

SUR LE MÉTABOLISME DE LA 3:3'-DIIODOTHYRONINE

par

JEAN ROCHE, RAYMOND MICHEL, NICOLE ETLING ET JACQUES NUNEZ

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

La présence de la 3:3'-diiodothyronine dans le corps thyroïde¹ et dans le sang circulant² a été récemment établie. Aussi y avait-il lieu d'entreprendre des recherches sur le métabolisme de doses physiologiques de cette hormone nouvelle, dont l'activité antigoïtrogène est sensiblement égale à celle de la thyroxine³. Le but de notre travail a été d'étudier l'excrétion de constituants radioactifs de l'urine et des fèces après administration de l'hormone marquée, la répartition de celle-ci dans les divers organes et son métabolisme hépatique.

A. MARCHEX DES EXPÉRIENCES ET TECHNIQUES

1. *Préparation de la 3:3'-diiodothyronine marquée*

La 3:3'-diiodothyronine marquée en 3' par ¹³¹I a été préparée par ioduration de la 3-monoiodothyronine⁴. 200 µg de monoiodothyronine dissous dans 200 µl de NH₄OH concentrée ont été additionnés de 100 ml d'une solution alcoolique contenant 127 µg d'¹²⁷I₂, à laquelle on ajoute 1.1 mc ¹³¹I Na sous un volume de 100 µl. Après 1 heure de séjour à la température du laboratoire, la 3:3'-diiodothyronine radioactive est séparée par chromatographie préparative en butanol-dioxane (1:4) saturé d'NH₄OH 2N. Le radioautogramme obtenu permet de repérer la zone correspondant à ce dérivé, que l'on découpe. Après élution par NH₄OH concentrée au demi on évapore à sec sous vide, en atmosphère d'azote ($t < 30^\circ\text{C}$). Le résidu est repris par 2 gouttes de NaOH N, le volume de la solution amené à 2 ml (H₂O) et le pH ajusté à 8. Cette solution renferme 52 µg de 3:3'-diiodothyronine marquée en 3' par 110 µc ¹³¹I. On l'administre directement aux animaux.

2. *Etude du métabolisme de la DL-3:3'-diiodothyronine*

Les expériences ont été poursuivies uniformément sur des rats mâles d'environ 200 g, thyroïdectomisés depuis 2 mois, selon des modalités diverses.

(a) Dans le cas où l'on a étudié les éliminations urinaire et fécale, les animaux, répartis par lots de 3, ont été placés dans des cages individuelles permettant la séparation des deux excreta. Ils ont reçu chacun par voie intrapéritonéale 1.15 µg de 3:3'-diiodothyronine (8 µc). L'urine et les fèces ont été recueillies à des intervalles réguliers pendant 94 heures.

La radioactivité de l'urine a été mesurée immédiatement après la récolte, sur une partie aliquote. Les matières fécales ont été séchées et pulvérisées; 1 g de la poudre a été liquéfié par action de 1 ml de NaOH N, chauffage 15 minutes à ébullition, dilution et dessication d'une prise d'essai correspondant à un poids initial connu. La radioactivité a été mesurée sur la plus petite prise d'essai possible, de façon à éviter l'auto-absorption des radiations.

(b) La répartition de la radioactivité dans les divers organes a été étudiée après injection de 1 µg de 3:3'-diiodothyronine (5 µc) par animal. Le cœur, le foie, le cerveau, le cervelet, les reins, l'intestin et l'estomac, le sang prélevé sur héparine (centrifugation des globules et séparation du plasma) des sujets d'un même lot ont été rassemblés. La radioactivité a été mesurée sur une partie aliquote du sang et sur 1 g des organes liquéfiés par action de 1 ml de NaON N et chauffage de 15 minutes à ébullition, dilution et dessication d'une prise d'essai correspondant à un poids initial connu, sauf dans le cas des surrénales, de la trachée, de l'hypophyse et des glandes salivaires où la totalité de l'organe a été mise en oeuvre.

(c) L'étude de l'élimination biliaire a été poursuivie sur des lots de 3 rats thyroïdectomisés

deux mois auparavant et maintenus sous anesthésie au penthotal. Après cathétérisme du canal cholédoque au moyen d'un tube de polythène à demeure, les animaux ont reçu individuellement par voie sous-cutanée 5 μg de 3:3'-diiodothyronine (7.5 μc). La bile a été recueillie à des intervalles réguliers, toutes les heures au cours des 8 premières, puis à la 24ème.

3. Séparation chromatographique des constituants iodés des excreta

Les constituants radioactifs de la bile et de l'urine ont été analysés par chromatographie et repérés soit par autoradiographie, soit par mesure et enregistrement automatique de la radioactivité des chromatogrammes obtenus sur papier Whatman No. 1 en présence de divers solvants.

La chromatographie monodimensionnelle a été opérée par voie ascendante en présence de collidine aqueuse (100:35.5) en atmosphère saturée d' NH_3 , et en présence de méthanol-acétate d'ammonium 0.2 M (1:2.5) à $\text{pH} = 6.2$ et $\text{t}^\circ = +4^\circ\text{C}$, ou par voie descendante en présence du mélange de *n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17), de *n*-butanol-dioxane (1:4) saturé d' NH_4OH 2*N*. Des essais bidimensionnels, dont le détail sera donné plus bas, ont été réalisés dans certains cas.

B. RÉSULTATS

1. Elimination urinaire et fécale des constituants radioactifs

L'excrétion urinaire et fécale d' ^{131}I exprimée en pour cent de la radioactivité est illustrée par la Fig. 1.

Le pourcentage de radioactivité retrouvé dans l'urine est très élevé. Il atteint 34% au cours des premières 30 heures et la vitesse de l'élimination se ralentit ensuite. Une partie relativement faible de la radioactivité injectée, plus petite encore qu'avec les deux autres hormones est retrouvée dans les fèces. Les radiochromatogrammes, (*n*-butanol-acide acétique-eau; 78:17:5) obtenus à partir de l'urine, ont permis de constater que la presque totalité de la radioactivité est localisée sur une tache présentant le R_F des iodures (0.20) et une très faible portion sur une autre de R_F 0.85. En outre, nous avons obtenu par élution de la zone radioactive et de la zone correspondant aux iodothyronines suivie d'une nouvelle chromatographie en *n*-butanol dioxane saturé d'ammoniaque 2*N* (4:1), la confirmation de l'existence de traces d'un corps de cette série.

2. Répartition entre divers organes

Le taux élevé et la rapidité d'élimination urinaire de l'iode hormonal, nous ont amenés à étudier sa répartition entre les organes dans des temps très courts, soit 30 minutes, 1 heure, et 3 heures après l'injection de 1.15 μg de 3:3'-diiodothyronine. Les résultats obtenus, rassemblés dans le Tableau I, ont été exprimés à la fois en pour cent de la radioactivité par gramme d'organe et dans l'organe entier.

L'examen de la première colonne montre que le foie et le rein et, à un degré moindre, l'estomac et l'intestin sont les plus radioactifs. La concentration de la radioactivité par ce dernier organe est vraisemblablement due à la lenteur de la résorption à son niveau. La répartition de la radioactivité par gramme de poids est à peu près identique

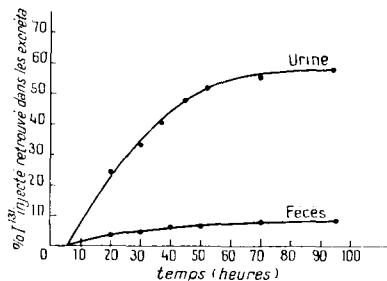


Fig. 1. Excrétion d' ^{131}I par l'urine et les fèces de rats thyroïdectomisés après injection intrapéritonéale d'1.15 μg de *D,L*-3:3'-diiodothyronine marquée en ^{3}I . Abscisses: temps (heures) après l'injection. Ordonnées: % ^{131}I injecté retrouvé dans l'urine ou les fèces.

TABLEAU I

RÉPARTITION DE LA RADIOACTIVITÉ INJECTÉE AVEC LA 3:3'-DIODOTHYRONINE MARQUÉE EN 3' (1.15 μ g) ENTRE LES DIVERS ORGANES DU RAT THYROIDECTOMISÉ

Organes	% d'I injecté retrouvé					
	en 30 min		1 heure		3 heures	
	dans l'organe total	μ g 100/g d'organe	dans l'organe total	μ g 100/g d'organe	dans l'organe total	μ g 100/g d'organe
Capsules surrénales	0.05	0.52	0.066	0.66	0.17	—
Cerveau	0.00	0.00	0.1	0.034	0.045	0.044
Cervelet	0.00	0.00	0.037	—	0.031	—
Cœur	0.017	0.12	0.24	0.12	0.2	0.21
Estomac	0.9	0.41	2.2	0.74	0.39	0.12
Foie	5.2	0.3	4.4	0.19	2.2	0.097
Gl. salivaires	—	0.07	—	—	0.06	—
Hypophyse	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Intestin	10.2	0.5	—	0.26	—	0.32
Muscle	—	0.045	—	0.075	—	0.055
Reins	0.77	0.24	1.15	0.23	0.75	0.74
Plasma	—	0.18	—	0.20	—	0.18
Trachée	0.13	0.13	0.50	—	—	—

dans de nombreux organes; elle traduit, néanmoins une fixation importante de l'hormone par les capsules surrénales. Il est remarquable que, contrairement à ce que l'on observe avec la thyroxine et la L-3:5:3'-triiodothyronine, le foie ne concentre que peu la radioactivité, pour des raisons que nous discuterons plus bas. Le taux maximum en ^{131}I est observé, dans la plupart des cas, une heure après l'injection, sauf dans le foie et l'intestin où il est atteint en 30 minutes. La radioactivité du plasma est faible, ce qui permet de penser que l'hormone est très rapidement utilisée par les organes.

3. Elimination biliaire de la 3:3'-diiodothyronine et de ses dérivés

1) Cinétique de l'excration biliaire d' ^{131}I . La taux de la radioactivité du foie décroît rapidement après une demi-heure; nous nous sommes proposés de rechercher si cet organe excrétrait ou métabolisait la 3:3'-diiodothyronine selon les mêmes modalités que les autres hormones thyroïdiennes. La bile a été recueillie comme nous l'avions indiqué plus haut et les résultats de la mesure de la radioactivité ont permis d'établir la Fig. 2.

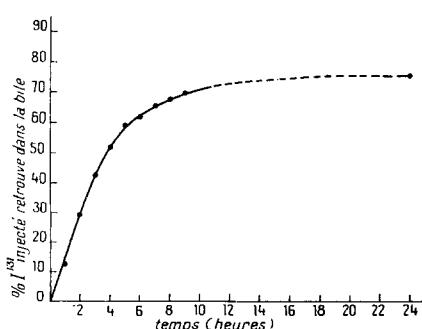


Fig. 2. Élimination biliaire d' ^{131}I chez un rat thyroidectomisé après injection sous-cutanée de 5 μg de DL-3:3'-diiodothyronine marquée en 3':3'. Abscisses: temps après l'injection (heures). Ordonnées: % ^{131}I injecté retrouvé dans la bile.

Le pourcentage d' ^{131}I retrouvé dans la bile est particulièrement élevé; il atteint 70% au cours des 9 premières heures. La bile ne renferme que 6% de la radioactivité dans les 15 heures suivantes. La comparaison entre l'élimination biliaire de la 3:3'-diiodothyronine et celle de la triiodothyronine et de la thyroxine indique que la vitesse et le taux d'élimination sont du même ordre.

2) Séparation et identification des constituants radioactifs de la bile. Des radioautogrammes monodimensionnels ont été obtenus

à partir des chromatogrammes (collidine aqueuse, méthanol-acétate d'ammonium) des échantillons de bile recueillis toutes les heures. Ils présentent un aspect caractéristique reproduit sur la Fig. 3 (A).

Plusieurs bandes (A', B', b', P) s'individualisent sur les autogrammes monodimensionnels. Leurs R_F en collidine aqueuse et en atmosphère saturée d' NH_4OH sont les suivants: corps A' = 0.15; corps b' = 0.31; corps B' = 0.39; corps P = 0.63.

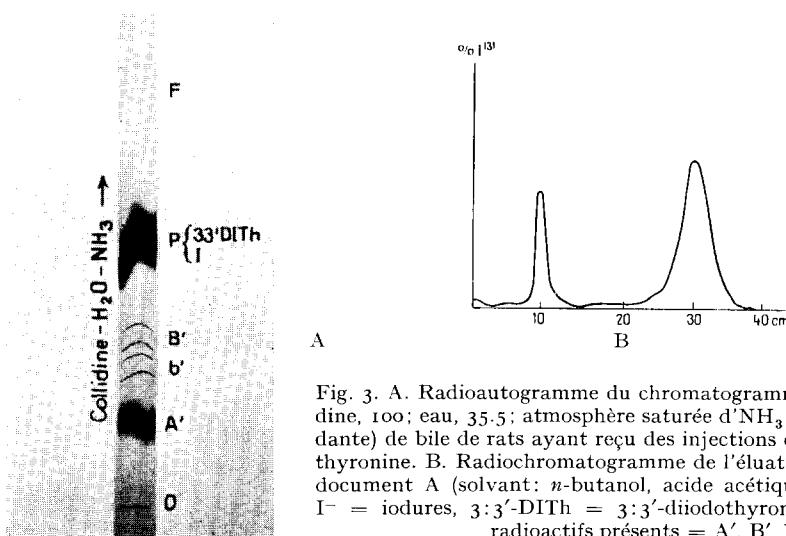


Fig. 3. A. Radioautogramme du chromatogramme (solvant: collidine, 100; eau, 35.5; atmosphère saturée d' NH_3 ; migration ascendante) de bile de rats ayant reçu des injections de DL-3:3'-diiodothyronine. B. Radiochromatogramme de l'éluat de la bande P du document A (solvant: *n*-butanol, acide acétique, eau (78:5:17) I⁻ = iodures, 3:3'-DITH = 3:3'-diiodothyronine, autres corps radioactifs présents = A', B', b'.

Les bandes les plus intenses sont A' et P. La bande P occupe la position de la 3:3'-diiodothyronine ($R_F = 0.63$) et des iodures ($R_F = 0.66$) que le solvant employé ne sépare pas. Les radiochromatogrammes des échantillons de bile recueillis successivement, effectués dans les mêmes conditions permettent d'obtenir des résultats très voisins, sinon identiques, à partir desquels on a déterminé les pourcentages d'A' et de P par rapport à la radioactivité totale déposée. Celui d'A' atteint de 4 à 5% pour les 8 premières heures et devient très faible par la suite. Un radiochromatogramme monodimensionnel (solvant: *n*-butanol acétique) établi sur l'éluat de la bande P a permis de constater que celle-ci est constituée surtout par de la 3:3'-diiodothyronine, qu'accompagne une petite quantité d'iodures. La Fig. 3(B) illustre le dédoublement de P en ses deux constituants.

Afin de préciser la nature du corps A', nous en avons préparé de petites quantités par élution. L'analogie éventuelle de l'excrétion biliaire de glycuroconjugués de la thyroxine⁵ et de la triiodothyronine⁶ et de celle d'un dérivé de la 3:3'-diiodothyronine de R_F voisin a suggéré l'hypothèse d'une combinaison de cette nature.

15 ml de bile ont été soumis dans ce but à l'analyse chromatographique en collidine aqueuse. Les corps A' et P, repérés par radiochromatographie des bandes marginales, ont été élus par NH_4OH au 1/5 et les éluats concentrés sous vide en atmosphère d'azote à une température inférieure à 30°C. Ils renfermaient chacun une substance radioactive correspondant respectivement aux bandes A' et P dans ce solvant. La chromatographie en méthanol-acétate d'ammonium et en *n*-butanol-acide acétique de la bande P a permis de préciser qu'il s'agissait bien d'un mélange de corps, dont la

$3:3'$ -diiodothyronine renferme 70% d' ^{131}I injecté et les iodures 13%. L'éluat de la bande A' a été soumis à l'action de la β -glycuronidase d'*E. coli*.

L'analyse radiochromatographique mise en oeuvre dans les mêmes conditions qu'au cours de nos recherches antérieures⁶ après action de l'enzyme permet de constater la disparition et l'apparition de la $3:3'$ -diiodothyronine.

Le corps A' se comporte donc comme un glycuroconjugué de la $3:3'$ -diiodothyronine.

La recherche des corps présents en quantité moindre n'a pas été poursuivie. L'excrétion biliaire des acides tétra- et triiodopyruvique après administration de thyroxine et de triiodothyronine suggère l'hypothèse que le corps b' pourrait être le cétoacide dérivé de la $3:3'$ -diiodothyronine.

C. DISCUSSION DES RÉSULTATS

Les faits observés méritent d'être brièvement discutés et comparés à ceux établis antérieurement dans le même domaine sur le métabolisme des autres hormones thyroïdiennes.

Administrée à dose physiologique la DL- $3:3'$ -diiodothyronine se localise temporairement surtout dans diverses régions du tractus digestif et dans le foie, comme les autres hormones thyroïdiennes. Elle n'y demeure qu'un temps, encore plus bref que ces dernières, et paraît uniquement les traverser au cours d'une circulation entérohépatique (excrétion biliaire de l'excès sanguin et résorption intestinale progressive). L'existence de celle-ci est illustrée par la comparaison des taux de l'excrétion d' ^{131}I par la bile et par l'urine aux divers temps de nos expériences. En 4 heures, environ 70% d'une dose physiologique de l'hormone traversent le foie et sont retrouvés, en grande partie à l'état de iodothyronine dans la bile; pendant la même période, le rein excrète, surtout à l'état d'iodures minéraux, moins de 10% d' ^{131}I administré. La quantité d'iode éliminée en 9 heures par la bile n'est retrouvée dans l'urine qu'en 48 heures, après dégradation de l'hormone. Les modalités de l'excrétion biliaire de la DL- $3:3'$ -diiodothyronine et de ses dérivés sont voisines de celles observées après l'injection de ses homologues tri- et tétraiodé, à ceci près que la glycuroconjugaion et la dégradation hépatique de la première (formation d'iodures et d'acide diiodothyropuruvique) sont moins intenses. La plus grande diffusibilité de la DL- $3:3'$ -diiodothyronine, dont la dégradation paraît calquée sur celle de ses homologues plus riches en halogènes, est sans doute à l'origine de ces différences. Dans le cas de la thyroxine, l'excrétion biliaire et la dégradation hépatique de l'isomère D sont beaucoup plus lentes et moins

TABLEAU II

COMPARAISON DE L'ÉLIMINATION URINAIRE ET FÉCALE D' ^{131}I APRÈS INJECTION DE DOSES PHYSIOLOGIQUES DE DL- $3:3'$ -DIIODOTHYRONINE, DE DL- $3:5:3'$ -TRIIODOTHYRONINE⁸ ET DE DL-THYROXINE⁹ À DES RATS THYROIDECTOMISÉS (% D' ^{131}I INJECTÉ)

Hormone injectée	% ^{131}I éliminé			
	en 24 heures		en 50 heures	
	urine	féces	urine	féces
DL- $3:3'$ -diiodothyronine	30	3	50	7.5
L- $3:5:3'$ -triiodothyronine	15	7	22	12
L-thyroxine	9	4	15	17

intenses que celles du dérivé (L)⁷. Aussi est-il probable que nos résultats obtenus sur la DL-3:3'-diiodothyronine traduisent des processus moins rapides que ceux ne portant que sur l'isomère L naturel.

Il découle de nos observations que l'utilisation de l'hormone diiodée doit s'opérer préférentiellement à celle des autres produits de la sécrétion thyroïdienne circulant avec elle. Le rôle de la L-3:3'-diiodothyronine apparaît, de ce fait, comme important. Ce corps étant régulièrement présent dans le sang en quantité assez grande^{1,2} et son activité biologique étant à peine inférieure à celle de la L-thyroxine³.

RÉSUMÉ

1. Après administration de doses physiologiques (1 µg) de DL-3:3'-diiodothyronine marquée en 3' au rat thyroïdectomisé, l'élimination rénale d'¹³¹I est plus rapide et plus intense que celle obtenue après injection de triiodothyronine et de thyroxine. La quasi-totalité de l'iode excrété par le rein l'est sans doute sous forme d'iodures. Le taux de l'élimination fécale est des plus minimes.

2. La répartition de la 3:3'-diiodothyronine marquée dans les divers organes a été étudiée. La radioactivité a été retrouvée à un taux élevé dans le foie et les reins, et à un degré moindre dans l'intestin et l'estomac. Elle n'y est néanmoins retenue que pendant un temps assez bref et paraît traduire une traversée de ces organes par l'hormone plutôt que la concentration de celle-ci en vue de son utilisation par eux.

3. Le taux d'élimination biliaire de la 3:3'-diiodothyronine injectée à dose physiologique et des produits de son métabolisme est très élevé. Le principal constituant de la bile est l'hormone elle-même associée à de petites quantités d'iodures et à un glycuroconjugué. Une circulation entéro-hépatique de la 3:3'-diiodothyronine repose sur son excrétion biliaire et sur sa résorption intestinale, comme dans le cas des autres hormones thyroïdiennes.

4. Le métabolisme de la 3:3'-diiodothyronine présente de grandes analogies avec celui de la thyroxine et de la 3:5:3'-triiodothyronine. Toutefois, la première paraît être utilisée par les tissus à une vitesse très sensiblement plus grande, sans doute en raison de sa plus grande diffusibilité, ce qui lui confère un intérêt physiologique particulier.

SUMMARY

1. After administration to a thyroidectomised rat of physiological amounts (1 µg) of DL-3:3'-diiodothyronine marked at position 3', renal elimination of ¹³¹I is more rapid and copious than that obtained after injection of triiodothyronine or thyroxine. Almost all the iodine excreted by the kidney is undoubtedly in the form of iodides. The proportion in the faecal elimination is very minute.

2. The distribution of the marked 3:3'-diiodothyronine in the various organs has been studied. The radioactivity has been found in increased proportion in the liver and the kidneys, and to a lesser degree in the intestine and stomach. It is retained there however only for a short time and appears to show the transit of the hormone through the organs rather than its concentration there in connection with their use of it.

3. The proportion of bile elimination of the 3:3'-diiodothyronine injected in physiological amount and of the products of its metabolism is very high. The chief constituent of the bile is the hormone itself associated with small quantities of iodides and with a glycuro-conjugated substance. An enterohepatic circulation of the 3:3'-diiodothyronine depends on its bile excretion and on its intestinal resorption, as in the case of other thyroid hormones.

4. The metabolism of 3:3'-diiodothyronine shows important similarities to that of thyroxine and 3:5:3'-triiodothyronine. At the same time, the first appears to be used by the tissues with considerably less rapidity, doubtless because of its greater diffusibility, which confers on it a special physiological interest.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Nieren-Ausscheidung des ¹³¹I ist schneller und intensiver nach Verabreichung physiologischer Dosen (1 µg) von in Stellung 3' markiertem DL-3:3'-Dijodthyronin als nach Einspritzung von 3,5,3'-Trijodthyronin und Thyroxin. Fast das gesamte Jod das durch die Nieren ausgeschieden

Bibliographie p. 496.

wird, ist sehr wahrscheinlich als anorganisches Jod anwesend. Die Mengen der fäkalen Ausscheidung sind absolut minimal.

2. Die Verteilung des markierten 3,3'-Dijodthyronins in den verschiedenen Organen ist studiert worden. Die Radioaktivität wurde in grossen Mengen in der Leber und in den Nieren wiedergefunden, und in geringerem Masse im Darm und im Magen. Das Hormon wird dort aber nur ziemlich kurze Zeit festgehalten, was eher auf einen Durchgang durch diese Organe als auf eine Anhäufung zu etwaigem Verbrauch hinweist.

3. Die Gallen-Ausscheidung des in physiologischen Dosen eingespritzten 3,3'-Dijodthyronins, sowie diejenige der Produkte seines Metabolismus ist sehr hoch. Der wichtigste Bestandteil der Galle ist das Hormon selber, in Gesellschaft kleinerer Mengen von Iodiden und eines glycuromonkonjugierten Körpers. Die entero-hepatische Zirkulation des 3,3'-Dijodthyronins ist, wie bei den anderen Schilddrüsenhormonen, auf Gallen-Ausscheidung und Darm-Wiederaufnahme zurückzuführen.

4. Der Metabolismus des 3,3'-Dijodthyronins zeigt grosse Ähnlichkeiten mit dem des Thyroxins und des 3,5,3'-Trijodthyronins. Aber das Erstere scheint, wahrscheinlich dank seiner grösseren Diffusibilität, mit einer erheblich schnelleren Geschwindigkeit von den Geweben benutzt zu werden, was ihm ein spezielles physiologisches Interesse verleiht.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. ROCHE, R. MICHEL, W. WOLF ET J. NUNEZ, *Compt. rend.*, 240 (1955) 921.
- ² J. ROCHE, R. MICHEL, J. NUNEZ ET W. WOLF, *Compt. rend. soc. biol.*, 149 (1955) 884.
- ³ J. ROCHE, R. MICHEL, W. WOLF ET N. ETLING, *Compt. rend. soc. biol.*, 148 (1954) 1738.
- ⁴ J. ROCHE, R. MICHEL ET W. WOLF, *Compt. rend.*, 239 (1954) 597.
- ⁵ A. TAUROG, F. N. BRIGGS ET I. L. CHAIKOFF, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 29 et 194 (1952) 655.
- ⁶ J. ROCHE, R. MICHEL ET J. TATA, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 500.
- ⁷ J. ROCHE, R. MICHEL ET J. TATA, *Compt. rend. soc. biol.*, 148 (1954) 1545.
- ⁸ J. ROCHE, S. LISSITZKY ET R. MICHEL, *Compt. rend. soc. biol.*, 146 (1952) 1474.
- ⁹ J. ROCHE, R. MICHEL ET J. TATA, *Compt. rend. soc. biol.*, 146 (1952) 1003.

Reçu le 15 juillet 1955