

Le dosage chimique des corticostéroïdes urinaires*

Par R. BORTH

Laboratoire d'Hormonologie de la Clinique universitaire de Gynécologie et d'Obstétrique (Professeur H. DE WATTEVILLE), Genève

(Fin)

V. Hydrolyse

A. Ses problèmes

Dans un travail sur l'hydrolyse des œstrogènes urinaires, MARRIAN et BAULD⁶⁶ rappellent l'historique de ce problème. Depuis la première découverte d'une activité œstrogénique dans l'urine par LOEWE et LANGE⁶⁷, il a fallu six ans avant qu'on ne s'aperçoive qu'un traitement par acide augmentait le rendement de l'extraction.

On est surpris de constater que les laboratoires s'intéressant aux stéroïdes urinaires ne semblent avoir tiré aucun profit de cette expérience si durement acquise. En 1931, PERLA et MARMONSTON-GOTTESMAN⁶⁸ ont observé pour la première fois une activité corticale dans un extrait urinaire et ce n'est que 15 ans plus tard que HEARD et coll.¹⁰ ont communiqué une technique d'extraction incorporant l'acidulation au pH 1. MARRIAN et BAULD⁶⁶ ont raison de souligner que l'histoire s'est ré-

pétée; exactement comme dans le cas des œstrogènes, des années d'efforts ont été dépensées pour obtenir des taux d'élimination qui, quantitativement, n'avaient aucun rapport avec la réalité. Ces dernières années seulement ont vu commencer des études approfondies sur les conjugués urinaires et sur les conditions de leur hydrolyse.

Il faut reconnaître que dans le cas des corticostéroïdes la situation est particulièrement compliquée.

Une grande partie en est détruite au pH 0 à 100°, c'est-à-dire, dans les conditions habituelles de l'hydrolyse à reflux en milieu acide⁶⁹. Une partie moins importante ne supporte même pas un pH de 1 à 15-20°⁷⁰. En outre, dans ces dernières conditions, certains conjugués passent inchangés dans le chloroforme⁷¹, d'autres sont hydrolysés, mais la plus grande partie (au moins 80%) reste inchangée dans l'urine est n'est, par conséquent, pas dosable après cette technique d'hydrolyse (cf. ⁷²).

Tableau 7. - Hydrolyse enzymatique des corticostéroïdes urinaires

Origine de la préparation d'enzyme	Concentration U./cm ³ *	pH	Température °C	Durée heures	Stéroïdes dosés	Auteurs
Milieu de culture bactérienne	75-100**	6,5-6,0	37	24	(Groupe voulu)	BUEHLER et coll. ⁷³
	16**		37	18	formaldéhydrogènes	DAUGHADAY et coll. ⁷⁴
Suc digestif d'escargots	7500**	4,5	39	24	réducteurs	HENRY et THIÉVENET ⁷⁵
Rate de bœuf	75	5,0	37	72	17,21-dihydroxy-20-céto	VESTERGAARD ⁷⁶
	10**†	4,5	37	48	formaldéhydro-, acétaldéhydrogènes	COX et MARRIAN ⁷²
	333	4,5	37,5	24	17,21-dihydroxy-20-céto	GLENN et NELSON ⁷⁷
			47	15		
	100**	4,5	37,5	24	Stéroïdes individuels après chromatographie	ROMANOFF et coll. ⁵⁸
	150-1000	4,8	37	4-48	formaldéhydrogènes	VENNING et coll. ⁷⁸
	> 240	4,8	50	≤ 24	formaldéhydrogènes	MASON ⁷⁹
	400	5,0	37	48	formaldéhydrogènes	COHEN ⁸⁰
	100-400		37	24-480	réducteurs, formaldéhydrogènes, 17,21-dihydroxy-20-céto	WILSON ⁸¹

* Unités FISHMAN⁸² par cm³ d'urine

** Chiffre approximatif

† Extrait butylique

* La première partie parut dans *Chimia 10* (1956) 49-58.

⁶⁶ G. F. MARRIAN et W. S. BAULD, *Acta Endocr.* (Copenhague) 7 (1951) 240.

⁶⁷ S. LOEWE et F. LANGE, *Klin. Wschr.* 5 (1926) 1038.

⁶⁸ D. PERLA et J. MARMONSTON-GOTTESMAN, *Proc. Soc. Exp. Biol.* (N. Y.) 28 (1931) 1024.

⁶⁹ G. F. MARRIAN et S. M. ATHERDEN, *Acta Endocr.* (Copenhague) 13 (1953) 265.

⁷⁰ J. Y. F. PATERSON et G. F. MARRIAN, *Acta Endocr.* (Copenhague) 14 (1953) 259.

⁷¹ J. Y. F. PATERSON, R. I. COX et G. F. MARRIAN, *Biochem. J.* 46 (1950) xxix.

⁷² R. I. COX et G. F. MARRIAN, *Biochem. J.* 54 (1953) 45.

⁷³ H. J. BUEHLER, P. A. KATZMAN et E. A. DOISY, *Fed. Proc.* 8 (1949) 189.

⁷⁴ W. H. DAUGHADAY, A. L. FARR et E. HOUGHTON, *Endocrinology* 49 (1951) 146.

⁷⁵ R. HENRY et M. THIÉVENET, *Bull. Soc. Chim. Biol.* (Paris) 34 (1952) 886.

⁷⁶ P. VESTERGAARD, *Acta Endocr.* (Copenhague) 13 (1953) 241.

⁷⁷ E. M. GLENN et D. H. NELSON, *J. Clin. Endocr.* 13 (1953) 911.

⁷⁸ E. H. VENNING, I. DYRENFURTH et V. E. KAZMIN, *Recent Progr. Hormone Res.* 8 (1953) 27.

⁷⁹ H. L. MASON, *Recent Progr. Hormone Res.* 9 (1954) 267.

⁸⁰ S. L. COHEN, *Recent Progr. Hormone Res.* 9 (1954) 300.

⁸¹ H. WILSON, *Recent Progr. Hormone Res.* 9 (1954) 282.

L'incubation à 30–50° en présence de préparations contenant de la β -glucuronidase d'origine splénique ou bactérienne permet l'extraction de plus grandes quantités de corticostéroïdes libres, dépassant de 5, 10 et même 30 fois les taux obtenus par les autres méthodes.

Avant qu'une méthode puisse servir aux dosages de routine du laboratoire clinique, il faut en connaître les sources d'erreur et établir des conditions suffisamment stables, suffisamment insensibles aux petites variations techniques inévitables. La plupart des travaux publiés sur l'hydrolyse fermentaire dont nous résumons les plus importants dans le tableau 7, portaient sur les préparations d'enzyme obtenues à partir de la rate de bœuf. Nous nous sommes proposé d'étudier l'hydrolyse fermentaire par une préparation de β -glucuronidase d'origine bactérienne.

B. Expériences avec une préparation de β -glucuronidase bactérienne

a) Source de l'enzyme

Nous avons employé un produit du commerce (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., Etats-Unis) préparé à partir de milieux de culture de bactéries (*E. coli*)⁷³. La préparation est une poudre. Aucune trace de substances formaldéhydogènes n'a été décelable dans des essais à blanc selon (c) sur des quantités équivalentes à 4000 unités.

b) Dosage de l'activité enzymatique

Principe. – Par hydrolyse de glucuronide de phénolphtaléine (Sigma Chemical Co.), la glucuronidase libre de la phénolphtaléine, dosable par colorimétrie en solution alcaline. Dans les conditions employées, la quantité libérée est proportionnelle à la concentration de l'enzyme et à la durée de l'hydrolyse. L'unité FISHMAN, employée dans ce travail, est définie comme la quantité d'enzyme qui libère, dans des conditions bien déterminées, 1,0 μ g de phénolphtaléine dans une heure^{82, 83}.

Technique (méthode F2 de notre laboratoire). – On dissout une prise de P mg (env. 300 U.) de la préparation de glucuronidase dans 3,0 cm³ d'eau distillée et l'on ajoute 3,0 cm³ d'une solution tampon au pH 6,0, composée d'un vol. d'acide acétique 0,15 M (8,6 μ l/cm³) et de 16 vol. d'acétate sodique 0,15 M (20,4 mg CH₃COONa · 3 H₂O/cm³). Cinq portions de 1,0 cm³ de ce mélange sont pipetées dans des éprouvettes et mises à 37° pendant 15 minutes. – On dilue 0,6 cm³ de glucuronide de phénolphtaléine 0,01 M (pH 7) avec 3,4 cm³ d'eau distillée et l'on met le mélange à 37° pendant 15 minutes. Ensuite, on ajoute 0,5 cm³ de cette solution (correspondant à 0,75 μ mol de phénolphtaléine) à quatre des portions d'enzyme; la cinquième, complétée de 0,5 cm³ H₂O, sert d'essai à blanc. Ayant bien mélangé, on laisse à 37° exactement pendant 30 minutes, puis on arrête la réaction par l'adjonction de 5,0 cm³ d'une solution tampon au pH 10,4, composée de 56 vol. de glycine 0,2 M (15,0 mg/cm³, plus 11,7 mg NaCl/cm³) et de 44 vol. de NaOH 0,2 N (8 mg/cm³). Les densités optiques D , par rapport à l'essai à blanc mis à zéro, sont lues au colorimètre

(Coleman Universal, Modèle n° 14), à une longueur d'onde de 550 m μ . Une solution alcaline de phénolphtaléine contenant 20 μ g dans le même volume (6,5 cm³) sert d'étalon. On la prépare en diluant 1,0 cm³ d'une solution-réserve de phénolphtaléine (667 μ g/cm³ d'éthanol 95 %) à 50 cm³ avec de l'eau; 1,5 cm³ de cette solution diluée sont mélangés à 5,0 cm³ de tampon pH 10,4. La densité optique D_s de l'étalon préparé à double est lue par rapport à un blanc composé de 1,5 cm³ H₂O + 5,0 cm³ de tampon pH 10,4. – A partir des valeurs moyennes de D et D_s , la quantité de phénolphtaléine libérée est égale à 20 D/D_s et l'activité de la préparation, selon la définition de l'unité en μ g de phénolphtaléine par heure par mg, s'obtient par la formule:

$$\text{Unités/mg} = 240 D/PD_s.$$

Les préparations utilisées dans ce travail avaient des activités de 12 à 25 U./mg. La précision du dosage, mesurée par l'écart-type des répétitions, est de $\pm 0,4$ U./mg.

c) Technique analytique (méthodes D7 et D8 de notre laboratoire)

Nous avons utilisé la méthode des corticoïdes formaldéhydogènes en nous basant, pour les détails techniques, sur les travaux de CORCORAN et PAGE²⁹, MACFADYEN⁸⁴, MASON³⁰, PATERSON et coll.⁷¹, BASSIL et HAIN⁸⁵, ainsi que sur de nombreuses expériences préliminaires que nous ne pouvons relater ici.

1. (a) *Hydrolyse au pH 1,7.* – On laisse reposer 18 heures à la température ambiante (env. 20°) 250 cm³ d'urine, ajustée au pH 1,7 par adjonction de 3 à 4 cm³ d'acide sulfurique 5 M (2 vol. d'acide concentré + 5,5 vol. H₂O).

1. (b) *Hydrolyse fermentaire.* – A 50 cm³ d'urine ajustée au pH 6,0, on ajoute 1 cm³ de chloroforme et la quantité voulue de glucuronidase dans 2 cm³ d'eau. Le mélange est mis à l'étuve de 37° pour la durée prévue de l'hydrolyse.

2. *Extraction.* – (Les volumes à employer dépendent naturellement de la prise d'urine qui, selon n° 1, est de 250 ou 50 cm³.) – L'urine hydrolysée est extraite 6 fois avec chaque fois (a) 50 ou (b) 15 cm³ de chloroforme. Les extraits, centrifugés si nécessaire, sont réunis et lavés rapidement deux fois avec (a) 30 ou (b) 10 cm³ de NaOH 0,1 N et une fois avec 30 ou 10 cm³ d'eau; chaque fraction de lavage est extraite avec 30 ou 10 cm³ de chloroforme qui seront réunis à l'extrait principal. Celui-ci est ensuite déshydraté sur du Na₂SO₄ anhydre, filtré sur coton et distillé rapidement sur un bain-marie de 80° jusqu'à (a) 20 à 30 ou (b) 5 à 10 cm³. Après transvasement dans un ballon rond de 50 cm³, le reste du solvant est évaporé à sec par le vide, au bain-marie ne dépassant pas 40°. L'extrait est conservé au dessiccateur sur CaCl₂.

3. *Oxydation et distillation.* – L'extrait dissous dans 0,5 cm³ d'acide acétique glacial, est transvasé dans un erlenmeyer de 30 cm³ en rinçant une fois avec 2,5 et trois fois avec 2,0 cm³ d'eau distillée. On ajoute 0,5 cm³ de KIO₄ 0,03 M (6,9 mg/cm³) dans H₂SO₄ 0,25 M (1 vol. d'acide concentré + 70 vol. H₂O) et, après 45 minutes à la température ambiante, l'oxydation est arrêtée par l'adjonction de 0,5 cm³ de SnCl₂ en solution dont le pouvoir réducteur dépasse légèrement (de 2 %) l'équivalent du KIO₄. Pour préparer cette solution, on dissout env. 2 g de SnCl₂ · 2 H₂O dans 12,5 cm³ de HCl concentré chaud, on porte à 50 cm³ avec H₂O, on titre (amidon) avec le KIO₄ et amène au titre voulu en diluant avec le volume nécessaire de HCl 2,5 N (1 vol. d'acide concentré + 3 vol. H₂O).

⁸² W. H. FISHMAN, B. SPRINGER et R. BRUNETTI, *J. Biol. Chem.* 173 (1948) 449.

⁸³ Sigma Chemical Co., Bulletin 105 (1951).

⁸⁴ D. A. MACFADYEN, *J. Biol. Chem.* 158 (1945) 107.

⁸⁵ G. T. BASSIL et A. M. HAIN, *Nature* (London) 165 (1950) 525.

Une solution aqueuse de 17,78 μg d'*u*-hydroxy-acétophénone* par cm^3 sert d'étalon. 8,5 cm^3 de cette solution auxquels on a ajouté 0,5 cm^3 d'acide acétique glacial, sont traités de façon identique, mais l'oxydation étant plus lente que celle des extraits urinaires, on laisse reposer 3 heures au lieu de 45 minutes avec le KIO_4 .

Après l'oxydation, le mélange renfermant le formaldéhyde est distillé, en un quart d'heure, dans un cylindre gradué contenant 1,0 cm^3 de Na_2SO_3 à 4 % (dans de l'éthanol à 1 %) jusqu'à un volume total de 8,5 cm^3 environ, l'extrémité du réfrigérant plongeant dans le Na_2SO_3 . Le distillat est porté à 10,0 cm^3 avec de l'eau distillée.

4. *Colorimétrie.* — On prend 3,0 cm^3 du distillat pour la colorimétrie. Cette quantité correspond : à $c = 75 \text{ cm}^3$ d'urine si la prise au début était de 250 cm^3 (hydrolyse au pH 1,7); à $c = 15 \text{ cm}^3$ si elle était de 50 cm^3 (hydrolyse fermentaire); et à 10,0 μg de formaldéhyde dans l'étalon. 3,0 cm^3 d'eau distillée servent d'essai à blanc. On ajoute 7,0 cm^3 du réactif, fraîchement préparé à partir de 1 vol. d'une solution aqueuse d'acide chromotrope à 6 % porté à 25 vol. avec du H_2SO_4 15 M (4 vol. d'acide concentré + 1 vol. H_2O). Le mélange est mis au bain-marie bouillant, à l'abri de la lumière. Après 30 minutes, on refroidit et on lit les densités optiques (D des extraits, D_s de l'étalon) à 570 $\text{m}\mu$ par rapport au blanc (spectrophotomètre Coleman Universal, modèle n° 14). En admettant que 1,0 mg de formaldéhyde correspond à 11,5 mg de stéroïdes³⁰, on obtient le résultat

$$\text{mg/l} = 115 D/cD_s$$

(= 1,533 D/D_s pour l'hydrolyse acide; = 7,667 D/D_s pour l'hydrolyse fermentaire).

d) Comparaison des taux obtenus par hydrolyse acide et hydrolyse fermentaire

Comme nous l'avons déjà exposé, on sait depuis quelques années que les taux obtenus après hydrolyse au pH 1 ou 1,7 sont beaucoup plus bas qu'après hydrolyse par la glucuronidase. Nous avons vérifié ce fait pour notre préparation d'enzyme sur 46 urines différentes, en utilisant 50 U. de glucuronidase par cm^3 d'urine et une durée d'hydrolyse de 18 heures. Les résultats sont groupés dans le tableau 8.

L'hydrolyse au pH 1,7 a donné $13,9\% \pm 6,1\%$ (moyenne $\pm$ écart-type) du taux trouvé après hydrolyse fermentaire. Ce pourcentage a varié de 4 à 30, il était donc loin d'être constant. Il est vrai qu'il existe une corrélation nettement significative dans le sens statistique entre les résultats obtenus par les deux méthodes, le coefficient de détermination³⁶ étant de $B = 0,80$ ($P < 0,001$). Mais cette corrélation est déterminée dans une large mesure par les valeurs extrêmes ce qui signifie simplement qu'un taux excessivement haut est dépisté comme tel par les deux méthodes. Si l'on élimine seulement les trois valeurs les plus hautes (urines n° 5691, 6005, 6011), le coefficient de détermination tombe à $B = 0,43$ ce qui est toujours nettement significatif

* Nous remercions Monsieur O. JEGER, privat-docent à l'Institut de Chimie organique de l'Ecole polytechnique fédérale de Zurich, pour la préparation de cette substance.

³⁶ A. LINDER, *Statistische Methoden*, 2. Auflage, Birkhäuser, Basel, 1951.

Tableau 8. — Rendement en corticoïdes formaldéhydogènes urinaires après hydrolyse fermentaire ou acide

Urine n°	Corticoides, mg/l		Urine n°	Corticoides, mg/l	
	pH 1,7	Glucuro- nidase		pH 1,7	Glucuro- nidase
4681	2,1	12,0	5622	1,3	5,4
4714	2,6	10,0	5691	10,9	51,7
4741	0,3	3,5	5696	1,4	7,1
5495	2,0	9,9	5831	0,9	7,5
5496	0,8	5,5	5834	0,7	5,6
5519	0,7	7,7	5835	2,2	22,3
5520	0,5	6,9	5917	0,7	4,8
5522	1,6	6,2	5922	1,3	13,9
5523	0,9	9,5	5927	1,4	13,8
5533	2,4	26,0	5960	0,4	5,3
5535	0,6	6,9	5961	0,2	3,5
5536	0,7	5,7	5963	1,1	17,9
5544	0,7	2,3	5967	0,6	6,2
5547	0,6	4,3	5978	0,4	3,3
5554	0,6	3,3	5995	0,8	9,7
5559	0,6	2,8	5998	0,8	22,0
5561	0,8	5,4	5999	0,6	4,0
5562	0,5	1,9	6001	0,5	3,4
5572	0,9	7,2	6005	4,3	31,6
5573	1,1	16,1	6008	0,4	2,6
5583	0,5	2,8	6011	6,9	38,0
5584	1,0	10,2	6034	1,2	12,8
5585	1,1	8,3	6035	1,0	7,4

($P < 0,001$) mais ne suffit évidemment pas pour voir dans les résultats obtenus par hydrolyse au pH 1,7 une approximation quantitativement valable.

e) Stabilité en milieu acide des corticoïdes libérés par hydrolyse fermentaire

La question se pose de savoir si le faible rendement après hydrolyse au pH 1,7 est dû à une destruction des corticoïdes en milieu acide ou plutôt à une hydrolyse des glucuronides, incomplète dans ces conditions. Pour trancher cette question, nous avons fait l'expérience suivante.

Quatre échantillons d'urine ont été divisés chacun en cinq portions, dont deux de 250, deux de 50 et une de 300 cm^3 . Les deux premières ont été soumises à l'hydrolyse au pH 1,7, les autres à l'hydrolyse fermentaire (50 U./ cm^3 , 18 heures). Nous avons extrait les deux portions de 50 cm^3 immédiatement après l'hydrolyse, tandis que la portion de 300 cm^3 a été ajustée au pH 1,7 et divisée en six portions de 50 cm^3 que nous avons remises à 37° pendant 4, 14 ou 24 heures avant de les extraire. Les 40 valeurs obtenues (tableau 9) ont été analysées au moyen de la technique statistique dite analyse de variance³⁶.

Nous en concluons que les corticoïdes libérés par l'enzyme sont stables au pH 1,7. Le taux moyen n'a pas baissé après 24 heures en milieu acide et ceci bien que nous ayons fait cette expérience à 37° et non à la température ambiante. Une légère diminution initiale dans trois urines correspond probablement aux observations de PATERSON et MARRIAN⁷⁰ déjà mentionnées; elle est petite par rapport à la différence entre les deux méthodes et nous pouvons conclure que cette différence reflète l'hydrolyse plus complète des glucuroconjugués par la

Tableau 9. — Stabilité en milieu acide des corticoïdes libérés par hydrolyse fermentaire (taux en mg/l)

Urine n°	Hydrolyse au pH 1,7	Heures au pH 1,7 après hydrolyse fermentaire			
		0	4	14	24
5554	0,6	3,2	7,0	7,1	5,9
	0,6	3,3	7,3	7,0	5,9
5583	0,6	2,9	1,9	1,9	2,5
	0,4	2,7	2,9	2,2	2,3
5692	2,4	7,8	6,7	6,3	5,7
	2,8	7,5	6,1	5,3	5,2
5696	1,4	6,9	6,7	7,7	6,5
	1,2	8,2	6,3	6,4	6,2
Moyenne	1,2	5,3	5,6	5,5	5,0

glucuronidase. Dans la quatrième urine, le rendement a même fortement augmenté pendant les premières 4 heures au milieu acide ; cette observation pourrait s'expliquer par la présence d'un taux élevé de sulfo-conjugués⁷⁹.

f) Concentration de l'enzyme

Les concentrations de glucuronidase préconisées par les différents auteurs varient beaucoup (v. tableau 7). Aussi nous a-t-il semblé utile de faire une étude systématique du problème.

Tableau 10. — Hydrolyse fermentaire des corticoïdes formaldéhydés de l'urine en présence de concentrations variables de β -glucuronidase bactérienne (rendements en mg/l)

Urine n°	Hydrolyse au pH 1,7	Hydrolyse fermentaire Concentration de la glucuronidase en U./cm ³				
		0	5	25	100	150
5831	0,8	2,6	5,9	7,5	7,0	1,8
	0,9	1,8	6,1	7,5	5,6	2,3
5834	0,6	1,5	5,7	5,3	5,1	3,9
	0,7	1,5	5,2	5,8	4,6	3,7
5835	2,1	5,8	18,1	22,3	23,3	25,4
	2,2	5,8	19,2	22,1	28,2	21,6
5917	0,7	1,4	5,3	4,7	4,0	5,3
		1,8	4,4	4,9	5,2	3,3
5922	1,3	10,6	12,8	13,2	12,4	10,8
	1,3	9,9	12,8	14,6	13,0	12,2
5927	1,4	4,6	13,5	13,5	12,3	11,9
		4,4	13,8	14,0	12,5	10,0
5967	0,6	1,3	6,2	5,8	3,6	2,6
		1,2	5,2	5,4	3,6	3,7
5995	0,8	2,8	8,7	9,7	8,3	9,1
		2,6	9,6	9,7	8,5	8,4
6034	1,2	9,1	11,6	13,8	10,4	7,6
		9,3	11,4	11,8	9,3	7,0
6035	0,9	1,7	7,5	7,3	6,9	5,4
		2,3	6,2	7,4	7,3	3,8
Moyenne	1,11	4,10	9,46	10,32	9,56	7,99

Sur dix échantillons d'urine nous avons pris : une ou deux portions de 250 cm³ pour l'hydrolyse au pH 1,7 ; huit portions de 50 cm³ pour l'hydrolyse fermentaire avec 5, 25, 100 ou 150 U./cm³ ; et deux portions de 50 cm³ pour incubation sans adjonction de glucuronidase. Les dix portions hydrolysées par incubation avec ou sans enzyme furent extraites une première fois après 15 heures avec deux fois 20 cm³ de chloroforme, puis remises à 37° pour encore 5 heures et enfin extraites avec deux fois 20 cm³ de chloroforme ; tous les extraits chloroformiques de la même portion furent réunis. Les 114 valeurs obtenues (tableau 10) furent soumises à une analyse de variance⁸⁰. Les résultats justifient les conclusions suivantes.

Le rendement maximum s'obtient avec une concentration de 25 U./cm³. En nous basant sur la courbe des rendements moyens, nous avons adopté la concentration de 20 U./cm³ pour les dosages de routine. Récemment HORWITT⁸⁷ a recommandé la même concentration de glucuronidase bactérienne, alors qu'il faut 12-13 fois plus d'enzyme splénique. Les résultats montrent clairement que le rendement diminue avec des concentrations élevées de l'enzyme. Cette observation assez curieuse a aussi été faite par VENNING (communication personnelle) ; nous pensons qu'elle pourrait être due à la présence d'enzymes oxydantes ou de substances inhibitrices devenant actives à des concentrations élevées, ou encore à des pertes par adsorption. Il ne faut pas oublier que les préparations de glucuronidase du commerce contiennent probablement beaucoup de substances inconnues.

Une réaction enzymatique pourrait être influencée, inhibée ou favorisée, par un grand nombre de facteurs connus et inconnus (cf. p.ex.⁷⁹) ; il y a donc lieu de souligner la régularité des résultats obtenus sur dix urines collectées dans des états cliniques les plus divers. On peut conclure avec confiance que la concentration optimale trouvée est universellement valable.

Il est intéressant de noter que déjà l'incubation seule, sans adjonction de glucuronidase, augmente d'une manière appréciable (en moyenne de 3,7 fois) le rendement par rapport à l'hydrolyse au pH 1,7. Nous soulignons que cette augmentation varie beaucoup d'une urine à l'autre, et c'est un argument de plus contre l'emploi de l'hydrolyse au pH 1,7 dont les résultats sont certainement très influencés par la quantité des corticoïdes libérés par hydrolyse spontanée au cours de la récolte des urines faite sans précautions spéciales.

g) Etude cinétique de l'hydrolyse fermentaire

Vu les indications très divergentes de la littérature (v. tableau 7), il était nécessaire (1) de déterminer la durée de l'hydrolyse et (2) de chercher à savoir si la réaction fermentaire se termine quand tous les glucuronides sont effectivement hydrolysés ou si elle s'arrête à un état d'équilibre avec un taux encore appréciable de glucuroconjugués intacts.

1. Pour commencer l'expérience avec une urine exempte de corticoïdes extractibles, on a extrait 400 cm³ d'urine ajustée

⁸⁷ B. N. HORWITT, *Recent Progr. Hormone Res.* 9 (1954) 356.

au pH 6 par six fois 160 cm³ de chloroforme sans garder ces extraits. On a ensuite ajouté l'enzyme (20 U./cm³) et, après division de l'urine en huit portions égales et adjonction du chloroforme, on les a mises à 37°. Toutes les heures, une portion a été retirée et extraite.

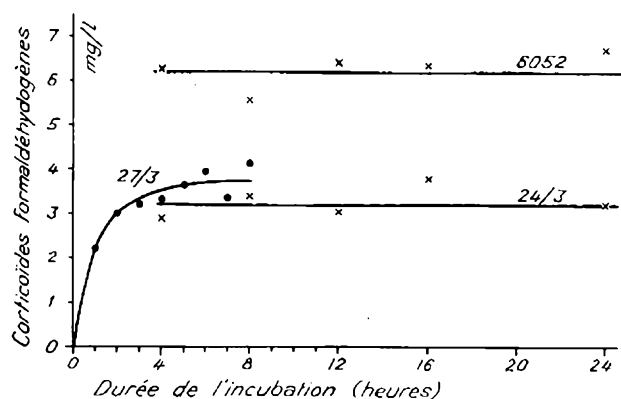


Fig. 3. - Effet de la durée d'incubation sur le taux obtenu après hydrolyse fermentaire

Les taux obtenus se situent très près d'une hyperbole (fig. 3, n° 27/3), car en portant les taux en ordonné et les valeurs réciproques des durées en abscisse, on obtient une droite de régression caractérisée par un coefficient de détermination⁸⁸ de $B = 0,84$ ($P < 0,01$). Bien que cette simple hyperbole ne représente pas la loi cinétique d'une réaction mono- ou bimoléculaire, l'approximation suffit pour pouvoir dire que 90 % du taux final sont atteints après 4 3/4 heures, 95 % après 9 1/2 heures environ.

Dans deux expériences analogues où nous avons varié le temps d'incubation de 4 à 24 heures (fig. 3, n° 6052 et 24/3), les taux obtenus ne variaient en effet que fortuitement autour de leur moyenne et n'indiquaient aucune tendance à l'augmentation.

L'hydrolyse fermentaire par la β -glucuronidase d'origine bactérienne est donc pratiquement terminée après 5 à 10 heures d'incubation à 37°.

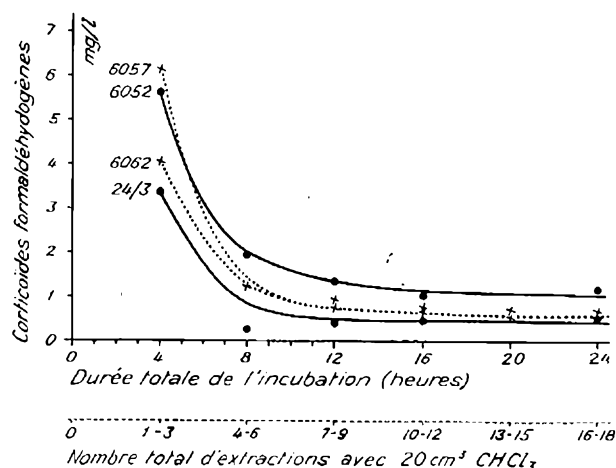


Fig. 4. - Rendements successifs après hydrolyses et extractions répétées
Courbes pleines : avec incubation intermittente
Courbes ponctuées : sans incubation intermédiaire

2. S'il y avait en ce moment encore un taux appréciable de glucuroconjugués, leur hydrolyse devrait continuer après l'extraction des corticoïdes déjà libérés. Pour examiner cette possibilité, nous avons soumis deux échantillons d'urines égale-

ment extraites au préalable comme dans les expériences précédentes, à l'hydrolyse fermentaire (20 U./cm³) pendant 24 heures, en les extrayant toutes les 4 heures (sauf après 20 heures) avec trois fois 20 cm³ de chloroforme ; après chaque extraction, l'urine fut donc remise à 37° pour une durée d'incubation additionnelle de 4 (ou 8) heures.

Les courbes des rendements successifs (fig. 4, courbes pleines) tombèrent déjà après la deuxième période de 4 heures à un taux bas et constant. Le même résultat fut obtenu lorsqu'on ajouta de l'enzyme fraîche après chaque extraction pour compenser une perte éventuelle d'activité. Nous en concluons que la presque totalité des glucuronides est en effet scindée après 4-8 heures ; il ne s'agit pas d'un équilibre défavorable.

Quant aux substances formaldéhydogènes que l'on extrait en quantités faibles et constantes lors des extractions ultérieures, elles ne constituent pas un rendement supplémentaire dû à l'hydrolyse prolongée, mais simplement une fraction extraite très lentement à cause d'un coefficient de partage peu favorable (cf. fig. 1, courbes n° 1). Ceci ressort du fait que l'on obtient cette fraction également par des seules extractions répétées sans incubation intermédiaire (fig. 4, courbes ponctuées). WILSON⁸¹ et d'autres ont fait des observations analogues et l'on peut se demander si cette fraction hydrophile est bien composée de corticostéroïdes.

h) Origine surrénalienne des substances formaldéhydogènes dosées après hydrolyse fermentaire

Il y a plusieurs possibilités pour vérifier si le dosage d'une fraction urinaire dite stéroïdique donne des taux reflétant la sécrétion des glandes surrénales. La méthode que nous avons employée consiste à faire le dosage chez le même sujet, avant et après administration de corticotrophine (ACTH), hormone hypophysaire stimulant la sécrétion du cortex surrénalien. Un taux augmenté à la suite du traitement permet d'affirmer, avec confiance*, que la fraction dosée dépend effectivement de l'état fonctionnel de cette glande. Ce test fonctionnel de la surrénale est connu sous le nom de «test de THORN» ou «test des 48 heures» ; nous en avons donné les détails dans d'autres travaux (p.ex.^{89, 90}).

Les corticoïdes formaldéhydogènes ont été dosés avant (urines A) et après (urines B) ACTH, aussi bien après hydrolyse fermentaire (20 U./cm³, 18 heures) qu'après hydrolyse au pH 1,7. La figure 5 montre les résultats obtenus dans dix cas.

La fraction libérée par l'action de l'enzyme a nettement augmenté dans huit cas, alors que pour deux d'entre eux (5927/5922 et 5978/5983) l'augmentation après hydrolyse acide avait été minime. Comme c'était à prévoir, la surrénale n'a réagi que faiblement dans un cas de cirrhose pigmentaire

* Mentionnons comme cause d'erreur qu'il a existé des préparations d'ACTH contenant du propanediol-1,2, substance formant du formaldéhyde par oxydation avec le periodate⁸⁸.

⁸⁸ P. H. FORSHAM, *Recent Progr. Hormone Res.* 9 (1954) 296.

⁸⁹ F. FERRAZZINI, R. BORTH et R. S. MACH, *Helv. Paediat. Acta* 7 (1952) 60.

⁹⁰ O. JEANNERET, R. BORTH et R. S. MACH, *Acta Endocr. (Copenhague)* 17 (1954) 198.

(5562/5583), et elle n'a pas réagi du tout après un traitement prolongé à la cortisone (6032/6044; cf.⁹¹).

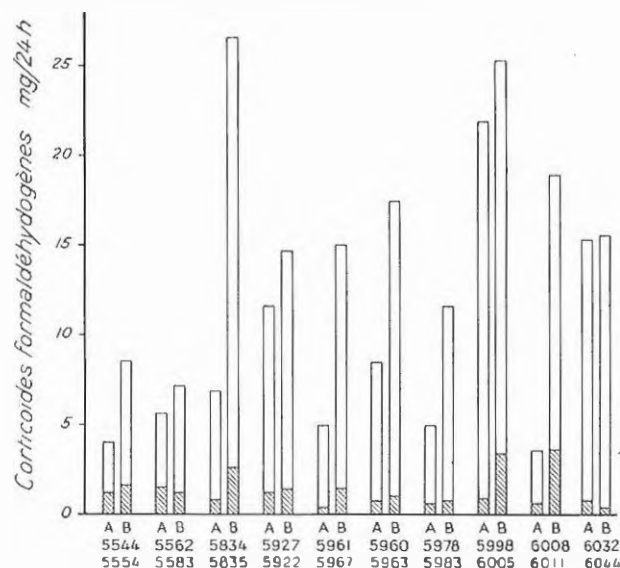


Fig. 5. - Élimination urinaire de corticoïdes formaldéhydogènes avant (A) et après (B) administration de corticotrophine (ACTH). Taux trouvés après hydrolyse fermentaire (colonnes entières) et après hydrolyse au pH 1,7 (parties hachurées)

On aurait pu encore supposer que les taux élevés obtenus par hydrolyse fermentaire étaient dus à une quantité plus ou moins constante de substances d'origine non spécifique qui viendraient s'ajouter aux taux des corticostéroïdes. Pour éliminer cette hypothèse, il suffit d'examiner l'effet de l'ACTH sur le rendement supplémentaire, c'est-à-dire, sur la différence entre les taux obtenus par hydrolyse acide ou fermentaire* (tableau 11). Cette différence est loin d'être constante; sauf dans un cas (5998/6005), elle augmente, à la suite de la stimulation par l'ACTH, dans la même proportion que la fraction dosée après hydrolyse enzymatique.

Tableau 11. - Effet de l'ACTH sur la différence entre les taux urinaires de corticoïdes formaldéhydogènes obtenus par hydrolyse acide ou fermentaire

Urine n°	Avant ACTH mg/24 h	Après ACTH mg/24 h	Augmentation	
			en mg/24 h	en % du taux initial
5544/5554	2,8	7,0	4,2	150
5562/5583	4,2	6,0	1,8	43
5834/5835	6,1	24,1	18,0	295
5927/5922	10,5	13,3	2,8	27
5960/5963	7,7	16,5	8,8	114
5961/5967	4,7	13,7	9,0	191
5978/5983	4,4	10,9	6,5	148
5998/6005	21,2	21,9	0,7	3
6008/6011	3,0	15,5	12,5	416
6032/6044	14,6	15,2	0,6	4

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que les substances formaldéhydogènes dosées après hydro-

* Bien entendu, ceci n'implique pas l'identité des types de conjugués dédoublés par les deux techniques d'hydrolyse.

⁹¹ E. Musso, R. Bortu et R. S. Mach, *Schweiz. med. Wschr.* 81 (1951) 1018.

lyse fermentaire reflètent bien l'état sécrétoire du cortex surrénalien.

La même conclusion est-elle valable pour la fraction hydrophile mentionnée au dernier paragraphe de la section (g)? Pour pouvoir répondre à cette question, nous avons également appliqué le test à l'ACTH. Des urines du même sujet, recueillies avant et après administration d'ACTH, ont été hydrolysées par l'enzyme (20 U./cm³, 18 heures) et ensuite extraites avec 12 fois 20 cm³ de chloroforme en réunissant les portions 1 à 6 d'une part et 7 à 12 d'autre part; cette dernière fraction représente les substances hydrophiles, difficilement extractibles.

Tableau 12. - Effet de l'ACTH sur deux fractions formaldéhydogènes urinaires, obtenues par extractions successives après hydrolyse fermentaire

Urine n°	1 ^{re} à 6 ^e extraction				7 ^e à 12 ^e extraction (fraction hydrophile)			
	Avant ACTH	Après ACTH	Différence		Avant ACTH	Après ACTH	Différence	
	mg/24 h		% du taux initial		mg/24 h		% du taux initial	
6251/53	8,6	14,1	+5,5	+64	4,3	4,1	-0,2	-5
6262/70	2,7	25,2	+22,5	+833	0,9	2,4	+1,5	+167
6345/51*	9,8	5,0	-4,8	-49	2,0	1,2	-0,8	-40
6382/83	3,8	5,7	+1,9	+50	0,7	1,8	+1,1	+157
6401/05*	5,1	3,8	-1,3	-25	1,9	1,0	-0,9	-47
6410/16	8,6	10,4	+1,8	+21	3,1	1,8	-1,3	-42
6425/31*	13,0	11,6	-1,4	-11	2,0	3,3	+1,3	+65

* Hypofonction surrénalienne

Les résultats des analyses sont groupés dans le tableau 12. Aucune corrélation n'existe entre les deux fractions. Nous avons calculé les coefficients de détermination⁸⁶ pour l'ensemble des taux, pour les taux avant et pour les taux après ACTH, pour la différence en mg/24 h. et pour la différence en pour cent du taux initial. Tous ces coefficients, sauf le dernier ($R = 0,43$), sont en-dessous de 0,30, aucun n'atteint le seuil de signification ($P > 0,05$).

Si nous considérons que le simple procédé de fractionnement employé ici n'a certainement pas effectué une séparation quantitative et que la première fraction doit avoir contenu autant de «substances hydrophiles» que la seconde, l'absence de corrélation permet d'affirmer que ces substances peu solubles dans le chloroforme n'ont pas de rapport avec la surrénale. Notre conclusion s'accorde bien avec l'observation qu'une partie des substances formaldéhydogènes urinaires échappe aux techniques d'identification des stéroïdes au moyen de la chromatographie sur papier^{53, 81}.

i) Précision du dosage après hydrolyse fermentaire

La plupart des dosages dans cette étude ont été faits à double ce qui nous a permis d'apprécier la précision (ou reproductibilité) de la technique. A partir des résultats donnés dans les tableaux 9 et 10, on obtient un écart-type entre les doubles de $\pm 0,5$ mg/l.

Dans ce calcul nous n'avons tenu compte que des hydrolyses fermentaires, en en écartant, toutefois, les séries avec 100 et 150 U./cm³, car une analyse statistique

avait confirmé que la différence entre les doubles augmentait avec la quantité d'enzyme ($P < 0,01$).

La précision est exactement la même que celle de nos méthodes de dosage pour d'autres stéroïdes urinaires, le prégnandiol ou les 17-cétostéroïdes.

VI. Méthodes évitant l'hydrolyse des corticostéroïdes

Nous avons vu comment la stabilité variable des corticostéroïdes et l'existence de plusieurs types de conjugués rendent difficile leur hydrolyse complète. Il apparaît aujourd'hui que seule une combinaison de techniques assez compliquées serait à même de réaliser ce but.

Pour éviter cette difficulté, deux méthodes ont été développées qui, en s'éloignant du schéma classique des analyses de stéroïdes urinaires, permettent la suppression de l'hydrolyse directe des corticostéroïdes conjugués. Le principe de l'une des deux méthodes est l'extraction et la colorimétrie des conjugués mêmes; l'autre effectue la transformation des corticostéroïdes en 17-cétostéroïdes avant l'hydrolyse.

A. Chromogènes Porter-Silber butylosolubles

Nous avons déjà mentionné que le *n*-butanol est employé depuis 1936 pour extraire les stéroïdes conjugués de l'urine. Les stéroïdes libres étant également solubles dans ce solvant, REDDY et coll.³⁹ l'ont utilisé pour le dosage rapide des 17,21-dihydroxy-20-céto-stéroïdes totaux dans un extrait butylique brut, déshydraté sur du sulfate et du carbonate sodiques anhydres. La réaction colorée (cf. tableau 2) est celle de PORTER et SILBER²³. Le milieu sulfurique qu'elle nécessite (18 N à 60°) donne lieu à la formation de couleurs non spécifiques dont l'intensité est d'autant plus importante que la purification de l'extrait urinaire est moins poussée. Pour éliminer cette coloration non spécifique, la réaction des essais à blanc, des étalons et des extraits est faite et avec le réactif entier (contenant la phénylhydrazine) et avec l'acide seul. En supposant que les effets soient additifs, on a basé l'évaluation colorimétrique sur la différence des deux densités optiques, mais cette correction est insuffisante. FORSHAM et coll.⁹² recommandent de l'appliquer, non aux densités optiques observées, mais aux densités optiques corrigées selon ALLEN⁴⁴, en prenant les lectures à trois longueurs d'ondes. HERTOCHÉ et coll.⁹³ ont récemment démontré d'une manière concluante, l'utilité de la combinaison des deux corrections qui diminue de beaucoup la variation technique ou apparemment physiologique des résultats, tout en augmentant les taux.

Cette dernière observation est particulièrement intéressante au point de vue chimique et elle mériterait une étude plus approfondie. Il semble⁹⁴ que l'urine con-

tienne des «chromogènes non spécifiques butylosolubles, cétoniques et non cétoniques» qui sont capables d'inhiber la réaction de PORTER et SILBER.

Tous les auteurs s'intéressant à la méthode ont reconnu l'inconvénient de baser le résultat du dosage sur la différence relativement petite de deux courbes d'absorption très semblables. Plusieurs modifications ont été proposées pour diminuer la coloration non spécifique provoquée par l'acide sulfurique^{95, 95-97}. Quelques auteurs⁹⁸⁻¹⁰⁰ ont mis en garde contre la présence occasionnelle, dans l'extrait butylique, de substances non stéroïdiques qui donnent une coloration typique ou à peu près typique, en présence du réactif. Nous en avons établi la liste suivante :

Iodure potassique
Iode
Sucres
Acide ascorbique
Quinine
Substances apparaissant dans l'urine après administration de paraldehyde, hydrate de chloral, sulfamérazine

On peut prévoir qu'il sera très difficile de trouver une modification de la méthode nous mettant à l'abri de ces sources d'erreur, sans trop perdre de la rapidité qui est son principal avantage. Ceci concerne le laboratoire. Du côté de la clinique, il faudrait arrêter quelques jours avant la récolte des urines toute médication dont on ne peut exclure l'intervention dans la réaction colorée de l'extrait butylique.

A part les points faibles de cette méthode, il y a lieu de souligner les observations de BAGGETT⁴⁵ qui a parlé d'une très bonne concordance entre les chromogènes PORTER-SILBER butylosolubles et la tétrahydrocortisone dosée après chromatographie sur papier. Pour contrôler la valeur d'une méthode simplifiée, rapide, on ne peut faire un test plus sévère; il serait important d'en connaître les résultats détaillés qui, à notre connaissance, n'ont pas été publiés*.

* «The comparison was made with the urines from two subjects. One specimen before treatment, one after cortisone administration, and one after ACTH administration to each subject was examined ... We found similar values by this method (essentially the one published by REDDY, JENKINS and THORN³⁹) and our method for tetrahydrocortisone in each of the six urines examined. The two methods agreed within about 15-20%. As you suggested, the agreement was better in the urines after ACTH and cortisone was given; here the blanks were much lower since smaller aliquots were used. I would certainly hesitate to draw any conclusions as to the general validity of the REDDY method based on these few data ... I would, however, conclude that it did measure something related quantitatively to the tetrahydrocortisone in the cases we studied. The agreement may be fortuitous since there have been many indications that the blank in the REDDY method overcorrects.» (BAGGETT, communication personnelle en janvier 1956.)

⁹⁵ W. J. REDDY, *Metabolism* 3 (1954) 489.

⁹⁶ R. W. SMITH jnr., R. C. MELLINGER et A. A. PATTI, *J. Clin. Endocr.* 14 (1954) 336.

⁹⁷ G. W. LIDDLE, D. ISLAND, A. P. RINFRET et P. H. FORSHAM, *J. Clin. Endocr.* 14 (1954) 839.

⁹⁸ R. H. SILBER et R. D. BUSCH, *J. Clin. Endocr.* 15 (1955) 505.

⁹⁹ D. A. V. M. LAMPE-HINTZEN et L. C. HUIS IN'T VELD, *J. Clin. Endocr.* 15 (1955) 1152.

¹⁰⁰ L. J. MARKS et J. H. LEFTIN, *J. Clin. Endocr.* 14 (1954) 1263.

⁹² P. H. FORSHAM, V. DI RAIMONDO, D. ISLAND, A. P. RINFRET et R. H. ORR, *Ciba Found. Coll. Endocr.* 8 (1955) 279.

⁹³ J. HERTOCHÉ, J. CRABBE, A. DUCKERT-MAULBETSCH et A. F. MULLER, *Acta Endocr.* (Copenhague) 20 (1955) 139.

⁹⁴ G. GIUSTI, A. BORCHI et U. BIGOZZI, *Rass. Neurol. Veg.* 10 (1953) 486.

Il faut également souligner que d'excellents résultats ont été rapportés par les centres où la méthode fait depuis longtemps partie de la routine de laboratoire (p.ex.^{92, 101}).

Tout bien considéré, nous partageons l'avis de MASON¹⁰². La méthode donne une réponse valable et utile lorsqu'il s'agit de déceler les variations provoquées par l'administration de l'ACTH. Quant aux taux absolus obtenus chez des sujets non traités, quelques réserves s'imposent.

B. Oxydation au bismuthate

Les méthodes de dosages mises au point par NORBYMBSKI et ses collaborateurs ont été dénommées «analyse indirecte des corticostéroïdes» par leurs auteurs^{34, 35}. Ce terme est exact, sans doute, mais sa signification est très relative. Rappelons-nous que seules les méthodes de PORTER et SILBER²³ et de GORNALL et MACDONALD²⁵ (tableau 2) sont «directes» dans le sens que la molécule entière des corticostéroïdes participe à la constitution des produits colorés, dosés par colorimétrie. Dans l'ensemble, les méthodes de NORBYMBSKI sont, à notre avis, probablement plus «directes» et mieux définies que la majorité des autres.

La raison en est la suivante: elles sont l'application judicieuse de techniques et de réactifs à action très spécifique, empruntés à la chimie organique pure.

Le bismuthate sodique (NaBiO_3) en suspension effectue la dégradation oxydative des groupements α -glycolique, α -cétoïque et α -hydroxy-carboxylique¹⁰³⁻¹⁰⁵. La liaison entre les deux atomes de carbones voisins est rompue, le groupe >CHOH est transformé en $-\text{HC}=\text{O}$, le groupe >COH en $\text{>C}=\text{O}$, le groupe $\text{>C}=\text{O}$ en $-\text{COOH}$. La réaction est complète et rapide, elle se déroule à la température ambiante et, à l'abri de la lumière, il n'y a pas de réactions secondaires gênantes. Appliquée aux corticostéroïdes, la réaction donne des 17-cétostéroïdes à partir des types I, II et VI de chaîne latérale (tableau 2)³⁰ et des 3-formoxy- et 3-hydroxystéroïdes à partir des 3-glucuroconjugués¹⁰⁶.

Le borohydride sodique (NaBH_4) a été employé pour la première fois par CHAIKIN et BROWN¹⁰⁷ pour la réduction sélective de cétones, aldéhydes et chlorures d'acides, dans des conditions douces. Par la suite, ce réactif a beaucoup servi à la réduction d'oxostéroïdes^{34, 108, 109}.

Même en présence d'un grand excès, la seule réaction produite est la transformation du groupe $\text{>C}=\text{O}$ (ou $-\text{COCl}$) en >CHOH (ou $-\text{CH}_2\text{OH}$).

En combinant ces deux procédés d'oxydation et de réduction avec l'hydrolyse au pH 0 à 100° et avec la réaction colorée des 17-cétostéroïdes au *m*-dinitro-benzène (ZIMMERMANN), NORBYMBSKI et ses collaborateurs sont arrivés aux méthodes que nous résumons dans la tableau 13.

Tableau 13. — Méthodes employant le bismuthate sodique

Explication des signes:

17-CS 17-cétostéroïdes *m*-DNB réaction de ZIMMERMANN
 = pas de changement + réaction colorée positive
 = ? transformation inconnue 0 réaction colorée absente
 plus ou moins importante ou négligeable

Combinaison	Réaction ou réactif	Effet produit sur la chaîne latérale				
		I $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	II $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{OH} \\ \text{OH} \end{array}$	V $\begin{array}{c} \text{O} \\ \text{OH} \end{array}$	VI $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{OH} \end{array}$	17-CS =O
(A)	1. pH 0/100° 2. <i>m</i> -DNB	= ? 0	= 0	= 0	= 0	= +
(B)	1. NaBiO_3 2. pH 0/100° 3. <i>m</i> -DNB	17-CS = +	17-CS = +	= = 0	17-CS = +	= = +
(C)	1. NaBH_4 2. NaBiO_3 3. pH 0/100° 4. <i>m</i> -DNB	20-OH 17-CS = +	= 17-CS = +	20-OH 17-CS = +	= 17-CS = +	17-OH = = 0
(D)	1. pH 0/100° 2. NaBiO_3 3. NaBH_4 4. NaBiO_3 5. <i>m</i> -DNB	= ? (17-CS) (17-OH) = 0	= 17-CS 17-OH = 0	= = 20-OH 17-CS +	= 17-CS 17-OH = 0	= = 17-OH = 0
(E)	1. pH 0/100° 2. NaBH_4 3. NaBiO_3 4. NaBH_4 5. NaBiO_3 6. <i>m</i> -DNB	= ? (20-OH) (17-CS) (17-OH) = 0	= = 17-CS 17-OH = 0	= 20-OH 17-CS 17-OH = 0	= = 17-CS 17-OH = 0	= 17-OH = = 0

(A) représente le dosage des 17-cétostéroïdes. Les stéroïdes 17-cétogènes sont obtenus par la différence des résultats (B) - (A). S'il existe des conjugués en C-21 du type I, ils ne seront pas dosés par cette technique. Un résultat obtenu par différence est moins précis que les deux résultats composants; l'écart-type se multiplie par 1,41.

(C) est le dosage des 17-hydroxy-corticostéroïdes.

(D) donne les 21-désoxy-17-hydroxy-20-céto-stéroïdes; comme il s'agit de taux très bas, il est recommandé de faire (E) comme essai à blanc pour éliminer la partie non spécifique de la coloration de ZIMMERMANN. Pour la même raison, on commence la série des

¹⁰¹ G. W. THORN, D. JENKINS et J. C. LAIDLAW, *Recent Progr. Hormone Res.* 8 (1953) 171.

¹⁰² H. L. MASON, *J. Clin. Endocr.* 15 (1955) 1035.

¹⁰³ L. J. HEIDT, E. K. GLADDING et C. B. PURVES, *Paper Tr. J.* 121 No. 9 (1945) 35.

¹⁰⁴ W. RICHBY, *Nature (London)* 164 (1949) 185.

¹⁰⁵ W. RICHBY, *J. Chem. Soc.* 1950, 1907.

¹⁰⁶ J. K. NORBYMBSKI et A. T. SERMIN, *Biochem. J.* 55 (1953) 876.

¹⁰⁷ S. W. CHAIKIN et W. G. BROWN, *J. Amer. Chem. Soc.* 71 (1949) 122.

¹⁰⁸ H. C. BROWN et E. J. MEAD, *J. Amer. Chem. Soc.* 75 (1953) 6263.

¹⁰⁹ J. K. NORBYMBSKI et G. F. WOODS, *Chem. & Ind.* 1954, 518.

réactions par une hydrolyse, car une petite quantité de 21-conjugués (inchangés après *D2*, mais transformés en 17-CS par *D3-4*) suffirait déjà pour fausser grossièrement le résultat.

La plus récente adjonction à cette liste de combinaisons consiste en l'élimination spécifique du groupe hydroxyle terminal de la chaîne latérale dihydroxyacétonique (type I) par réduction au zinc en présence d'acide acétique, cette transformation de I en V étant suivie de (*B*). La différence entre le résultat de (*B*) seul et de la nouvelle modification fournit une estimation des 17,21-dihydroxy-20-cétostéroïdes qui, semble-t-il, concorde bien avec le taux obtenu après hydrolyse enzymatique par la réaction de PORTER et SILBER²³ (tableau 2) (NORYMBERSKI, communication personnelle).

La spécificité et l'exactitude de ces méthodes dépendent en tout premier lieu de la réaction colorimétrique des 17-cétostéroïdes. La spécificité est très bonne. Il est vrai que le *m*-dinitro-benzène peut en principe réagir avec tout groupe CH₂ activé par le voisinage d'un groupe cétonique (ou d'un autre groupe électronégatif), mais presque toutes les substances cétoniques (stéroïdes ou non) examinées jusqu'à présent donnent une densité optique négligeable à 520 mμ, longueur d'onde de l'absorption maximum de la coloration rouge-violette qui est produite par la réaction des 17-cétostéroïdes (cf.³⁴). L'influence éventuelle de couleurs non spécifiques sera sensiblement diminuée par l'emploi de l'équation d'ALLEN⁴⁴. Du reste, les extraits obtenus après oxydation au bismuthate contiennent en général très peu de pigments urinaires; on obtient souvent des courbes d'absorption à peu près identiques à celle de l'androsterone en solution pure, servant d'étalon.

L'exactitude des taux absolus est gênée par les différences de pouvoir chromogène que nous avons déjà discutées (chapitre III). La même raison rend difficile une comparaison exacte, quantitativement valable, des différents procédés. La tétrahydrocortisone, par exemple, est dosée comme testane-3α-ol-11,17-dione dans le procédé (*B*) et comme testane-3α,11β-diol-17-one dans le procédé (*C*) – deux substances qui ont des pouvoirs chromogènes assez différents (cf. tableau 3).

Etude de quelques facteurs d'ordre technique du dosage des 17-cétostéroïdes

Les conditions d'hydrolyse et le solvant d'extraction préconisés par NORYMBERSKI diffèrent par quelques détails de la technique utilisée dans notre laboratoire pour le dosage des 17-cétostéroïdes. Il était important de savoir si ces différences auraient une influence sur le rendement.

Nous avons comparé l'éther (E₀) et le dichlorométhane* (E₁) comme solvants d'extraction, l'hydrolyse sans (R₀) et

avec (R₁) adjonction de 0,1 vol. de métabisulfite sodique à 30 %, l'hydrolyse de 15 minutes avec 0,1 vol. (H₀) et l'hydrolyse de 10 minutes avec 0,33 vol. (H₁) d'acide chlorhydrique concentré. Les symboles entre parenthèses facilitent l'exposé de l'expérience, car il s'agit d'une «expérience factorielle avec trois facteurs (*E*, *R* et *H*) à deux niveaux»¹¹¹. L'étude montre l'utilité de l'organisation rationnelle d'une expérience biochimique, suivant les principes statistiques.

Il existe huit combinaisons des facteurs étudiés. Nous les énumérons en employant les signes conventionnels d'usage¹¹¹:

(1)	R ₀ H ₀ E ₀	<i>r</i>	R ₁ H ₀ E ₀
<i>e</i>	R ₀ H ₀ E ₁	<i>er</i>	R ₁ H ₀ E ₁
<i>h</i>	R ₀ H ₁ E ₀	<i>hr</i>	R ₁ H ₁ E ₀
<i>eh</i>	R ₀ H ₁ E ₁	<i>ehr</i>	R ₁ H ₁ E ₁

En prenant 16 portions d'une même urine, chaque combinaison de facteurs est appliquée deux fois. En répétant l'expérience sur 5 échantillons d'urine, on arrive à un total de 80 analyses dont nous donnons les résultats dans le tableau 14.

Tableau 14. – Effet de trois facteurs techniques sur le rendement des 17-cétostéroïdes urinaires (taux en mg/l)

Urine n°	Combinaisons de facteurs *							
	(1)	<i>e</i>	<i>h</i>	<i>eh</i>	<i>r</i>	<i>er</i>	<i>hr</i>	<i>ehr</i>
8013	6,2	6,1	5,9	6,1	5,4	4,7	5,7	6,4
	4,8	4,8	5,8	5,8	4,8	4,6	5,8	5,8
8015	10,5	7,7	12,5	10,7	8,3	8,3	11,1	11,3
	10,8	9,7	11,3	10,7	8,0	8,5	11,0	7,5
8017	8,2	8,7	8,7	9,8	7,0	6,6	8,4	9,3
	7,6	8,7	8,5	10,1	6,6	7,4	8,2	9,2
8050	10,7	15,5	14,2	16,3	12,4	11,7	14,6	13,0
	13,1	14,2	14,9	16,2	13,6	11,7	13,9	13,6
8063	11,4	14,4	11,6	11,4	10,4	9,7	11,1	10,7
	12,8	11,5	12,2	12,3	10,9	10,3	11,0	11,4
Moyenne	9,61	10,13	10,56	10,94	8,74	8,35	10,08	9,82

* Explication dans le texte

Les avantages d'un tel arrangement sont multiples. Les résultats se prêtent facilement à une analyse de variance très poussée. L'expérience répond simultanément à toute une série de questions. Chaque réponse est basée sur l'ensemble des 80 résultats. Par exemple, en déduisant de tous les termes avec H₁ tous ceux avec H₀, on obtient la différence entre les deux conditions d'hydrolyse :

$$H = h + eh + hr + ehr - (1) - e - r - er.$$

De même, la différence entre l'extraction à l'éther et au dichlorométhane est donnée par

$$E = e + eh + er + ehr - (1) - h - r - hr$$

et l'interaction entre ces deux facteurs par

$$E \times H = (1) + eh + r + ehr - e - h - er - hr.$$

Les constatations suivantes se dégagent de l'analyse statistique des résultats.

¹¹¹ A. LINDER, *Planen und Auswerten von Versuchen*, Birkhäuser, Basel 1953.

* Nous avons préféré ce solvant au bichlorure d'éthylène adopté par NORYMBERSKI en suivant la technique de DREKTER et coll.¹¹⁰.

¹¹⁰ I. J. DREKTER, A. HEISLER, G. R. SCISM, S. STERN, S. PEARSON et T. H. MCGAVACK, *J. Clin. Endocr.* 12 (1952) 55.

1. La précision des dosages à double est de $\pm 0,78$ mg/l.
2. Il y a une légère indication comme quoi les urines réagiraient différemment aux changements de conditions ($P < 0,05$).
3. Il n'y a pas d'interaction entre les facteurs. On peut donc en changer un sans crainte de modifier l'effet d'un autre.
4. Il n'y a pas de différence entre les deux solvants (éther et dichlorométhane) employés pour l'extraction.
5. La présence du métabisulfite diminue les taux, en moyenne de 11 % ($P < 0,001$).
6. L'hydrolyse plus courte avec l'acide plus concentré donne des taux plus hauts, de 12 % en moyenne ($P < 0,001$).

VII. Conclusions

Arrivé à la fin de cet exposé comprenant des bases théoriques, des techniques différentes et des faits expérimentaux, nous ne croyons pas qu'il soit utile de recommander ou de déconseiller spécialement une méthode de dosage plutôt qu'une autre. Chacune d'entre elles dose un groupe différent de corticostéroïdes. La spécificité et l'exactitude sont déterminées, dans une large mesure, par la purification plus ou moins poussée précédant la réaction colorimétrique.

Le choix d'une technique particulière dépendra toujours du but poursuivi et des moyens disponibles. Toutes les techniques décrites sont bonnes pour indiquer la réaction de la corticosurrénale à l'administration de corticotrophine ou pour démontrer l'augmentation du taux urinaire à la suite de fortes doses de corticostéroïdes. Pour les analyses cliniques n'ayant que ces buts, on profitera de la simplicité et de la rapidité qu'offrent certaines techniques. En revanche, on n'osera pas toujours faire prévaloir ces mêmes considérations pratiques s'il s'agit d'étudier d'autres problèmes sur un terrain moins exploré.

VIII. Résumé

Nous avons exposé les principes gouvernant l'analyse des corticostéroïdes urinaires. Les particularités des réactions colorimétriques disponibles à ce jour ont été décrites et discutées. Partant d'un développement de la théorie mathématique de l'extraction, nous avons défini les caractéristiques de l'extraction efficace. Les méthodes

de fractionnement des extraits et les difficultés de l'hydrolyse des conjugués urinaires ont été résumées. Nous avons discuté en détail les méthodes de dosage qui permettent d'éviter l'hydrolyse directe des corticostéroïdes conjugués.

Une étude expérimentale nous a montré que l'hydrolyse des corticoïdes formaldéhydogènes au pH 1,7 à la température ambiante donne $13,9 \pm 6,1$ % des taux obtenus après hydrolyse par une préparation de β -glucuronidase bactérienne. Les substances libérées par hydrolyse fermentaire sont stables au pH 1,7 à 37°. La concentration optimale de glucuronidase est de 20 unités (FISHMAN) par cm³. L'hydrolyse est pratiquement terminée après 5 à 10 heures à 37°. L'état d'équilibre de la réaction s'établit à une concentration négligeable de glucuroconjugués intacts. L'administration de corticotrophine augmente fortement les taux obtenus après hydrolyse fermentaire; l'étude détaillée des résultats permet de conclure qu'ils reflètent en effet l'état sécrétoire de la corticosurrénale. Il n'y a aucune corrélation entre les taux de cette fraction et ceux d'une fraction hydrophile, difficilement extractible par le chloroforme, qui par conséquent ne semble avoir aucun rapport avec la surrénale. L'écart-type des dosages à double a été de $\pm 0,5$ mg/l dans cette étude. La différence entre les dosages à double augmente proportionnellement à la concentration d'enzyme.

Dans une expérience factorielle, nous avons étudié l'influence de trois facteurs d'ordre technique, chacun d'eux à deux niveaux, sur le rendement des 17-cétostéroïdes. Aucune différence ne s'est révélée entre l'éther et le dichlorométhane, employés comme solvants d'extraction. L'hydrolyse à reflux pendant 10 minutes avec 0,33 vol. d'acide chlorhydrique concentré donne des taux plus hauts (de 12 %) que l'emploi de 0,1 vol. pendant 15 minutes. L'adjonction de métabisulfite sodique diminue le rendement (de 11 %). Aucune interaction ne s'est montrée entre ces trois facteurs. L'écart-type des dosages à double a été de $\pm 0,8$ mg/l dans cette étude.

Nous tenons à remercier très vivement Messieurs les Professeurs H. DE WATTEVILLE (Clinique universitaire de Gynécologie et d'Obstétrique) et R.S. MACH (Clinique thérapeutique universitaire) de leur amitié, de leur soutien et de leur intérêt dans notre travail.

C'est avec plaisir que nous rendons hommage à Mademoiselle A. RIONDEL en la remerciant de son excellente et inlassable collaboration.