Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]
Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève
Band: 14 (1961)
Heft: 2

Artikel: Contribution à l'étude du métabolisme des androgènes chez le cobaye
Autor: Charollais, E.J. / Jayle, M.F. / Ponse, K.
Kapitel: I: Méthodes de dosage et d'identification des 17-cétostéroïdes urinaires
DOI: https://doi.org/10.5169/seals-739571

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 16.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

analyse du métabolisme de certains précurseurs des 17-cétostéroïdes urinaires chez cet animal.

L'utilisation d'une microméthode de dosage des 17-cétostéroïdes, d'une extraction butylique et d'une hydrolyse enzymatique de leurs conjugués urinaires, nous a permis de mener à bien cette tâche et de préciser les rôles respectifs de l'ovaire et de la surrénale lors de la masculinisation.

I. MÉTHODES DE DOSAGE ET D'IDENTIFICATION DES 17-CÉTOSTÉROÏDES URINAIRES

Techniques de dosage — Mise au point

A. *Réaction de Zimmermann.*

Nous avons essentiellement utilisé la réaction de Zimmermann comme réaction colorée permettant de doser par spectrophotométrie dans le visible les 17-CS urinaires. Notre technique de base repose sur une modification de la méthode originale de Klendshoj et al. (1953), associant l'emploi du monométhylglycol pour préparer le méta-dinitrobenzène et pour la dilution finale, et de la potasse en solution méthylique anhydre. Cette méthode a été décrite dans le détail (Charollais, 1955), nous n'y reviendrons pas, si ce n'est pour souligner le fait que tous les solvants et réactifs doivent être extrêmement purs. Nous avons toujours utilisé avec succès la potasse et le méthanol *puriss. pro analysi* ainsi que le méta-dinitrobenzène Merck spécialement préparé pour le dosage des 17-CS. Quant au mono-méthylglycol, il contient toujours de faibles quantités de substances cétoniques donnant la réaction de Zimmermann. Il est nécessaire de le traiter de la façon suivante:

Dans un ballon rodé de 500 ml avec réfrigérant à reflux, dissoudre 5 g de 2,4 dinitro-phénylhydrazine dans 250 ml de mono-méthylglycol à purifier, ajouter 5 ml d'HCl conc. et faire bouillir à reflux pendant dix minutes. Après refroidissement, distiller sous vide en éliminant soigneusement les fractions de tête et de queue. Il reste ainsi environ 200 ml de mono-méthylglycol, distillant entre 25 et 30° suivant la pression et convenant parfaitement aux exigences de la réaction de Zimmermann.

B. *Résultats obtenus à partir de stéroïdes purs.*

Il est intéressant de voir comment vont se comporter les principaux 17-CS vis-à-vis de la réaction de Zimmermann-Klendshoj. Nous examinerons tout d'abord les 11-desoxy-cétostéroïdes puis les 11-oxy-cétostéroïdes.

TABLEAU 1.

Densité optique mesurée en fonction de la longueur d'onde pour différents 17-cétostéroïdes (20 μg de stéroïde, cuve de 1 cm).

17-CS	λ maximum	D. O. maximum absolue	D. O. Allen	Extinction molécul. maximum*
DHA	500-505 mμ	0,153	0,0250	6640
A	510	0,153	0,0240	6710
E	505	0,159	0,0355	6960
éA	505	0,144	0,0260	6310
Δ^4-androstène, 3,17-dione	505	0,215	0,0260	9280
11-OHE	510	0,193	0,0270	9110
11-OHA	510	0,143	0,0195	6800
11-COE	510-520	0,301	0,0555	14210
11-COA	510	0,439	0,0755	20700

* Extinction moléculaire maximum = $E_{mol.} = \frac{D.\ O.\ max.}{l \times c}$.

l = longueur de la cuve en cm, c = concentration en mole/litre.

Parmi les 11-desoxy, nous avons effectué les courbes d'absorption avec: la déhydroépiandrostérone (DHA), l'androstérone (A), l'étiocholanolone (E), l'épiandrostérone (éA) et la Δ^4-androstène-3, 17-dione (tableau 1). Ces résultats permettent de constater, d'une part que le maximum d'absorption se situe à 505-510 mμ, d'autre part que les densités optiques absolues sont équivalentes pour les quatre premiers, à savoir déhydro-épiandrostérone, androstérone, étiocholanolone et épi-androstérone.

Cependant, il est à remarquer que l'étiocholanolone a une courbe d'absorption qui sans être plus élevée, est moins étalée, si bien que la valeur obtenue par l'équation correctrice d'Allen est plus élevée. Au contraire, la Δ^4-androsténedione, qui est plus chromogène que les quatre autres, possède la même densité optique corrigée par suite d'un plus grand étalement de sa courbe.

Parmi les 11-oxy, nous avons étudié: la 11β-hydroxy-étiocholanolone (11-OHE), la 11β-hydroxy-androstérone (11-OHA), la 11-céto-étiocholanolone (11-COE) et la 11-céto-androstérone (11-COA) (tableau 1). Comme il fallait s'y attendre, les 17-CS possédant deux fois un groupe méthylène activé par une fonction cétonique sont plus chromogènes que ceux qui n'en possèdent qu'une. Il y a même une relation de proportionnalité. En conséquence, les 11-céto sont plus chromogènes que les 11-oxy correspondants. Cependant, la 11-hydroxy-étiocholanolone est plus chromogène que la 11-hydroxy-androstérone, cette dernière correspondant à un 11-desoxy (type androstérone). Il faut également noter que les stéroïdes possédant deux fonctions cétoniques en 11 et 17 ont un maximum d'absorption légèrement déplacé vers les plus grandes longueurs d'ondes (510-520 mμ). Si maintenant nous comparons la courbe d'absorption d'un extrait d'urine de cobaye préparé selon les méthodes décrites plus loin, nous constatons une parfaite similitude avec la courbe d'absorption d'un 17-CS oxygéné en 11.

Nous avons ainsi une méthode sensible, qui permet d'estimer à partir de 5 μg les 11-désoxy-17-CS présents dans les urines de cobayes, ou même 2 à 3 μg de dicétostéroïdes (11, 17). Des centaines d'étalonnages nous ont montré la parfaite reproductibilité de la méthode.

TABLEAU 2.

Densité optique à 505 mμ pour différents 3-cétostéroïdes.
Maximum d'absorption à 510-515 mμ (20 μg de stéroïde, cuve de 1 cm).

Stéroïdes	D. O. absolue	D. O. Allen
Testostérone	0,078	0,0035
Δ^4-androstène, 3-céto, 17α-ol	0,050	0,0035
Androstane, 3-céto, 17β-ol	0,068	0,0020
Etiocholane 3-céto, 17β-ol	0,033	0,0025

Nous venons de voir qu'une fonction cétonique en position 11 réagissait comme celle en 17. Il n'y a donc pas de spécificité pour l'une ou l'autre position. Qu'en est-il de la fonction cétonique en position 3 ? Il est curieux de constater qu'elle réagit peu ou même pas du tout. Nous avons déjà vu que la Δ^4-androstène-dione (tableau 1) avait un pouvoir chromogène un peu plus élevé que les autres 11-désoxy-stéroïdes étudiés. Cependant, la coloration ne correspond pas à deux fonctions cétoniques, il n'y a pas de

proportionnalité. La testostérone, la Δ^4-androstène-3-céto-17αol, l'androstane-3-céto-17βol et l'étiocholane-3-céto-17βol ne fournissent pratiquement aucune coloration avec le réactif de Zimmermann (tableau 2). On peut donc affirmer que le groupe méthylène activé par la fonction cétonique en 3 n'interfère pratiquement pas avec les fonctions de 11 et 17.

Nous n'avions malheureusement pas à notre disposition de stéroïdes possédant des fonctions cétoniques en d'autres positions et spécialement en 20. Il ne nous a donc pas été possible d'examiner en détail la spécificité de cette réaction.

C. *Critique de la méthode.*

Résumons d'abord la méthode utilisée et comparons-la avec la technique originale de KLENDSHOJ.

Les extraits secs, contenant 0 à 50 μg de 17-CS, sont additionnés de 0,4 ml de m-dinitrobenzène à 1 p. 100 dans le monométhylglycol, on agite bien afin de faciliter la dissolution, puis on ajoute 0,2 ml de potasse 3N dans le méthanol absolu (préparée et centrifugée immédiatement avant l'emploi). On développe la coloration à l'obscurité à 45° pendant exactement 45 minutes. Après refroidissement à la glace, le mélange coloré est dilué avec 4 ml de mono-méthylglycol. La lecture est effectuée dans des cuves de 1 cm à 505 mμ. La coloration est stable pendant 45 à 60 minutes si l'on a soin de conserver les tubes dans la glace fondante.

On voit donc que la différence fondamentale entre la méthode originale et notre modification réside dans la concentration de la potasse. En effet, nous n'utilisons que 0,6 millimole de potasse par échantillon à doser, alors que KLENDSHOJ en utilise 1,2 millimole dans les mêmes conditions. Cet excès de potasse diminue la stabilité de la coloration et fournit des « blancs » beaucoup trop élevés. De plus, l'emploi d'un thermostat à 45° pour développer la coloration, permet de travailler plus rapidement et dans des conditions beaucoup plus reproductibles.

Les constatations précédentes montrent qu'il est impossible de s'attendre à des résultats d'une haute précision, du fait que les extraits urinaires sont des mélanges complexes de stéroïdes dont les pouvoirs chromogènes sont différents. Il suffit qu'un stéroïde fortement chromogène ait une concentration urinaire légèrement accrue pour que le dosage soit fortement surestimé.

Comme nous le verrons plus loin, les urines de cobayes normaux contiennent principalement des 17-CS oxygénés en 11 et peu de 11-desoxy-

stéroïdes. Il est donc évident que tous les chiffres que nous obtiendrons seront plus élevés que le contenu réel en 17-CS de l'extrait. De plus, lors des traitements effectués sur ces animaux, une faible augmentation d'un 11,17-dicétostéroïde se traduira par une forte élévation du dosage global, inversement l'apparition d'étiocholanolone, d'épiandrostérone, de déhydroépiandrostérone ou d'androstérone, sera beaucoup plus discrète. Le dosage en lui-même n'est donc pas un critère suffisant, il n'est qu'un renseignement préliminaire. Il est indispensable de connaître la composition, aussi exacte que possible, du mélange, pour en tirer une conclusion valable.

D. *Essai d'application de la méthode au dosage des 17-CS conjugués.*

Afin de comparer le pouvoir chromogène des 17-CS libres et celui de leurs conjugués, nous avons effectué la réaction de Zimmermann précédemment décrite sur des échantillons de sulfates de 17-CS que nous avons préparés selon la méthode de Sobel, Spoerri et Talbot (Sobel et Spoerri, 1941, 1942; Talbot et al., 1943). Compte tenu de l'augmentation de poids moléculaire, on peut dire que la déhydroépiandrostérone, l'épiandrostérone et les sels de sodium des esters sulfuriques correspondants ont approximativement le même pouvoir chromogène (moyenne 97,4% pour le rapport DHA sulfate/DHA et 90,7% pour celui éA sulfate/éA). Quant à l'androstérone, différents essais nous ont montré une coloration plus faible pour le sulfate que pour le stéroïde libre (en moyenne 77,6% pour le rapport A sulfate/A), bien que l'analyse élémentaire ne révèle rien d'anormal.

Nous ne nous sommes pas attaqués à la synthèse de glucuronides, qui aurait dépassé le cadre de ce travail. En revanche, nous avons essayé de purifier des extraits d'urines de cobayes, afin d'obtenir des 17-CS glucuroconjugués et sulfoconjugués plus ou moins purs. Il apparaît que ces extraits sont en général beaucoup plus chromogènes (100 à 150%) qu'après hydrolyse enzymatique. Ceci n'est pas dû à la présence d'acide glucuronique qui ne donne aucune réaction de Zimmermann. Il s'agit certainement de chromogènes n'ayant rien à voir avec les stéroïdes.

Dans la figure 1, on peut comparer les courbes d'absorption d'un extrait des 17-CS conjugués d'un mâle normal et injecté de DHA ou d'androstérone, avec l'étiocholanolone, par exemple. On voit que dans l'urine du cobaye normal, il y a beaucoup de chromogènes qui ont pour effet de déplacer le minimum d'absorption de 420-430 mμ à 460 mμ. Ce déplacement n'apparaît plus lorsque nous supprimons artificiellement ces chromogènes en augmen-

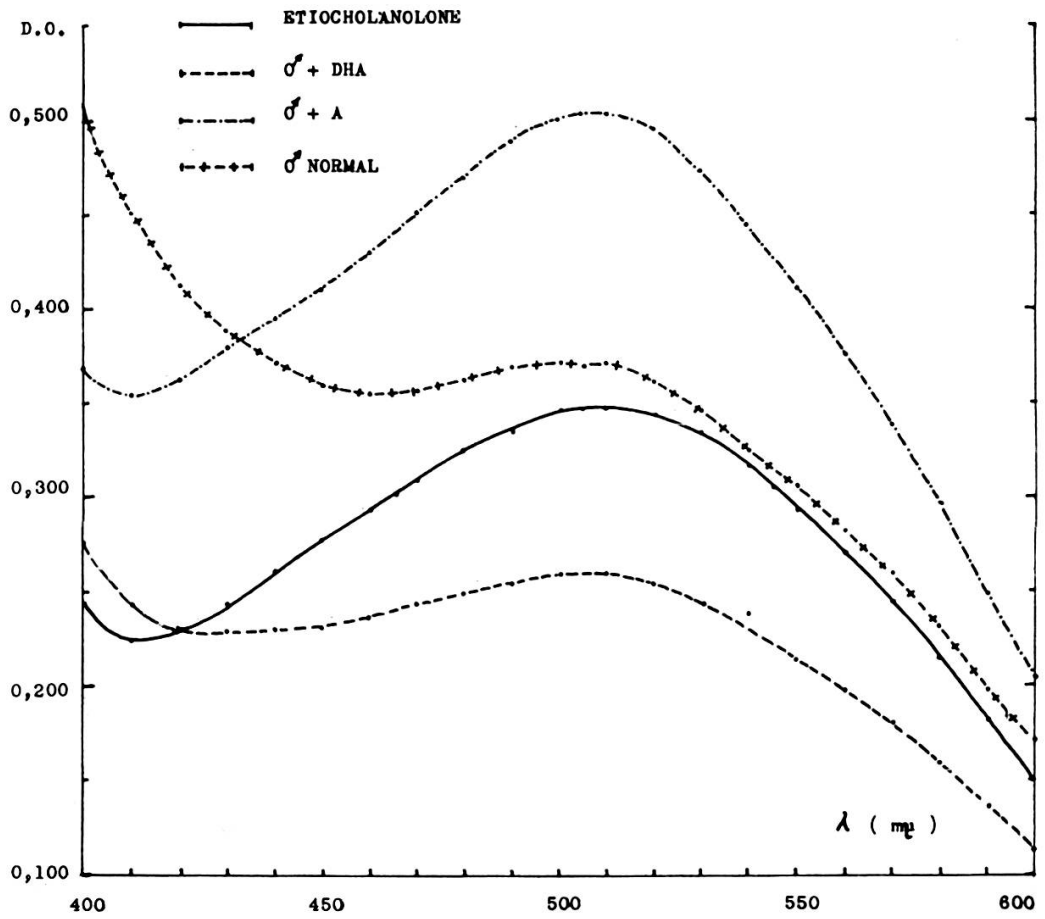

Fig. 1.

Courbes d'absorption comparées de différents extraits urinaires et de l'étiocholanolone.

tant fortement les 17-CS par injections de DHA ou d'androstérone pures. L'application de l'équation d'Allen (1950) élimine également en majeure partie ces artefacts.

Techniques d'extraction et de purification des urines de cobayes: mise au point de méthodes adaptables aux différents cas a étudier

A. *Récolte des urines.*

Il n'y a, dans les urines humaines, comme dans les urines de cobayes récoltées sur un antiseptique, que des traces de 17-CS libres. L'immense majorité des 17-CS est conjuguée; encore ne sait-on pas si ces traces ne sont pas dues à un début de

fermentation bactérienne des urines. Aussi est-il nécessaire de récolter les urines avec un maximum de précaution.

Les cobayes en expérience sont placés dans des cages à métabolisme au moins une semaine avant toute récolte d'urine, car ces animaux s'adaptent difficilement aux changements. Nous avons toujours noté un taux de 17-CS trop faible chez des animaux qui n'étaient pas encore habitués à leur cage et à leur nourriture. Les animaux reposent sur un treillis grossier laissant passer les matières fécales et les débris de nourriture qui sont retenus au-dessous par un treillis plus fin. Enfin, l'urine s'écoule dans un plateau incliné afin d'avoir une faible surface d'évaporation Le plateau est désinfecté en le badigeonnant avec un mélange de 1 ml de Merfen 0,1% et 2 ml de n-butanol. Il faut autant que possible utiliser l'urine immédiatement. Si ce n'est pas possible, on la garde avec un peu de toluène au congélateur (— 5°).

Pendant les expériences, les animaux sont nourris, suivant la saison, avec des betteraves ou de l'herbe fraîche (pissenlits) et du son de blé enrichi en vitamine C (2 g/kg de son). Entre les prises d'urine, les animaux reçoivent en plus de l'herbe fraîche en été, ou du foin en hiver. La récolte des urines a toujours été effectuée pendant exactement *24 heures*; le volume brut et le volume final, après rinçage à l'eau du plateau et du treillis métallique, sont mesurés. Un contrôle régulier de la créatinine nous a montré la parfaite reproductibilité des prélèvements d'urine effectués dans ces conditions. La diurèse est très variable; elle oscille entre 20 et 80 ml par jour pour des cobayes de 300 à 600 g. La créatinine est très constante pour un même animal, elle est directement liée au poids du corps en raison de sa nature métabolique. On en trouve 10 à 15 mg/24 heures pour des cobayes de 300 à 600 g; elle peut atteindre 20 à 25 mg/24 heures pour des cobayes de 800 à 1000 g.

B. *Hydrolyse des conjugués au moyen d'un acide minéral.*

Les 17-CS conjugués (glucuronides ou sulfates) sont facilement scindés en 17-CS libres et acide glucuronique ou sulfurique par les acides minéraux à chaud (acide sulfurique ou acide chlorhydrique). Cette méthode conduit à des artefacts (déshydratation, chloruration, etc.) et détruit en partie certains 17-CS, spécialement les 11-oxygénés. Cette méthode d'hydrolyse (par exemple pH 0,7 à l'ébullition à reflux pendant 10 minutes ou pH 1,0 pendant 30 minutes) suivie d'une extraction des 17-CS libres par un solvant organique (éther, benzène...) s'avère inutilisable pour les urines de cobayes, vu le manque de reproductibilité des résultats.

C. *Hydrolyse enzymatique de l'urine brute.*

L'urine brute, ajustée à pH 5,0 au moyen d'acide acétique glacial, est additionnée de 0,05 ml de suc digestif d'*Helix pomatia* (Henry et al., 1952*a*, 1952*b*; Jarrige et Henry, 1952; Alfsen, 1957) par ml d'urine, soit en moyenne 5000 à 7000 unités par ml de glucuronidase et 10.000 à 15.000 unités par ml de sulfatase. Le suc digestif d'*Helix pomatia* titre en moyenne 100.000 à 150.000 unités Fishman de β-glucuronidase et 200.000 à 300.000 unités de sulfatase par ml de suc brut. On laisse incuber 36 à 40 heures à 37° et extrait à l'éther. Les résultats n'ont pas été satisfaisants, car l'urine de cobaye contient beaucoup trop d'inhibiteurs, l'hydrolyse est très incomplète, cette méthode est également inutilisable.

D. *Principe adopté.*

Utilisation de la méthode de fractionnement de JAYLE-BAULIEU, en l'adaptant aux urines de cobayes. Hydrolyse enzymatique.

La méthode de JAYLE-BAULIEU (JAYLE et al., 1952, 1953) combine deux principes:

1. L'hydrolyse des sulfates labiles, selon BITMAN-COHEN (1951) en tampon acétate à chaud.
2. L'extraction sélective des conjugués, à différents pH par le n-butanol à froid.

Chez l'homme, cette technique met en évidence trois fractions urinaires physiologiquement distinctes:

La fraction A, extractible au butanol en pH alcalin, contenant l'androstérone, l'étiocholanolone et environ 20% de la totalité des 17-CS oxygénés en 11.

La fraction B, renfermant presque exclusivement la déhydroépiandrostérone présente dans l'urine sous forme de sulfate thermolabile en milieu faiblement acide.

La fraction C extractible au butanol en pH acide, constituée par 80% du total des 17-CS oxygénés en 11.

Nous allons voir qu'il en est tout autrement chez le cobaye, cependant nous garderons la nomenclature adoptée par JAYLE, tout en précisant bien que la composition des fractions A, B et C est totalement différente.

BITMAN et COHEN (1951) ont montré que la déhydroépiandrostérone éliminée dans l'urine humaine sous forme de sulfate est hydrolysée à pH 5,5 en tampon acétate molaire par ébullition à reflux pendant 4 à 5 heures. Nous avons adopté cette technique et opérons de la façon suivante:

a) *Fraction B.*

Les urines, prélevées quantitativement pendant exactement 24 heures, sont mesurées après rinçage des plateaux et treillis avec de l'eau (70 à 100 ml en moyenne). On filtre sous vide sur un filtre rapide. Suivant le volume on prélève 50 ou 75 ml de façon à utiliser la presque totalité des 24 heures. Cette prise est ajustée à pH 5,5 au moyen d'acide acétique glacial, ce qui permet la dissolution de tous les constituants généralement insolubles dans l'urine normale (carbonates, phosphates...) qui est très alcaline (pH 8 à 9,7). On y ajoute un demi-volume de tampon molaire d'acétate de sodium/acide acétique à pH 5,5 et on porte à l'ébullition à reflux pendant 4 heures. Le pH augmente légèrement (6,0 à 6,9). Après refroidissement, les stéroïdes libérés de leur conjugaison sont extraits deux fois à l'éther. Les extraits éthérés réunis sont lavés à la soude puis à l'eau afin d'éliminer les

substances acides et phénoliques (œstrogènes). Après évaporation de l'éther au bain-marie, on obtient la fraction B neutre prête à être dosée.

Voici les quantités utilisées:

Pour 50 ml d'urine + 25 ml de tampon acétate:

première extraction à l'éther avec 125 ml (1.7 volume);
deuxième extraction à l'éther avec 60 ml (0,8 volume).

Extraits éthérés réunis (185 ml) lavés deux fois avec chaque fois 35 ml de soude N, puis deux fois avec chaque fois 35 ml d'eau distillée.

L'extraction et les lavages se font dans des colonnes verticales (fig. 2) munies d'un robinet à la partie inférieure et à la partie supérieure d'un entonnoir à tubulure capillaire. On introduit l'éther dans la colonne, puis dans l'entonnoir l'urine qui s'écoule sous forme d'un filet continu et se pulvérise en fines goutelettes dans l'éther. Une fois l'urine décantée dans la colonne, on la repasse par l'entonnoir et ainsi de suite. On fait en tout quatre à cinq passages. Toutes nos extractions ont été effectuées selon ce système.

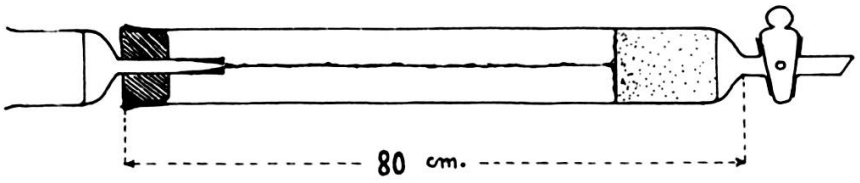

Fig. 2.

Colonne utilisée pour l'extraction des 17-céto-stéroïdes.

b) *Fraction A.*

L'urine (+ tampon) exempte de sa fraction B est additionnée de carbonate de sodium en poudre, jusqu'à concentration de 6,7%, de façon à obtenir un pH stable, très voisin de 11. Si on ne veut pas modifier le coefficient de partage lors des extractions ultérieures, il est nécessaire d'éliminer l'éther résiduel de l'extraction précédente sous un léger vide. On extrait deux fois dans les colonnes verticales au n-butanol. Les extraits butyliques réunis sont lavés avec une solution de carbonate de sodium, puis à l'eau. Enfin, après avoir laissé décanter une nuit, le butanol est évaporé à sec, sous vide, au moyen de l'évaporateur rotatif de Craig, à une température inférieure à 50°. Le résidu séché complètement sous un courant d'air constitue la fraction A conjuguée qui sera hydrolysée par les enzymes du suc digestif d'*Helix pomatia.*

Voici les quantités utilisées:

Pour 50 ml d'urine + 25 ml de tampon acétate (exempts de la fraction B), + 5 g de carbonate de sodium:

première extraction avec 75 ml de n-butanol (1 volume);
deuxième extraction avec 37,5 ml de n-butanol (0,5 volume).

Extraits butyliques réunis (112,5 ml) lavés une fois avec 45 ml (0.4 volume) de carbonate de sodium 6,7% puis une fois avec 34 ml (0,3 volume) d'eau distillée.

c) *Fraction C.*

L'urine contient encore des 17-CS conjugués constituant la fraction C que l'on peut extraire de deux manières:

1° Soit sous forme libre, par ébullition à reflux pendant 15 à 30 minutes du mélange amené à pH 0,7 ou 1,0 au moyen d'HCl concentré, puis extraction éthérée, lavages à la soude et à l'eau selon les mêmes modalités que pour la fraction B;

2° soit sous forme conjuguée par une double extraction au n-butanol du mélange amené à pH 1,0 (HCl) et lavages à l'eau de l'extrait butylique. On hydrolyse l'extrait évaporé à sec aux enzymes d'escargots, comme pour la fraction A.

Ces deux méthodes ont été utilisées. La première donne de mauvais résultats. Il y a destruction d'une certaine quantité de 17-CS sensibles aux acides à chaud, transformation de certains pigments qui ensuite passent dans l'éther en donnant de fortes colorations, transformation des restes d'alcool butylique (extraction précédente) en dérivés peu volatiles difficiles à éliminer.

La seconde méthode est bien meilleure, cependant vu les pigments urinaires du cobaye, les extraits contiennent souvent des chromogènes parasites.

Voici les modalités:

Pour 90 ml de résidu urinaire (50 ml d'urine + 25 ml de tampon acétate + environ 15 ml HCl concentré ad pH 1,0):

première extraction avec 45 ml de n-butanol (0,5 volume);
deuxième extraction avec 45 ml de n-butanol (0,5 volume).

Extraits butyliques réunis (90 ml) lavés deux fois avec chaque fois 45 ml (0,5 volume) d'eau distillée.

Les extraits butyliques des fractions A et C contiennent des conjugués qu'il faut scinder par hydrolyse enzymatique et purifier avant le dosage.

Les extraits A sont légèrement alcalins, les extraits C acides. On reprend donc les premiers par quelques gouttes d'acide acétique M/10, les seconds par quelques gouttes de soude N, puis on ajoute à chaque extrait 10 ml de tampon acétate 0.02 M pH 5,0. Le pH est vérifié puis ajusté s'il y a lieu à 0,1 unité près. L'hydrolyse se fait dans de petits erlenmeyers de 100 ml en ajoutant 0,5 ml de suc digestif d'*Helix pomatia* brut à chaque extrait, soit une concentration approximative de 5000 à 7500 unités par ml de glucuronidase et 10.000 à 15.000 unités par ml de sulfatase. Après 40 heures à 37°, on extrait à l'éther et lave les extraits à la soude et à l'eau. L'extrait éthéré évaporé à sec au bain-marie fournit les fractions A et C, prêtes à être dosées.

Voici le mode opératoire:

A 10 ml hydrolysé, on ajoute 10 ml d'eau distillée:

première extraction avec 60 ml d'éther (3 volumes);
deuxième extraction avec 30 ml d'éther (1,5 volume).

Extraits éthérés réunis (90 ml), lavés deux fois avec chaque fois 15 ml de soude N, puis deux fois avec chaque fois 15 ml d'eau distillée.

Les extractions se font dans les colonnes verticales, précédemment décrites dont les dimensions sont adaptées au volume à extraire (diamètre 2 à 3 cm, hauteur 80 cm).

Tous les dosages sont effectués selon la microméthode décrite plus haut sur des prises de 10 à 20 μg de 17-CS, correspondant à 10 à 15 ml d'urine pour les fractions B et C et à 5 ml d'urine pour A.

E. *Autre méthode d'extraction pour le dosage des conjugués.*

a) *Fraction AB conjuguée.*

Nous avons vu que l'on pouvait doser les 17-CS conjugués de la même façon que les libres. En nous basant sur cette constatation, nous avons essayé de purifier suffisamment les extraits afin de pouvoir effectuer les dosages directement sur les conjugués, sans passer par l'hydrolyse enzymatique.

Principe: les urines sont d'abord centrifugées 30 minutes à 1500 tours/minute afin d'éliminer les substances insolubles qui favorisent les émulsions lors des extractions butyliques. Le résidu de centrifugation est mis en suspension dans un peu d'eau, centrifugé 15 minutes, puis les deux surnageants sont réunis et additionnés de 4 g de carbonate de sodium sec afin de fixer le pH à 11. On extrait deux fois au n-butanol dans les colonnes verticales, lave l'extrait avec une solution de carbonate de sodium de même concentration que l'urine extraite (8% poids/volume), puis à l'eau. L'extrait évaporé à sec au Craig, à une température inférieure à 50°, est repris par 50 ml d'une solution de carbonate à 8%, puis réextrait au n-butanol comme précédemment. Les dosages peuvent être effectués sur ce dernier extrait sec, aussi bien pour les 17-CS que pour l'acide glucuronique conjugué

Voici les quantités utilisées pour les deux extractions:
Pour 50 ml d'urine centrifugée, amenée à pH 11 (4 g de carbonate de sodium):
première extraction avec 50 ml de n-butanol (1 volume);
deuxième extraction avec 25 ml de n-butanol (0,5 volume).

Extraits butyliques réunis (75 ml), lavés une fois avec 30 ml (0,4 volume) de carbonate de sodium 8% et une fois avec 22,5 ml d'eau (0,3 volume). Les dosages sont effectués sur l'équivalent de 5 ml d'urine pour les 17-CS et de 2,5 ml pour l'acide glucuronique conjugué pour des animaux normaux.

Lorsqu'on veut effectuer une chromatographie sur papier, on fait une hydrolyse enzymatique sur une prise aliquote et on opère selon la technique d'hydrolyse précédemment décrite. Il serait peut-être avantageux de mettre au point une chromatographie des conjugués, de façon à simplifier la méthode et à rendre possible l'étude directe du mode de conjugaison des 17-CS du cobaye.

b) *Fraction C.*

L'extraction de la fraction AB conjuguée laisse une fraction C résiduelle analogue à celle obtenue par l'extraction séparée des fractions A et B. On utilise les procédés d'extraction et d'hydrolyse décrits plus haut, lorsqu'on veut doser cette fraction.

Les différentes méthodes que nous venons de décrire sont des techniques de base. On peut ainsi combiner les différentes possibilités et s'adapter à chaque cas particulier.

F. *Discussion.*

a) *Fractionnement des urines.*

On peut dire que le défaut fondamental de la technique de fractionnement en fractions A, B et C est que, chez l'homme, la fraction A contient plus du tiers des 17-CS oxygénés en 11. Lorsqu'on effectue deux extractions successives sur colonnes au n-butanol (cf. fraction A ou AB), on extrait la presque totalité des 17-CS oxygénés en 11, si bien que la fraction C n'a plus aucun intérêt et cela d'autant plus que les urines de cobayes sont extrêmement pigmentées.

On verra également que le cobaye n'élimine pas (dans tous les cas étudiés) de déhydroépiandrostérone, ainsi la fraction B telle qu'elle a été définie plus haut, devient sans intérêt.

C'est pourquoi, bien que notre premier objectif ait été d'utiliser la méthode de fractionnement de JAYLE, en fractions A, B et C, nous avons dû d'abord renoncer à la fraction B qui ne contenait pas de déhydroépiandrostérone, puis à la fraction C qui ne contenait pratiquement plus de 17-CS oxygénés en 11, lorsque l'extraction au n-butanol de l'urine à pH 11 était effectuée en deux fois (première fois avec un volume, deuxième fois avec un demi-volume de n-butanol).

En définitive, nous n'avons étudié qu'une seule fraction nommée A ou AB, suivant qu'elle avait été préparée après élimination de la fraction B (ce qui purifiait quelque peu les extraits) ou qu'elle avait été obtenue à partir de l'urine brute (paragraphe E de ce chapitre).

En pratique, on peut envisager indifféremment les fractions A ou AB qui sont de toute première importance et reflètent fidèlement l'activité androgène de l'animal.

b) *Hydrolyse chlorhydrique et hydrolyse enzymatique.*

Bien que l'hydrolyse par les acides minéraux soit couramment utilisée en clinique et qu'elle fournisse des résultats certains chez l'homme, nous avons vu que chez le cobaye il était impossible de l'utiliser, car elle ne fournissait pas des résultats reproductibles. Par contre, l'hydrolyse enzymatique au moyen des sulfatase et glucuronidase d'*Helix pomatia* convient

parfaitement. Elle permet, d'une part, une excellente reproductibilité des résultats quantitatifs, d'autre part, elle évite la formation d'artefacts et rend plus aisée l'interprétation des chromatogrammes.

Chromatographie sur papier des extraits urinaires

Nous venons de voir que l'interprétation des résultats des dosages colorimétriques des 17-CS urinaires est très délicate, car il faut tenir compte du fait que l'on a un mélange relativement complexe. L'interprétation devient plus aisée dès que l'on sait qualitativement quels sont les 17-CS présents.

A. *Technique adoptée.*

Nous avons essentiellement utilisé la méthode de Zaffaroni et Savard (Savard, 1953, 1954; Zaffaroni, 1953; Baulieu et al., 1957), technique simple et bien adaptée aux moyens dont nous disposons. Nous n'utilisons que la chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1, avec comme phase stationnaire, le propanediol 1,2 et comme phase mobile la ligroïne (point d'ébullition 80-110°), le toluène et le méthylcyclohexane.

Imprégnation des papiers.

L'imprégnation des papiers avec la phase stationnaire est certainement le point qui réclame le plus d'attention si l'on veut obtenir à la fois précision et reproductibilité des résultats.

Le propanediol 1,2 pur, par sa polarité, rend les stéroïdes peu mobiles; la vitesse de migration est extrêmement lente; aussi est-il nécessaire d'utiliser un diluant volatil de façon qu'il ne reste que peu de propanediol 1,2 sur la feuille. En pratique, on dilue le propanediol avec un volume égal de méthanol, on trempe les feuilles aussi régulièrement que possible dans ce mélange, et on les conserve entre deux feuilles de papier buvard. Le méthanol s'évapore lors des manipulations ultérieures.

Température.

Un second facteur à envisager est la température. En elle-même (entre 18 et 28°), elle ne joue aucun rôle (si ce n'est dans la vitesse de migration), mais l'amplitude de ses variations peut avoir une influence néfaste, d'une

part sur la descente de la phase mobile, d'autre part sur la résolution des différents stéroïdes. Aussi, afin d'obtenir des résultats semi-quantitatifs et reproductibles, il est nécessaire de travailler dans une pièce à température constante, 22° ± 1 par exemple.

Enfin il est nécessaire de mentionner que, malgré une bonne imprégnation du papier par la phase stationnaire et une température constante, on observe souvent des écarts sensibles dans la vitesse de migration des stéroïdes sans qu'on puisse l'expliquer d'une façon satisfaisante.

Matériel.

Nous utilisons le matériel classique de la chromatographie sur papier, à savoir:

De grandes cuves en verre (bacs d'accumulateurs) rodés à la partie supérieure et fermés par une plaque de verre. On assure l'étanchéité au moyen de propanediol 1,2 pur suffisamment visqueux et peu volatil. Il offre l'avantage de ne pas introduire de substances étrangères dans la cuve. Les papiers sont fixés entre deux plaques de verre ayant les dimensions des augettes (chaque augette peut ainsi supporter deux séries de papiers, une de chaque côté). Le tout est posé sur une armature de verre à l'intérieur de la cuve.

La cuve est préparée au minimum 24 heures avant d'être utilisée, en y introduisant les deux liquides constituant les deux phases: propanediol 1,2 et ligroïne, par exemple, afin que l'atmosphère soit équilibrée et saturée des vapeurs des deux solvants. On prépare également la phase mobile en la saturant de la phase stationnaire à la température de la chambre de travail. Il ne reste qu'à disposer les spots sur les papiers en prenant la précaution de ne pas avoir des taches de plus de 5 mm de diamètre. Comme le papier est humide et que les taches s'étendent rapidement, il faut mettre des stéroïdes purs ou les extraits en solution dans un solvant volatil (méthanol ou chlorure de méthylène) et sécher rapidement au moyen d'un faible courant d'air. On dépose quantitativement soit au moyen d'une micropipette graduée (0,1 ml au 1/1000), soit avec un tube étiré à une extrémité en rinçant plusieurs fois avec du solvant propre.

Il est nécessaire de déposer sur chaque feuille de papier des témoins en quantité connue pour permettre un contrôle de la migration et une estimation semi-quantitative des taches. Les feuilles sont alors placées le plus rapidement possible dans la cuve, équilibrée au moins une heure, puis on introduit au moyen de trous percés dans le couvercle de la cuve

au-dessus des augettes, la phase mobile (ligroïne). La durée moyenne est d'environ 20 heures à 22° pour la ligroïne, 4 à 5 heures pour le toluène, 100 heures pour le méthylcyclohexane. Ces temps sont calculés afin d'avoir l'androstérone au bas de la feuille (30 à 35 cm de la ligne de départ).

Une fois la séparation effectuée, les papiers sont retirés de la cuve, séchés complètement à la température de la pièce pendant une nuit ou quelques heures à 45°, puis révélés. Les taches sont mises en évidence en immergeant la feuille de papier d'abord dans une solution de potasse environ 3N dans l'éthanol (5,8 g. de potasse dissous dans 5 ml d'eau' volume final 50 ml avec éthanol 95%). On sèche soigneusement les bandes entre des feuilles de papier buvard, puis on les immerge de nouveau dans une solution de m-dinitro-benzène à 2% dans l'éthanol. On sèche de nouveau soigneusement. Les taches apparaissent immédiatement pour les 11-céto-17-CS, en quelques minutes dans une étuve à 45° pour les autres 17-CS. Le papier doit rester blanc, les taches apparaissent en violet, bleu ou rose.

B. *Stéroïdes mis en évidence — RT moyens obtenus.*

Remarquons, tout d'abord, que le toluène sépare très mal les stéroïdes oxygénés en 11. Les 11-hydroxy et 11-céto correspondants ne forment qu'une seule tache. Ce système n'est donc pas utilisable pour les urines de cobayes qui contiennent surtout des 17-CS oxygénés en 11. Le système méthyl-cyclohexane-propanediol n'est utilisé que dans quelques cas particuliers où l'on veut confirmer la présence de déhydroépiandrostérone et d'épiandrostérone dans un même extrait. Cependant, le système ligroïne. propanediol 1,2 sépare déjà convenablement ces deux stéroïdes. Pratiquement, tous nos résultats ont été obtenus au moyen de ce dernier système.

Dans le tableau 5, nous avons réuni les principales caractéristiques des 17-CS oxygénés en 11, des quatre principaux 11-désoxy-17-CS et de quelques 3-cétostéroïdes.

La migration des différents 17-CS se fait suivant certaines lois basées essentiellement sur la polarité des groupes fixés sur la molécule. Savard (Savard, 1953; Lederer et Lederer, 1957), le premier, a formulé ces lois empiriques que nous avons confirmées. Elles se résument ainsi:

1. Les céto-stéroïdes en C_{21} (fonction oxygénée en C_{20}) migrent plus rapidement que les cétostéroïdes en C_{19} (fonction oxygénée en C_{17}) correspondants. Ceci permet de séparer les 17-CS des 20-CS.

TABLEAU 3.

Chromatographie sur papier. Système ligroine-propane,1, 2-diol.

Stéroïdes	Abréviations	RA	Couleur Zimmermann	Sensibilité (µg)
Etiocholane, 3α, 11β-diol, 17-one	11-OHE *	0,027 ± 0,016	violet	2-3
Androstane, 3α, 11β-diol, 17-one	11-OHA *	0,039 ± 0,015	bleu-violet	2-3
Etiocholane, 3α-ol, 11, 17-dione	11-COE *	0,097 ± 0,036	rose	1-2
Androstane, 3α-ol, 11, 17-dione	11-COA *	0,17 ± 0,04	rose	1-2
Testostérone	T	0,22	bleu-ciel	2-3
Epi-testostérone (17α) . .	éT	0,32	bleu-ciel	2-3
Déhydroépiandrostérone .	DHA *	0,48 ± 0,05	violet	5
Etiocholane, 3α-ol, 17-one	E	0,61 ± 0,05	violet	5
Androstane, 3β-ol, 17-one	éA	0,61 ± 0,05	violet	5
Androstane, 17β-ol, 3-one		0,65	bleu	5
Etiocholane, 17β-ol, 3-one		0,72	bleu	5
Androstérone	A *	1,00	violet	5

* Moyennes de 10 à 20 mesures pour des migrations de l'androstérone comprises entre 15 et 37 cm à des températures variant de 15 à 25°.

Le ton de la coloration variant avec la quantité de stéroïde, les couleurs correspondent à environ 5 µg de 11-oxy-17-CS, et à environ 20 µg de 11-désoxy-17-CS.

Exemple:

* R_A: Δ^4-androstène 3, 17 dione: 1,7
progestérone: 2,3.

2. Les dérivés de la série androstane (série 5α) migrent plus rapidement que les dérivés correspondants de la série étiocholanolone (série 5β).

Ceci semble également vérifié pour les cétostéroïdes en C_{21} étudiés.

Exemple; (cf. Tableau 5)

11-OH-E: 0,027 et 11-OH-A: 0,039
11-CO-E: 0,097 et 11-CO-A: 0,17
E : 0,61 et A : 1,00

Exemple:

* R_A: Pregnane 3α ol, 20-one: 1,30
Allo-pregnane 3α ol, 20-one: 1,40.

On observe cependant souvent la même vitesse de migration pour les deux séries.

* Emprunté à SAVARD (1953).

Exemple:

* R_A: Etiocholanolone 3,17-dione et androstane 3,17-dione: 2,5
Pregnane 3,20-dione et allopregnane 3,20-dione: 3,0.

3. Les 11-β-hydroxy migrent plus lentement que les 11-céto correspondants:

Exemple (cf. tableau 5):

R_A: 11-OH-E: 0,027 et 11-CO-E: 0,097
11-OH-A: 0,039 et 11-CO-A: 0,17.

4. Les changements de position d'une seule fonction hydroxyle dans toute la molécule suivant le système de configuration α-β, suffit à modifier considérablement la vitesse de migration. L'épimère 3α (polaire) migre plus vite que l'épimère 3β (équatorial) correspondant. Cette loi est peut-être générale pour toutes les positions α et β.

Exemple (cf. tableau 5):

R_A: Androstérone (3α): 1,00 et épiandrostérone (3β): 0,61
Testostérone (17β): 0,22 et épitestostérone (17α): 0,32

* $R_{11\text{-CO E}}$: Androstane 3α, 11β-diol, 17-one: 0,45
Androstane 3β, 11β-diol, 17-one: 0,30.

En résumé, la séquence de mobilité pour des stéroïdes possédant un oxygène dans une position déterminée (particulièrement en 3) est la suivante:

Cétone saturée > cétone α, β non saturée > — OH en configuration polaire (α) > — OH en configuration équatoriale (β).

Au point de vue séparation, notons qu'il est impossible de séparer l'étiocholanolone de l'épiandrostérone, aussi bien avec le système ligroïne/propanediol qu'avec le méthylcyclohexane/propanediol. Il en est de même pour l'androstane 17β-ol-3-one et l'étiocholane 17β-ol-3-one. Tous les autres stéroïdes cités dans le tableau 5 se séparent parfaitement sur un unique chromatogramme (ligroïne-propanediol 1,2). Les couleurs obtenues au moyen de la réaction de Zimmermann aident aussi beaucoup à distinguer les différentes taches.

* Emprunté à Baulieu et al. (1957).

SUMMARY

Various factors which affect the development of the Zimmermann coloration in the determination of 17-ketosteroids in urine have been studied experimentally. A method very similar to that of KLENDSHOJ et al. has been used. The molecular extinctions have been determined for various ketosteroids.

The extraction of the 17-ketosteroids from urine has been achieved by butanol extraction of the conjugates as described by JAYLE et al. followed by enzymatic hydrolysis by means of enzymes contained in the digestive juice of *Helix pomatia*.

The various 17-ketosteroids have been identified by paper chromatography according to the method of SAVARD. Various Rf values have been confirmed.

BIBLIOGRAPHIE

AUTEURS CITÉS

ALFSEN, A.: *C. R. Acad. Sciences, 244* 251, 1957.

ALLEN, W. M.: *J. Clin. Endocrinol., 10*, 71, 1950

BAULIEU, E., E., S. H. WEINMANN, M. F. JAYLE: *Bull. Soc. Chim. Biol., 39*, 1372, 1957.

BITMAN, J., S. L. COHEN: *J. Biol. Chem., 191*, 351, 1951.

CHAROLLAIS, E. J.: *Bull. Soc. Chim. Biol., 37*, 299, 1955.

GUYÉNOT, E., K. PONSE, J. WIETRZYKOWSKA: *C. R. Acad. Sciences, 194*, 1051, 1932.

HENRY, R., M. THÉVENET: *Bull. Soc. Chim. Biol., 34*, 886, 1952*a*

——, M. THEVENET, P. JARRIGE: *Bull. Soc. Chim. Biol., 34*, 897, 1952*b*.

JARRIGE, P., R. HENRY: *Bull. Soc. Chim. Biol., 34*, 872, 1952.

JAYLE, M.F., E.-E. BAULIEU: *Bull. Soc. Chim. Biol., 34*, 1200, 1952.

——, E.-E. BAULIEU, L. GONZALES-FLORES: *Ann. Endoc., 14*, 642, 1953.

KLENDSHOJ, N. C., M. FELDSTEIN, A. SPRAGUE: *J. Clin. Endocrinol. Metabol., 13*, 922, 1953.

LEDERER, E., M. LEDERER: *Chromatography*, 2nd ed., 278-288, 1957.

PONSE, K.: Meeting of the endocrine Society (Chicago), 1952.

—— *Colloque sur la fonction lutéale.* Masson, éd., Paris, 57-62, 1954*b*.

—— *Troisième réun. des endocrinologistes de langue franç.* Masson, Paris, 89-138. 1955.

—— *Ann. Endoc., 19*, 809, 1958.

SAVARD, K.: *J. Biol. Chem., 202*, 457, 1953.

—— *Recent Progress in Horm. Res., 2*, 185, 1954.

SOBEL, A. E., P. E. SPOERRI: *J. Am. Chem. Soc., -63*, 1259, 1941.

——, P. E. SPOERRI: *J. Am. Chem. Soc., 64*, 361, 1942.

STEINACH, E., H. KUN: *Arch. Ges. Physiol*, (Pflügers), *227*, 266, 1931.

TALBOT, N. B., J. K. RYAN, J. WOLFE: *J. Biol. Chem., 138*, 593, 1943.

ZAFFARONI, A.: *Recent Progress in Horm. Res., 8*, 51, 1953.