection à des rats de petites doses ($3 \mu\text{g p. }100\text{ g}$) de 3:5:3'-triiodothyronine marquée en 3' par ^{131}I est suivie de l'excrétion biliaire d'une fraction de l'iode administré (environ 30% en 24 heures). Les sulfates marqués (^{35}S) injectés simultanément ne sont rejettés par la bile qu'à un taux minime et pendant les 8 premières heures.

2. De la 3:5:3'-triiodothyronine est alors présente en nature dans la bile en même temps que deux autres dérivés iodés (A et B), dont les taux respectifs sont très variables. Le plus abondant de ceux-ci (A) a été caractérisé comme un glycuroconjugué du produit injecté, qu'il libère par action de la β -glycuronidase.

3. L'excrétion biliaire de la 3:5:3'-triiodothyronine et de ses dérivés présente de grandes analogies avec celle de la thyroxine.

SUMMARY

1. The injection into rats of small doses ($3 \mu\text{g p. }100\text{ g}$) of 3:5:3'-triiodothyronine labelled on 3' by ^{131}I is followed by the excretion of a fraction of radioactive iodine (about 30% in 24 hours) in the bile. Labelled sulphates (^{35}S) injected at the same time are eliminated by bile only in very small amounts and during the first 8 hours.

2. 3:5:3'-triiodothyronine is eliminated by bile with two other iodinated derivatives (A and B) present in very variable amounts. The most abundant of these, A, has been characterized as a glycuroconjugate of the injected substance, which is freed from the product A by β -glycuronidase.

3. Biliary excretion of 3:5:3'-triiodothyronine and of its derivatives offers a great similarity with that of thyroxine.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei Ratten folgt der Injektion geringer Mengen ($3 \mu\text{g pro }100\text{ g}$) von in der 3'-Stellung mit ^{131}I markierter 3:5:3'-Triiodthyronin eine Ausscheidung von Bruchteilen radioaktiven Jods (ungefähr 30% in 24 Stunden) in der Galle. Zu gleicher Zeit injizierte markierte Sulfate (^{35}S) werden durch die Galle nur in sehr geringen Mengen und während der ersten 8 Stunden ausgeschieden.

2. 3:5:3'-Triiodthyronin wird durch die Galle zusammen mit zwei anderen anwesenden jodierten Derivaten (A und B) von sehr wechselnden Ausbeuten ausgeschieden. Das am reichlichsten vorhandene Derivat (A) wurde als ein Glycurokonjugat der injizierten Substanz charakterisiert. 3:5:3'-Triiodthyronin wird durch Einwirkung von β -Glycuronidase auf das Derivat A in Freiheit gesetzt.

3. Die Gallenausscheidung des 3:5:3'-Triiodthyronins und seiner Derivate zeigt weitgehende Analogien mit der des Thyroxins.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ F. JOLIOT, R. COURRIER, A. HOREAU ET P. SÜE, *Compt. rend.*, 218 (1944) 769; *Compt. rend. soc. biol.*, 138 (1944) 325.
- ² A. TAUROG, F. N. BRIGGS ET I. L. CHAIKOFF, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 29 et 194 (1952) 655.
- ³ H. M. KLITGAARD, H. J. LIPNER, S. B. BARKER ET T. WINNICK, *Endocrinol.*, 52 (1953) 79.
- ⁴ J. ROCHE, S. LISSITZKY ET R. MICHEL, *Compt. rend.*, 234 (1952) 1228;
- ⁵ J. GROSS ET R. PITTS-RIVERS, *Lancet*, 262 (1952) 439.
- ⁶ R. MICHEL, J. ROCHE ET J. TATA, *Bull. soc. chim. biol.*, 34 (1952) 466.
- ⁷ A. HOREAU ET P. SÜE, *Bull. soc. chim. biol.*, 27 (1945) 483.
- ⁸ J. ROCHE, M. JUTISZ, S. LISSITZKY ET R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 257.
- ⁹ J. GROSS ET C. P. LEBLOND, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 189.
- ⁹ J. ROCHE, R. MICHEL ET J. TATA, *Compt. rend. soc. biol.*, 146 (1952) 1003.

Reçu le 22 avril 1953