

SUR DEUX NOUVEAUX CONSTITUANTS HORMONAUX
DU CORPS THYROÏDE, LA 3:3'-DIIODOTHYRONINE ET LA
3:3':5'-TRIIODOTHYRONINE

par

JEAN ROCHE, RAYMOND MICHEL, WALTER WOLF ET JACQUES NUNEZ

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

Les deux hormones thyroïdiennes identifiées jusqu'ici, la L-3:5:3':5'-tetraiodothyronine ou L-thyroxine et la L-3:5:3'-triiodothyronine, dérivent l'une et l'autre d'un même acide aminé, la L-thyronine. Il est très probable qu'elles se forment au sein de la thyroglobuline par condensation, avec élimination d'un reste d'alanine, de deux molécules de L-3:5-diiodotyrosine pour la première¹, de la L-3-monoiodotyrosine et de la L-3:5-diiodotyrosine pour la seconde². On peut se demander si le même processus ne donne pas naissance à d'autres corps dans la glande. En effet, la condensation des dérivés mono- et disubstitués de la tyrosine doit pouvoir conduire à deux triiodothyronines, halogénées l'une en 3:5:3', l'autre en 3:3':5', selon que le cycle *p*-hydroxyphénoxy de celles-ci provient de la L-3-mono- ou de la L-3:5-diiodotyrosine. Par ailleurs, la formation de la L-3:3'-diiodothyronine à partir de deux molécules de L-3-monoiodotyrosine mérite d'être envisagée; elle relèverait du même mécanisme que la biosynthèse de la L-thyroxine aux dépens de la L-3:5-diiodotyrosine. L'existence dans la glande de quantités relativement grandes de L-3-monoiodotyrosine³ y rend plausible celle des deux triiodothyronines et de leur homologue 3:3'-diiodé.

Nous nous sommes proposé de rechercher si la L-3:3'-diiodothyronine et la L-3:3':5'-triiodothyronine sont présentes dans la thyroglobuline, auquel cas elles seraient probablement sécrétées avec les autres L-iodothyronines que renferme cette protéine et constitueraient, comme elles, des hormones thyroïdiennes.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les deux iodothyronines nouvelles sur lesquelles porte notre travail ne pouvaient exister dans la glande ou dans le sérum qu'à des taux minimes, et leur caractérisation en présence d'autres dérivés de la même série posait des problèmes techniques qui n'auraient pas pu être résolus si l'on n'avait étudié au préalable les propriétés de ces corps à l'état pur. Aussi a-t-il été nécessaire d'en réaliser la synthèse⁴ et de mettre au point leur séparation chromatographique⁵. Nous nous bornerons à décrire ici celles des opérations réalisées dans ce domaine pour mener à bien nos recherches.

I. Préparation des iodothyronines

A. DL-3:3'-diiodothyronine. 40 mg de DL-3-monoiodothyronine, obtenue par désioduration partielle de la DL-3:5-diiodothyronine par hydrogénation en présence de nickel de RANEY⁴, sont

Bibliographie p. 317.

dissous dans 50 ml d'ammoniaque concentrée et traités par 25 mg I_2 en solution dans 5 ml de méthanol, ajoutés par petites portions en 1 heure à 20°C. On concentre sous vide à 5 ml. On sépare le précipité formé que l'on élimine. La solution est concentrée à 2 ml, ajustée à pH = 5.5 par HCl 2N, ce qui provoque la précipitation de la DL-3:3'-diiodothyronine, que l'on lave à l'eau avant de la dessécher sur P_2O_5 . F = 198°C (décomp.). Teneur en iode, I% = 48.1 (théor. 48.4).

B. DL-3:3':5'-triiodothyronine. 14 mg de DL-3-monoiodothyronine dissous dans 20 ml d'ammoniaque concentrée sont additionnés lentement de 27 mg I_2 dissous dans 5 ml d'éthanol. Après séjour d'1 heure à 20°C, on concentre sous vide à 5 ml et l'on acidifie à pH = 5.0 par CH_3-COOH à 20%. Le précipité obtenu renferme la DL-3:3':5'-triiodothyronine et diverses impuretés. Après l'avoir séché, on l'extrait par 1 ml d'éthanol additionné de 0.1 ml NaOH N. On élimine le résidu insoluble, on acidifie à pH = 4.5 par CH_3-COOH à 10% et l'on porte au bain-marie bouillant. Après refroidissement, il se forme un précipité que l'on élimine et l'addition de 5 ml d'eau provoque la précipitation de la DL-3:3':5'-triiodothyronine que l'on sèche sur P_2O_5 . F = 204°C (décomp.). Teneur en iode, I% = 58.6 (théor. 58.5).

II. Caractères chromatographiques des iodothyronines et solvants appropriés à leur séparation

Les R_F d'un ensemble d'iodothyronines préparées par synthèse⁴ ont été déterminés dans de multiples solvants, dont certains ont été mis au point en vue de la séparation de ces corps⁵.

Les résultats rassemblés ci-dessous ont été obtenus sur papier Whatman No. 1 et après révélation soit par la ninhydrine, soit par la réaction de Pauly ou par celle de BOWDEN, MACLAGAN ET WILKINSON⁶ au sulfate cérique et à l'arsénite de sodium. La ninhydrine exige la présence de 15 à 40 μg de produit, la réaction de Pauly de 20 à 50 μg et la troisième, beaucoup plus sensible, de 0.5 à 4 μg . Cette dernière, seule, est spécifique des dérivés iodés. Nous l'opérons en imprégnant des réactifs le chromatogramme sec. Les taches des corps iodés apparaissent alors en blanc sur un fond jaune.

TABLEAU I

R_F DE DIVERSES IODOTHYRONINES PURES EN PRÉSENCE DE DIVERS SOLVANTS

A: *n*-butanol saturé d' NH_4OH 3N (18°C, sens descendant).

B: *n*-butanol, acide acétique, eau (78:5:17) (18°C, sens descendant).

C: collidine aqueuse, atmosphère saturée d' NH_3 (18°C, sens ascendant).

D: isopentanol saturé d' NH_4OH 2N (12°C, sens descendant).

E: *n*-butanol-dioxane (4:1) saturé d' NH_4OH 2N (16°C, sens descendant).

F: méthanol-acétate d'ammonium 0.2 M (1:2.5), pH = 6.1 (3°C, sens ascendant).

Corps (DL) étudié	R_F dans le solvant					
	A	B	C	D	E	F*
3-monoiodothyronine	0.60	0.70	0.65	0.70	0.64	0.00
3:5-diiodothyronine	0.66	0.65	0.68	0.75	0.64	0.00
3:3'-diiodothyronine	0.51	0.70	0.58	0.50	0.48	0.23
3:5:3'-triiodothyronine	0.64	0.70	0.70	0.60	0.60	0.00
3:3':5'-triiodothyronine	0.43	0.68	0.63	0.40	0.40	0.10
thyroxine	0.48	0.75	0.59	0.50	0.46	0.00
iodures	0.31	0.20	0.85	0.20	0.38	0.68

* en présence d'au moins 5 μg des corps étudiés, un décalage des taches pouvant se manifester pour des quantités inférieures.

Les données obtenues sont reproductibles de manière satisfaisante dans les conditions indiquées, parmi lesquelles il y a lieu de signaler qu'un contrôle de la température (+3-4°C) et du pH (6.1) sont indispensables dans le cas du solvant F et que l'emploi du solvant D exige une température ne dépassant pas +12-13°C. La chromatographie à deux dimensions donne des résultats particulièrement significatifs en utilisant les solvants E et F, car le premier permet de séparer d'abord la thyroxine et la 3:3'-diiodothyronine des deux triiodothyronines et le second d'individualiser par la suite les dérivés 3:3'-diiodé et 3:3':5'-triiodé.

Dans les recherches poursuivies sur des hydrolysats thyroïdiens ou sur le sérum

sanguin, les quantités des diverses iodothyronines présentes dans les prises d'essai étaient trop faibles pour être décelées avec certitude par des réactions chimiques. Aussi avons-nous alors opéré sur des produits biologiquement marqués par de l'iode radioactif, que nous avons mis en évidence par autographie. Cette dernière a été réalisée à partir de chromatogrammes provenant d'échantillons additionnés d'iodothyronines pures, servant d'entraîneurs, présentes en quantité suffisante pour assurer une migration et une définition régulières des taches et pour permettre la caractérisation de celles-ci par les réactions chimiques appropriées. Une même localisation des taches révélées par les deux techniques identifie un corps radioactif inconnu à l'un des entraîneurs connus ajoutés au milieu.

III. Présence de la 3:3':5'-triiodothyronine dans la thyroglobuline

Des lots de trois rats ♂ (100-125 g) placés à +22°C reçoivent par voie intrapéritonéale 50-75 μC ^{131}I (I^*Na sans entraîneur). On les sacrifie 48 heures après et leurs corps thyroïdes, renfermant 20 à 24% de la radioactivité injectée, sont broyés en présence de poudre de verre et traités à quatre reprises par 0.5 ml NaCl à 0.9%. Le liquide d'extraction recueilli renferme pratiquement la totalité de la thyroglobuline des glandes. On hydrolyse celle-ci à +37°C par les protéinases pancréatiques totales (pH = 8.5; 30 heures), puis par la papaïne activée au moyen d' H_2S (pH = 5.0; 12 heures). L'hydrolysât obtenu est amené à pH = 9.0 par l'ammoniaque concentrée, centrifugé et analysé par chromatographie sur papier Whatman No. 1. La révélation des taches des produits ajoutés comme entraîneurs a été opérée par la réaction au sulfate cérique et à l'arsénite de sodium⁶ et celle des corps marqués naturels par radioautographie.

Les radioautogrammes monodimensionnels obtenus traduisent l'existence de constituants iodés marqués dont l'un, présent en faible quantité, est caractérisé par un R_F identique à celui de la 3:3':5'-triiodothyronine, comme en rendent compte les deux documents reproduits sur la Fig. 1. La chromatographie bidimensionnelle a confirmé ce fait, qu'objective le document constituant la Fig. 3, sur lequel nous reviendrons.

L'élimination de la 3:5:3'-triiodothyronine et l'enrichissement en son isomère 3:3':5'-substitué ont été réalisés par chromatographie de l'hydrolysât thyroïdien sur une ligne de 30 cm de long (solvant: isopentanol ammoniacal, $t^\circ = +12^\circ\text{C}$) et élution de la bande de $R_F = 0.40-0.45$, repérée au moyen de témoins marginaux. Il a été possible, en répétant cette opération, d'augmenter sensiblement le taux du constituant dont le R_F correspond à celui de la 3:3':5'-triiodothyronine en éliminant une partie du fort excès de thyroxine qui l'accompagne. La mesure de la radioactivité des chromatogrammes établis à partir des éluats a permis d'obtenir des courbes de répartition d' ^{131}I dont un exemple est reproduit dans la Fig. 2.

Bibliographie p. 317.

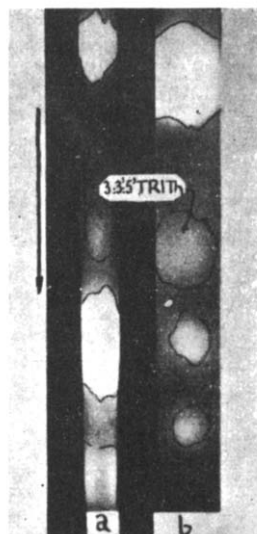


Fig. 1. Radioautogrammes de l'hydrolysât enzymatique de l'extrait thyroïdien total de rats traités par ^{131}I , 48 heures avant d'être sacrifiés: a, solvant: isopentanol saturé d' NH_4OH 2N (+12°C), R_F de la 3:3':5'-triiodothyronine = 0.40; b, solvant: *n*-butanol saturé d' NH_4OH 3N (+18°C), R_F de la 3:3':5'-triiodothyronine = 0.43.

Les résultats de ces divers essais suggèrent que la 3:3':5'-triiodothyronine accompagne à un très faible taux l'isomère 3:5:3' dans la thyroglobuline. Ils ne sauraient

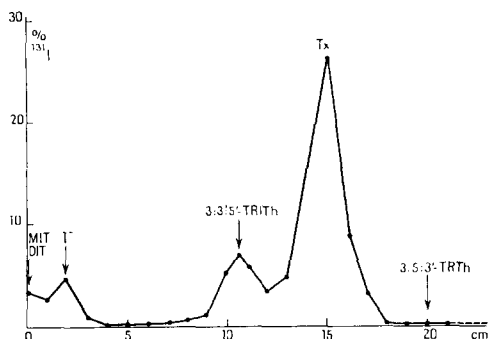


Fig. 2. Radiochromatogramme (solvant: *iso*-pentanol saturé d' NH_4OH 2*N*, +12°C) d'une fraction de l'hydrolysât enzymatique de l'extrait thyroïdien total de rats traités par ^{131}I , 48 heures avant d'être sacrifiés. Abscisses: longueur, en centimètres, du chromatogramme; ordonnées: pour 100 ^{131}I total de la prise d'essai. Tx = thyroxine; 3:3':5'-TRITH = 3:3':5'-triiodothyronine; 3:5:3'-TRTH = 3:5:3'-triiodothyronine; MIT et DIT = 3-mono- et 3:5-diiodotyrosine; I- = iodures

être dus à une désioduration de la thyroxine au cours des opérations, comme l'indiquent des expériences témoins. L'éventualité de l'identité du R_F d'un peptide iodé et de la 3:3':5'-triiodothyronine dans les nombreux solvants employés est, par ailleurs, très peu probable, en sorte que la présence de la dernière dans la thyroglobuline nous paraît être démontrée par nos observations.

IV. Présence de la 3:3'-diiodothyronine dans la thyroglobuline et dans le plasma sanguin

Des lots de trois rats ♂ (120–150 g) ayant reçu par voie intrapéritonéale 50 à 75 μC ^{131}I (^1Na sans entraîneur) ont été sacrifiés de 12 à 48 heures après. Leurs corps thyroïdes, renfermant 10–12% d' ^{131}I injecté, ont été broyés avec de la poudre de verre et extraits quatre fois par 0.5 ml NaCl à 0.9%. Les liquides recueillis renferment la thyroglobuline. On hydrolyse celle-ci, d'abord par les protéinases pancréatiques totales (pH = 8.5; 30 heures), puis par la papaine activée au moyen d' H_2S (pH = 5.0; 12 heures). L'hydrolysât obtenu, amené à pH = 9.0 par l'ammoniaque concentrée, est ensuite soumis à l'analyse.

Des chromatogrammes bidimensionnels ont été obtenus après addition des diverses iodothyronines servant d'entraîneurs, en utilisant comme premier solvant le mélange de *n*-butanol et de dioxane (4:1) saturé d' NH_4OH 2*N* (sens descendant, +16°C), et comme second le mélange de méthanol et d'acétate d'ammonium (1:2.5), pH = 6.1 (sens ascendant; +3–4°C). Les radioautogrammes établis à partir de ces essais présentent un aspect caractéristique, ainsi que le montre l'examen du document que reproduit, à titre d'exemple, la Fig. 3. Ils comportent plusieurs taches dont l'une, très faible, occupe la position de la 3:3'-diiodothyronine et l'autre celle de la 3:3':5'-triiodothyronine, et l'on y note en outre celle d'un corps inconnu (X).

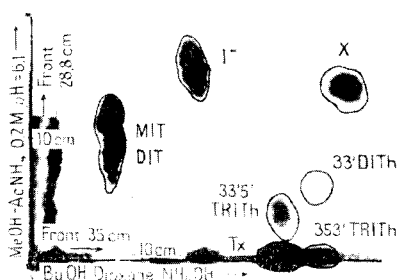
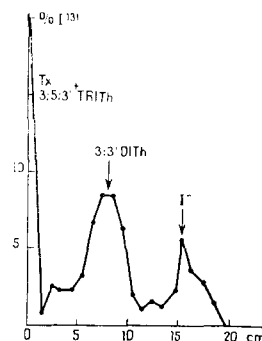


Fig. 3. Radioautogramme bidimensionnel (verticalement: *n*-butanol-dioxane-ammoniaque, +16°C; horizontalement: méthanol-acétate d'ammonium, +3°C) de l'hydrolysât pancréatico-papainique total de la thyroglobuline de rats ayant reçu 12 h auparavant une injection d'iodures marqués sans entraîneur (Tx = thyroxine; 3:5:3'- et 3:3':5'-TRITH = 3:5:3'- et 3:3':5'-triiodothyronine; 3:3'-DIITH = 3:3'-diiodothyronine; X = corps iodés inconnus).

Nous avons concentré le corps considéré comme la 3:3'-diiodothyronine par chromatographie préparative d'un hydrolysats thyroïdien (solvant: *n*-butanol-dioxane saturé d' NH_4OH 2*N*), élution de la bande radioactive de $R_F = 0.45-0.50$ par l'ammoniaque au quart et évaporation à 1 ml de l'éluat sous vide ($t^\circ < +30^\circ\text{C}$), afin d'éviter la désioduration en monoiodothyronine du dérivé diodé. Le radiochromatogramme, établi en présence du mélange de méthanol et d'acétate d'ammonium 0.2 *M* (1:2.5) à $\text{pH} = 6.1$ à partir de l'éluat concentré, comporte trois sommets bien définis, dont l'un correspond à celui de la 3:3'-diiodothyronine, de $R_F = 0.23$ (Fig. 4). Les résultats ont été confirmés en présence d'autres solvants mentionnés au Tableau I.

Fig. 4. Radiochromatogramme (méthanol-acétate d'ammonium, $+3^\circ\text{C}$) d'une fraction de l'hydrolysats pancréatico-papaïnique de la thyroglobuline de rats ayant reçu 12 h auparavant une injection d'iodures marqués sans entraîneur (Tx: thyroxine, 3:5:3'-TRITH = 3:5:3'-triiodothyronine; 3:3'-DITH = 3:3'-diiodothyronine; I = iodures). Abscisses: longueur du chromatogramme (cm); ordonnées = % ^{131}I total de la prise d'essai.



Des expériences complémentaires ont été réalisées selon les modalités suivantes. La totalité de l'hydrolysats thyroïdien a été soumise à une chromatographie préparative monodimensionnelle (2 ml déposés en une ligne de 25 cm sur papier Whatman No. 1, solvant: *n*-butanol-dioxane saturé d' NH_4OH 2*N*, $t^\circ = 16^\circ\text{C}$). La partie inférieure du radioautogramme obtenu (partie A de la Fig. 5) comporte une série de bandes dont une correspond aux iodures ($R_F = 0.35$), une autre à un mélange de thyroxine, de 3:3':5'-triiodothyronine et de 3:3'-diiodothyronine ($R_F = 0.44, 0.40$ et 0.44), et celle de $R_F = 0.58$ à la 3:5:3'-triiodothyronine. Après élution de la bande de $R_F = 0.40-0.45$ par le *n*-butanol saturé d'eau, concentration de l'éluat à $t^\circ < 30^\circ\text{C}$, on soumet la totalité de celui-ci à une nouvelle chromatographie sur papier après addi-

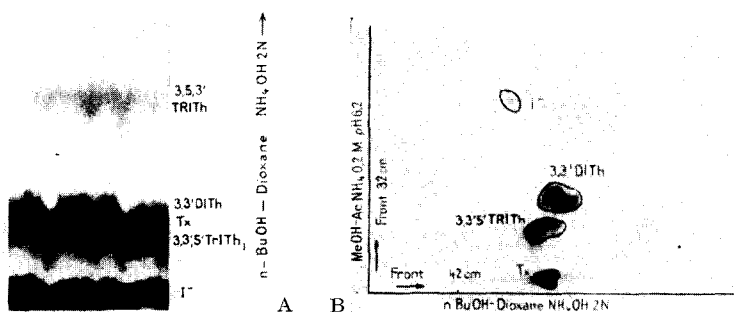


Fig. 5. A. Radioautogramme partiel d'un chromatogramme monodimensionnel d'un hydrolysats protéinasique de l'extrait total du corps thyroïde de trois rats ayant reçu 24 heures avant d'être sacrifiés 100 μC ^{131}I à l'état d' ^{131}I Na sans entraîneur (solvant: *n*-butanol-dioxane [4:1] saturé d'ammoniaque 2*N*, $+16^\circ\text{C}$). B. Radioautogramme d'un produit de fractionnement du même hydrolysats (voir texte), établi à partir d'un chromatogramme bidimensionnel (premier solvant: *n*-butanol-dioxane [4:1] saturé d'ammoniaque 2*N*, $+16^\circ\text{C}$; deuxième solvant: méthanol-acétate d'ammonium 0.2 *M* [1:2.5], $\text{pH} = 6.1$, $+3^\circ\text{C}$). Tx = thyroxine; 3:5:3'-TRITH et 3:3':5'-TRITH = 3:5:3'-et 3:3':5'-triiodothyronine; 3:3'-DITH = 3:3'-diiodothyronine; I- = iodures minéraux.

tion d'entraîneurs (solvant: méthanol-acétate d'ammonium 0.2 *M* (1:2.5), pH = 6.1, $t^\circ = 3^\circ\text{C}$, sens ascendant). La radioactivité du chromatogramme obtenu se localise en grande partie sur deux taches de R_F correspondant respectivement aux 3:3':5'-triiodothyronine et 3:3'-diiodothyronine. On élue la région occupée par des corps de R_F compris entre 0.13 et 0.38 afin de soumettre ceux-ci à une chromatographie bidimensionnelle, dont les résultats autographiques sont reproduits dans la partie B de la Fig. 5. La présence de 3:3'-diiodothyronine et de 3:3':5'-triiodothyronine est objectivée avec une très grande netteté par cette dernière.

La quantité de 3:3'-diiodothyronine marquée présente à la douzième heure d'expérience a été, dans de nombreux cas, égale ou légèrement supérieure au quart de celle de la thyroxine présente. Le dérivé diodé apparaît plus précocement que celle-ci et diminue par la suite, peut-être en raison de sa transformation partielle en 3:3':5'-triiodothyronine par ioduration.

Une autre série d'essais a été consacrée à la recherche de la 3:3'-diiodothyronine dans le plasma sanguin. Elle a porté sur trois lots de trois rats ♂ (125–150 g) ayant reçu par voie intrapéritonéale 100 μC ^{131}I (I^*Na sans entraîneur) que l'on a sacrifiés 15, 24 et 48 heures après. Les corps thyroïdes des animaux de chaque lot renfermaient respectivement 24, 28 et 19% d' ^{131}I injecté. Le sang a été recueilli sur héparine et le plasma, séparé par centrifugation, a été extrait à trois reprises par du *n*-butanol saturé d' HCl 0.1 *N* (trois extractions successives par 20 ml, 10 ml et 10 ml). La radioactivité par ml de plasma et le pourcentage de celle-ci extraite sont les suivants:

Temps après l'injection	15 heures	24 heures	48 heures
Radioactivité par ml de plasma	0.23 μC	0.45 μC	0.15 μC
% de la radioactivité extraite	62	47	53

Les extraits butanoliques ont été évaporés sous vide à température inférieure à 30°C . Le résidu sec a été repris par 0.2 ml de *n*-butanol saturé d'eau et la solution obtenue a été soumise à l'analyse chromatographique après addition d'entraîneurs.

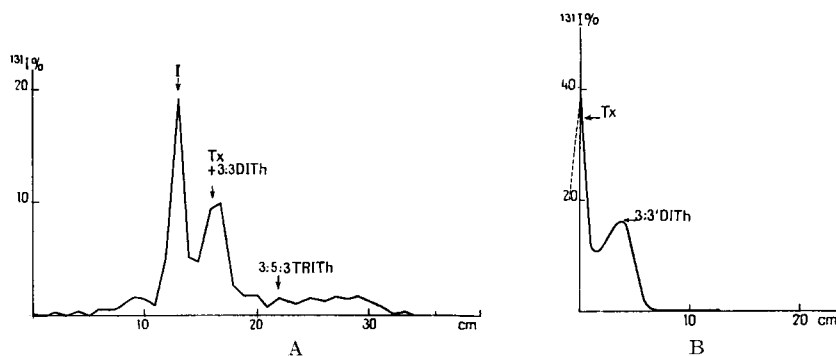


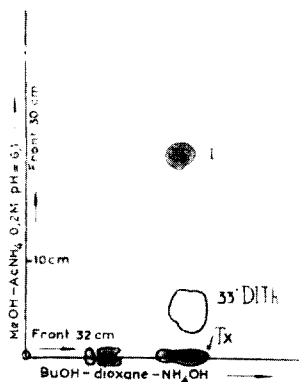
Fig. 6. Radiochromatogrammes monodimensionnels établis aux deux étapes successives de la chromatographie bidimensionnelle d'un extrait *n*-butanolique de plasma de rat prélevé 15 heures après l'injection d' ^{131}I (100 μC I^*Na sans entraîneur à 3 animaux). A. chromatographie en mélange de *n*-butanol-dioxane (1:1) saturé d' NH_4OH 2*N*, sens descendant, $t^\circ = 16^\circ\text{C}$. Mesures sur l'ensemble du chromatogramme. B. chromatographie en mélange de méthanol-acétate d'ammonium 0.2 *M* (1:2.5), pH = 6.1, sens ascendant, $t^\circ = +3^\circ\text{C}$. Mesures sur la région du chromatogramme correspondant à la région occupant du 16e au 19e cm sur A. I^- = iodures; Tx = thyroxine; 3:5:3'-TRITH = 3:5:3'-triiodothyronine; 3:3'-DITH = 3:3'-diiodothyronine. Abscisses: longueur (cm) du chromatogramme; ordonnées: % ^{131}I de la prise d'essai.

Des chromatogrammes à deux dimensions ont été établis en prenant comme premier solvant le mélange: *n*-butanol-dioxane (1:1) saturé d'ammoniaque 2*N* (sens descendant, +16°C) et comme second le mélange: méthanol-acétate d'ammonium 0.2*M*, pH = 6.1 (1:2.5; sens ascendant; +3-4°C), à partir des extraits du plasma de chaque lot d'animaux.

La Fig. 6 illustre les résultats obtenus sur celui provenant de rats sacrifiés 15 h après l'injection d'¹³¹I. Le radiochromatogramme A traduit les valeurs déterminées dans la direction du premier développement (*n*-butanol-dioxane-NH₄OH 2*N*). Trois sommets distincts peuvent alors être repérés; l'un, de $R_F = 0.27$, correspond à un corps inconnu; les deux autres occupent, l'un la position des iodures, l'autre celle de la thyroxine et de la 3:3'-diiodothyronine, pratiquement confondues dans ce solvant. La 3:5:3'-triiodothyronine n'apparaît pas de façon nette sur ce document. Après chromatographie en deuxième dimension avec le mélange de méthanol et d'acétate d'ammonium, on mesure la radioactivité cm par cm sur une bande de 3 cm de large, parallèle au sens du deuxième développement et correspondant à la tache de thyroxine et de 3:3'-diiodothyronine. La Fig. 6 B rend compte de l'existence de deux sommets occupant les positions respectives de la thyroxine ($R_F = 0$), l'autre celle de la 3:3'-diiodothyronine ($R_F = 0.18$).

Le radioautogramme bidimensionnel reproduit dans la Fig. 7 provient du plasma des rats sacrifiés 24 h après l'injection d'¹³¹I; il comporte plusieurs taches radioactives, correspondant respectivement à la 3:3'-diiodothyronine, à la thyroxine, aux iodures et à un produit de nature inconnue. Ce dernier présente un R_F voisin des iodotyrosines en *n*-butanol-dioxane-NH₄OH 2*N* et pourrait être considéré comme de la diiodotyrosine si son R_F en méthanol-

Fig. 7. Radioautogramme d'un chromatogramme bidimensionnel de l'extrait *n*-butanolique du plasma de rats prélevé 24 heures après administration d'¹³¹I (100 µc I*Na, sans entraîneur, à 3 animaux). Solvants: (1) *n*-butanol-dioxane (1:1) saturé d'NH₄OH 2*N*, sens descendant, $t^\circ = 16^\circ\text{C}$; (2) méthanol-acétate d'ammonium 0.2 *M* (1:2.5), pH = 6.1, sens ascendant, 3°C. I⁻ = iodures; Tx = thyroxine; 3:3'-DITh = 3:3'-diiodothyronine.



acétate d'ammonium n'excluait pas cette hypothèse ($R_F = 0$ dans ce solvant au lieu de 0.34 pour la diiodotyrosine). Il correspond sensiblement soit à la position du corps S présent dans le plasma de rats thyroïdectomisés traités par la thyroxine radioactive, soit à celle du glycuconjugué de la thyroxine⁷. La teneur en 3:3'-diiodothyronine du plasma peut, comme dans le corps thyroïde, dépasser le quart de celle de la thyroxine présente. Elle apparaît précocement, puisqu'on la rencontre dans la quinzième heure après l'injection d'¹³¹I, et son taux sanguin paraît s'abaisser par la suite.

Des essais du même type ont été réalisés sur l'extrait *n*-butanolique du corps thyroïde des animaux, renfermant la totalité des acides aminés iodés libres de la glande et divers peptides iodés provenant de l'hydrolyse physiologique de la thyroglobuline. Cette fraction de l'iode thyroïdien est très faible (0.5-1% d'¹³¹I total dans nos expériences), mais elle est biologiquement très importante, puisque la sécrétion

hormonale s'élabore à partir de ses constituants. Nous y avons décelé la présence constante de très petites quantités de 3:3'-diiodothyronine et de 3:3':5'-triiodothyronine, que l'on peut penser être certains des corps inconnus dont l'existence avait été signalée antérieurement⁸. L'une et l'autre des deux iodothyronines étudiées se sont montrées réfractaires à l'action de la deshalogénase thyroïdienne.

DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

La présence dans la thyroglobuline et, à l'état d'acides aminés libres, dans la glande, des 3:3'-diiodothyronine et 3:3':5'-triiodothyronine (probablement sous la forme L) peut être considérée comme établie par nos résultats; il convient d'examiner sa signification, en ce qui concerne le rôle hormonal éventuel de ces corps et leur biosynthèse.

Nous avons déterminé avec N. ETLING⁹ l'activité antioïtrogène (hypertrophie thyroïdienne au 6-N-propylthiouracile) des diverses iodothyronines vis-à-vis du rat et l'on trouvera les résultats de nos essais dans le Tableau II.

TABLEAU II
ACTIVITÉ ANTIOITROGENE RELATIVE DE DIVERSES IODOETHYRONINES PURES

<i>Composé étudié</i>	<i>Activité relative</i>
DL-thyroxine	100
DL-3:5:3'--triiodothyronine	500
DL-3:3':5'-triiodothyronine	5
DL-3:3'-diiodothyronine	85

L'activité de la 3:3'-diiodothyronine est voisine de celle de la thyroxine, en sorte que le rôle de la première en tant qu'hormone thyroïdienne apparaît comme important, étant donné son taux dans la glande et dans le plasma. La 3:3':5'-triiodothyronine est, par ailleurs, très peu active en tant qu'agent antioïtrogène, mais il n'est pas exclu qu'elle présente à un degré élevé d'autres propriétés du type thyroïdienne. Aussi la sécrétion du corps thyroïde apparaît-elle comme constituée par un mélange d'au moins quatre hormones: la thyroxine, les 3:3':5'- et 3:5:3'-triiodothyronines et la 3:3'-diiodothyronine. La thyroxine et la 3:3'-diiodothyronine sont les plus abondantes de celles-ci et le taux des deux dérivés triiodés est toujours notablement plus faible que celui de la 3:3'-diiodothyronine.

La biosynthèse des deux nouveaux constituants thyroïdiens décrits dans ce travail pose à nouveau le problème de l'origine des iodothyronines dont les positions 3:5:3':5' ne sont pas toutes halogénées. On peut envisager que la 3:3'-diiodothyronine se forme dans la glande, par condensation de deux molécules de 3-monoiodotyrosine, ou qu'elle provienne, secondairement, de la deshalogénéation partielle de la thyroxine ou de l'une des triiodothyronines. Cette dernière réaction pourrait également avoir lieu, par ailleurs, dans les cellules réceptrices. En fait, l'apparition précoce de la 3:3'-diiodothyronine marquée à un temps de l'expérience où la glande est la plus riche en 3-monoiodotyrosine radioactive nous a fait considérer la première hypothèse comme la plus plausible. L'inactivité de la deshalogénase thyroïdienne sur les deux triiodothyronines corrobore également cette manière de voir, laquelle tend à con-

férent à la 3-monoiodotyrosine un rôle important dans la biosynthèse des hormones thyroïdiennes. Quant à la 3:3'-diiodothyronine plasmatique, son origine nous semble thyroïdienne et non périphérique, en raison du parallélisme des variations du taux de cette hormone dans la glande et dans le sang qui s'est manifesté au cours de nos essais. La formation de la 3:3':5'-triiodothyronine paraît relever d'un mécanisme plus complexe, mais auquel la désioduration partielle de la thyroxine est sans doute étranger. Par contre, l'halogénéation de la 3:3'-diiodothyronine par I_2 conduirait à la formation de la 3:3':5'-triiodothyronine⁴. On peut, dès lors, envisager que ce corps prend naissance soit par condensation d'une molécule de 3-monoiodotyrosine et d'une molécule de 3:5-diiodotyrosine, avec perte de la chaîne d'alanine de celle-ci, soit par ioduration de la 3:3'-diiodothyronine. La coexistence de ces deux processus dans la glande est probable.

RÉSUMÉ

1. La 3:3'-diiodothyronine et la 3:3':5'-triiodothyronine ont été mises en évidence en tant que constituants de la thyroglobuline. Ces deux corps, libérés par l'hydrolyse enzymatique de la protéine, doivent être considérés comme de nouvelles hormones thyroïdiennes.

2. La sécrétion hormonale de la glande est constituée par au moins quatre iodothyronines, appartenant probablement toutes à la série L: la thyroxine, la 3:5:3'-triiodothyronine, la 3:3':5'-triiodothyronine et la 3:3'-diiodothyronine. La présence du dernier de ces corps dans le sérum a été établie.

3. La 3:3'-diiodothyronine, corps d'activité antigénotrope voisine de celle de la thyroxine (dérivé L), a été décelée dans la glande et dans le plasma à des taux pouvant dépasser le quart de celui de la thyroxine. Les deux triiodothyronines sont toujours présentes en quantités beaucoup plus faibles, dans l'organe comme dans le sang.

4. On peut envisager que la biosynthèse de la 3:3'-diiodothyronine s'opère par condensation de deux molécules de 3-monoiodotyrosine. Celle des deux triiodothyronines reposerait sur la même réaction entre une molécule de 3-monoiodotyrosine et une de 3:5-diiodotyrosine. L'ioduration partielle de la 3:3'-diiodothyronine est par ailleurs susceptible de conduire à la 3:3':5'-triiodothyronine. En revanche, il est peu probable que l'un des dérivés incomplètement halogénés (di- ou tri-) puisse se former par désioduration intrathyroïdienne d'un homologue plus riche en iode.

SUMMARY

1. 3:3'-diiodothyronine and 3:3':5'-triiodothyronine have been demonstrated as being constituents of thyroglobulin. These two substances, liberated by the enzymic hydrolysis of the protein, may be considered as new thyroid hormones.

2. The hormone secretion of the gland consists of at least four iodothyronines, all probably belonging to the L series: thyroxine, 3:5:3'-triiodothyronine, 3:3':5'-triiodothyronine and 3:3'-diiodothyronine. The presence of the last of these substances in the serum has been established.

3. 3:3'-diiodothyronine, a substance with antigénotropic activity similar to that of thyroxine (L-derivative), has been detected in the gland and in the plasma in quantities sometimes exceeding a quarter of the thyroxine quantity. The two triiodothyronines are always present in much smaller amounts in the organ than in the blood.

4. One may regard the biosynthesis of the 3:3'-diiodothyronine as being effected by condensation of two molecules of 3-monoiodotyrosine. That of the two triiodothyronines is based on the same reaction between one molecule of 3-monoiodotyrosine and one of 3:5-diiodotyrosine. The partial iodination of the 3:3'-diiodothyronine on the other hand may possibly lead to the formation of the 3:3':5'-triiodothyronine. However, it is hardly probable that incomplete halogen derivatives (di- or tri-) can be formed by thyroid deiodination of a homologue richer in iodine.

ZUSAMMENFASSUNG

1. 3,3'-Dijodthyronin und 3,3',5'-Trijodthyronin sind als natürliche Bestandteile des Thyroglobulins charakterisiert worden. Beide Körper, welche durch enzymatische Hydrolyse des Eiweiss-stoffes freigemacht werden, sind als neue Schilddrüsenhormone anzusehen.

2. Die hormonale Ausscheidung der Drüse wird durch mindestens vier Jodthyronine gebildet, die möglicherweise alle der L-Reihe angehören: Thyroxin, 3,5,3'-Trijodthyronin, 3,3',5'-Trijodthyronin, und 3,3'-Dijodthyronin. Die Anwesenheit des letzten dieser Körper im Blutserum ist bewiesen worden.

3. 3,3'-Dijodthyronin, ein Produkt von ähnlicher Antikropf-Wirkung wie Thyroxin (L-Derivat), ist in der Drüse und im Blutplasma nachgewiesen worden und zwar in Mengen, die ein Viertel der Thyroxinmenge übertreffen können. Die beiden Trijodthyronine sind immer, sowohl in der Drüse als im Blute, in viel geringeren Mengen vorhanden.

4. Die Biosynthese des 3,3'-Dijodthyronins durch Kondensation zweier Moleküle von 3-Monojodtyrosin kann angenommen werden. Diejenige der beiden Trijodthyronine könnte man auf eine ähnliche Reaktion zwischen je einem Molekül von Mono- und Dijodtyrosin zurückführen. Ausserdem kann eine teilweise Iodierung des 3,3'-Dijodthyronins zum 3,3',5'-Trijodthyronin führen. Andererseits ist es aber unwahrscheinlich, dass einer der teilweise halogenierten Körper (Di- u. Tri-) durch Schilddrüsen-deshalogenierung eines jod-reicheren Homologen entstehen kann.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. R. HARRINGTON, *Proc. Roy. Soc. B.*, 132 (1944) 223.
- ² J. ROCHE, S. LISSITZKY, R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 220.
- ³ J. ROCHE, M. JUTISZ, S. LISSITZKY, R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 260.
- ⁴ J. ROCHE, R. MICHEL, W. WOLF, *Compt. rend.*, 239 (1954) 597.
- ⁵ J. ROCHE, R. MICHEL, J. NUNEZ, *Bull. soc. chim. biol.*, 37 (1955) 809.
- ⁶ C. H. BOWDEN, N. F. MACLAGAN, J. M. WILKINSON, *Biochem. J.*, 59 (1955) 93.
- ⁷ J. ROCHE, R. MICHEL et J. TATA, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 471.
- ⁸ J. GROSS ET C. P. LEBLOND, *Endocrinology*, 48 (1951) 714.
- ⁹ J. ROCHE, R. MICHEL, W. WOLF, N. ETILING, *Compt. rend. soc. biol.*, 148 (1954) 1738.

Reçu le 15 juillet 1955