

# Dosage chimique et métabolisme des hormones stéroïdes du cortex surrénal

Autor(en): **Neyman, Benjamin**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles =  
Bulletin der Naturforschenden Gesellschaft Freiburg**

Band (Jahr): **43 (1953)**

PDF erstellt am: **21.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-308998>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Dosage chimique et métabolisme des hormones stéroïdes du cortex surrénal\*

par BENJAMIN NEYMAN

## TABLE DES MATIÈRES

1. Introduction . . . . .	174
2. Structure et constitution chimique des corticostéroïdes. . . . .	177
3. Biosynthèse et métabolisme des corticostéroïdes . . . . .	181
4. Méthodes de dosage et leurs sensibilités . . . . .	185
5. Partie expérimentale . . . . .	192
6. Bibliographie. . . . .	215

## INTRODUCTION

Les capsules surrénales sont deux glandes de couleur jaunâtre, situées au-dessus des reins. Elles sont indispensables à la vie, car la surrénalectomie effectuée sur des animaux entraîne infailliblement la mort à plus ou moins brève échéance. Ces glandes ont été décrites pour la première fois par EUSTACHIUS, en 1563, dans son livre : « De glandulis quae renibus incumbunt » (Selye, Textbook of Endocrinology, p. 86). Une description anatomique exacte des glandes surrénales chez l'homme a été faite par WINSLOW (1752) (Thaddea). Lors de l'autopsie du corps humain, faite souvent plusieurs jours après la mort, la médullaire de la glande sujette à l'autolyse s'était transformée en un liquide visqueux enfermé dans un cortex plus résistant, et comprenant les  $\frac{9}{10}$  de la glande entière. Appelées pour cela « capsules surrénales », ces glandes se composent donc de deux parties : une zone corticale ou cortex, jaune, ferme et striée, et une zone médullaire, molle, centrée sur une grosse veine. Ces deux zones correspondent à deux glandes différentes.

---

\* Travail imprimé avec subside du Conseil de l'Université de Fribourg.

La structure anatomique des surrénales a été ensuite étudiée et décrite par PAPPENHEIM (l. c.) 1840, SCHWAGER-BARDELEBEN (l. c.) 1841, HENLE (l. c.) 1841, ARNOLD (l. c.) 1866. ECKER (Biedl, p. 407) 1846, de Bâle, a constaté le premier qu'il s'agissait de tissus glandulaires, c'est-à-dire d'une « glande sanguine » à sécrétion interne. Les premières indications sur leur action probable datent déjà de 300 ans environ. En 1855, THOMAS ADDISON attirait l'attention du corps médical sur certains cas cliniques manifestant le syndrome d'une insuffisance cortico-surrénalienne et sur des lésions surrénales de caractère pathogénique. La description faite par ADDISON de la maladie qui porte maintenant son nom, a été de la plus haute importance pour le développement ultérieur de l'endocrinologie. C'est d'une part grâce à la découverte de VULPIAN qui a trouvé, en 1856, la réaction de la médullaire avec le chlorure ferrique, et d'autre part grâce à HENLE qui a trouvé, en 1865, la réaction chromique, que l'on a pu isoler la substance active de la médullaire. Du même coup, on obtenait aussi les premières indications sur sa structure éventuelle. Vu que l'on connaissait des réactions semblables du chlorure ferrique et du bichromate sur la pyrocatechine, on a pu établir la constitution de cette hormone, nommée *adrénaline*, puis en faire la synthèse. En ce temps-là, toute l'attention des savants était concentrée sur la médullaire et son action dans l'organisme. L'asthénie caractéristique des malades addisoniens faisait conclure d'abord à une influence de la médullaire, puisque l'adrénaline exerce une action positive sur l'adynamie. Mais les expériences faites sur des animaux surrénalectomisés ont démontré l'effet défavorable de l'adrénaline. Comme on l'a mentionné plus haut, la glande surrénale comprend deux parties distinctes, et en extirpant l'une ou l'autre de ces parties, BIEDL (Biedl, p. 474) a observé que l'asthénie se produisait par l'extirpation de la partie correspondant au cortex. Ce n'est qu'en 1925-26 que les travaux sur le cortex ont été repris et ont conduit dans l'espace de dix ans à des résultats positifs importants dus à de nombreux groupes de savants comme STEWART et ROGOFF, SWINGLE et PFIFFNER, WINTERSTEINER et VARS, BRITTON et SILVETTE, HARTMANN et collaborateurs (1926-28), THADDEA, VERZAR et LASZT, LOEB, LONG et coll. (1940), SELYE (Stress), HENCH, KENDALL et bien d'autres. SWINGLE et PFIFFNER ont réussi en 1931 à préparer un extrait de cortex nommé *cortine*, avec lequel on pouvait contrecarrer les effets

de la surrénalectomie. KENDALL et ses collaborateurs à Rochester, ainsi que REICHSTEIN et collaborateurs à Bâle et WINTERSTEINER à New York, sont parvenus à isoler de la cortine 29 substances différentes appartenant au groupe chimique des stéroïdes. Six de ces stéroïdes se distinguent par leur activité biologique, semblable à celle exercée par la cortine. Certains auteurs croient pouvoir affirmer qu'aucun de ces stéroïdes ne peut remplacer l'extrait corticosurrénalien de façon satisfaisante. On a pu constater des troubles des métabolismes aussi bien organique qu'inorganique chez des sujets en déficience corticosurrénalienne. Il s'est avéré, d'autre part, que parmi les stéroïdes isolés, certains influençaient surtout le métabolisme inorganique. Aussi a-t-on admis l'existence de deux groupes d'hormones produites par le cortex surrénal : l'un régissant le métabolisme organique, l'autre régissant le métabolisme inorganique (Selye H., Brit. Med. Journ. 1950). Les résultats des expériences faites récemment ont prouvé que l'on pouvait rétablir ces deux métabolismes à l'aide de la corticostérone (Conn).

On attache donc une grande importance aux procédés permettant l'identification de ces hormones dans l'urine, en vue de l'étude du fonctionnement du cortex surrénal, et nous possédons actuellement un grand nombre de méthodes permettant de déterminer leur concentration dans l'urine. Pour ce qui est de leur utilisation clinique, ces méthodes analytiques n'ont cependant qu'une valeur relative, vu que les réactions chimiques qui sont à la base du dosage quantitatif, ne sont pas spécifiques.

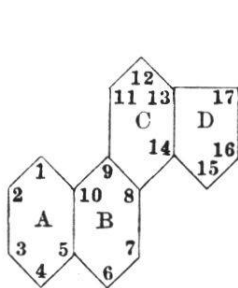
En employant les réactions de fluorescence de quelques hormones surrénales avec le sulfate diméthylique (DHÉRÉ et LASZT, C. R. Acad. Sci.), nous avons cru pouvoir contribuer dans une certaine mesure à combler cette lacune, en établissant une méthode de dosage de la corticostérone, de la désoxycorticostérone, de la 11-désoxy-17-hydroxycorticostérone et de la 17-hydroxycorticostérone, d'une sensibilité de 1 à 0,3  $\gamma$  pour l'urine aussi bien que pour les tissus du cortex, et en appliquant les méthodes chromatographiques élaborées tout récemment, comme moyen de séparation de ces hormones.



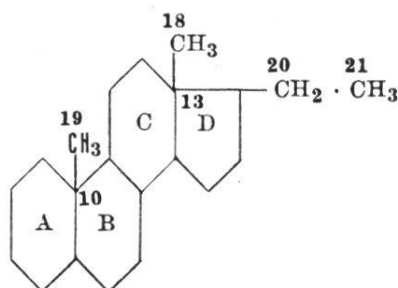
## Structure et constitution chimique des corticostéroïdes

Grâce aux travaux de KENDALL, REICHSTEIN et WINTERSTEINER, on a isolé de la cortine naturelle 29 stéroïdes, dont six corticostéroïdes, que l'on désigne aussi comme corticoïdes, possédant des propriétés physiologiques actives, ainsi que le cholestérol, la progestérone et d'autres corps actifs comme l'androstérone et la déhydroisoandrostérone, qui ne neutralisent pas les effets consécutifs à la surrénalectomie, mais influencent fortement les symptômes sexuels masculins secondaires. Tous les autres corps isolés sont des stéroïdes inactifs.

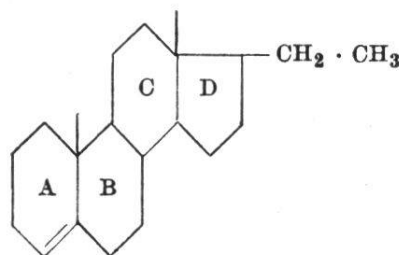
Les recherches effectuées par ces savants et d'autres chimistes ont permis d'établir la structure et la constitution chimique de ces stéroïdes, qui dérivent du pregnane, de formule brute  $C_{21}H_{36}$ , que l'on obtient en fixant sur l'hydrocarbure saturé, le cyclopentanoperhydrophénantrène, au carbone 13 un radical méthyle portant le N° 18, au carbone 10 un radical méthyle portant le N° 19 et au carbone 17 la courte chaîne latérale  $CH_2CH_3$  dont les deux carbones portent respectivement les N°s 20 et 21. Sous sa forme non saturée, c'est-à-dire avec double liaison en position 4-5, il se présente comme  $\Delta_4$ -pregnène.



Cyclopentanoperhydro-  
phénantrène

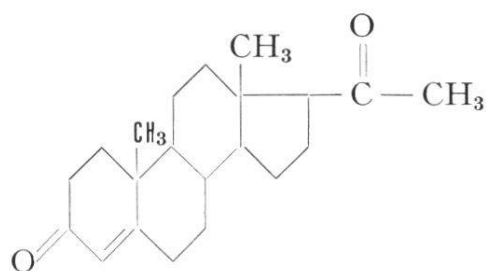


Pregnane

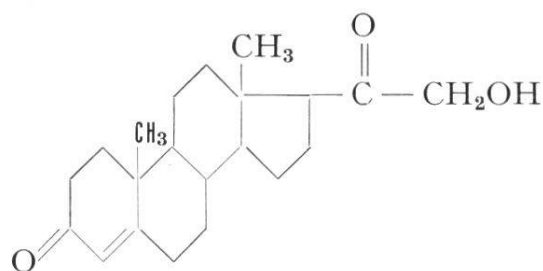


$\Delta_4$ -Pregnène

Les six stéroïdes actifs mentionnés ci-dessus comptent donc comme la progestérone 21 atomes de carbone dans leur molécule et possèdent un groupe hydroxyle, qui paraît indispensable pour leurs propriétés biologiques, puisque la progestérone elle-même n'a qu'un pouvoir actif très réduit, tandis qu'elle exerce une action indirecte, en se transformant en d'autres corticoïdes à caractère alcoolique.



Progesterone



Hydroxy-progesterone

On retrouve en effet dans les six corticoïdes le groupe carbonyle en position 3 de la progestérone, ainsi que la double liaison en position 4-5, tandis que la chaîne latérale au carbone 17- $\text{CH}_2\text{CH}_3$  s'y retrouve transformée en groupement  $\alpha$ -cétolique  $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ .

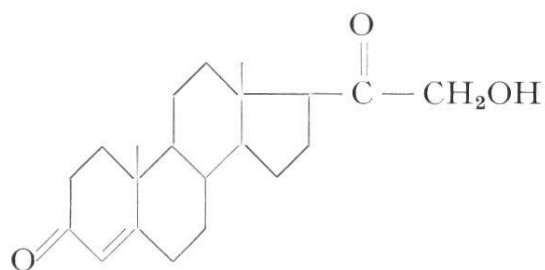
Ces six corticoïdes sont caractérisés aussi par la présence ou l'absence d'une fonction carbonyle ou hydroxyle au carbone 11, ainsi que par la présence ou l'absence d'un hydroxyle au carbone 17.

Le groupe cétolique en position 17, ainsi que le carbonyle en position 3 conjugué avec la double liaison en 4-5 sont doués de pouvoir réducteur et capables de réduire l'acide phosphomolybdique, les sels de cuivre, le ferricyanure de potassium et les sels d'argent en solution alcaline : le groupement cétolique  $\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$  est en outre oxydable par l'acide periodique avec libération de formol, ce qui permet un dosage par des méthodes analytiques oxydo-réductives (Engel).

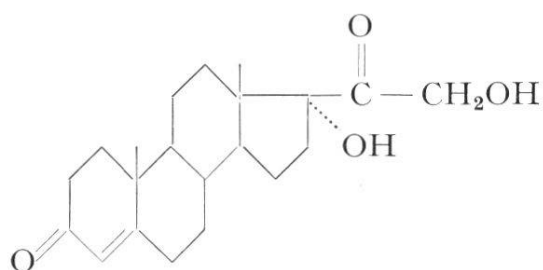
Ces corticoïdes présentent une bande d'absorption de 240  $\text{m}\mu$ , qui est caractéristique pour les cétones  $\alpha$ ,  $\beta$ -non saturées.

C'est précisément cette configuration qui confère aux corticoïdes leurs propriétés biologiques actives, d'après lesquelles on les a subdivisés en deux groupes principaux ; les minéralo-corticoïdes et les glyco-corticoïdes (Selye, Brit. Med. Journ. 1950).

Le groupe des minéralocorticoïdes est formé par la désoxycorticostérone dénommée aussi cortéxone et la 11-désoxy-17-hydroxycorticostérone dénommée désoxycortisone. Ces deux corticoïdes régissent essentiellement le métabolisme hydrominéral.



Désoxycorticostérone



11-désoxy-17-hydroxycorticostérone

Les quatre autres corticoïdes, à savoir : la corticostérone, la déhydrocorticostérone, la 17-hydroxycorticostérone dénommée aussi cortisol et la 11-déhydro-17-hydroxycorticostérone ou Comp. E de KENDALL qui fut nommé par la suite cortisone, forment le groupe des 11-oxycorticoïdes ou glycocorticoïdes. Ces corticostéroïdes agissent sur le métabolisme des hydrates de carbone et la conversion des acides aminés.

L'action biologique proteino-glucidique est particulièrement prononcée pour la cortisone et le cortisol.

C'est la 11-déhydro-17-hydroxycorticostérone qui a été isolée d'abord par WINTERSTEINER et PFIFFNER (1935), et appelée Comp. F. Elle s'est avérée identique au Comp. E de KENDALL (Mason et coll. 1936) qui l'a isolée en 1936, et à la substance Fa isolée par REICHSTEIN (1936-37) et ses collaborateurs qui ont démontré, en 1936, sa structure stéroïde.

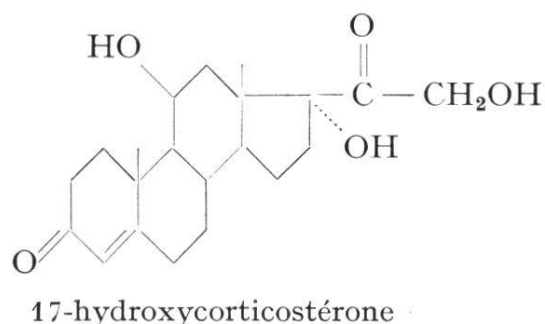
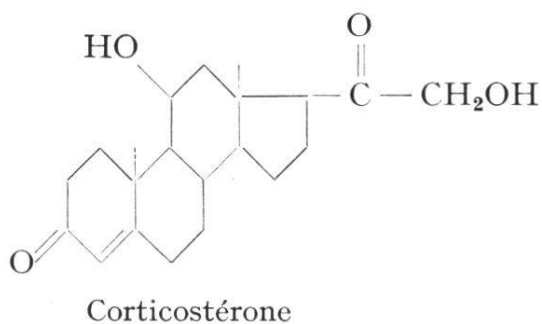
La corticostérone a été isolée par REICHSTEIN et coll. à fin 1936 et préparée à l'état pur en 1937.

KENDALL (Mason et coll. 1937) confirme en 1937 l'identité de sa substance B avec la corticostérone.

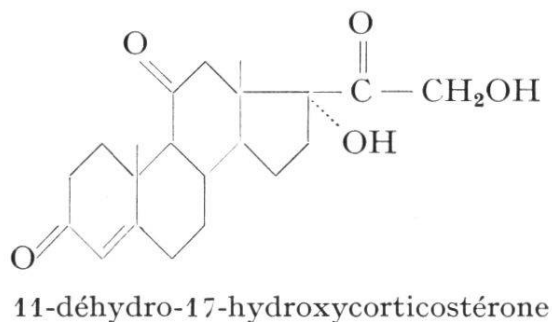
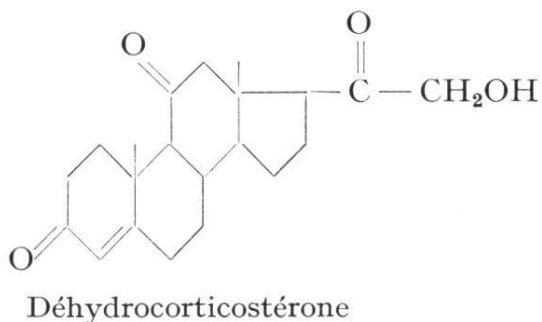
La constitution chimique de la corticostérone a été établie d'abord par KENDALL (J. Biol. Chem.) et ensuite par REICHSTEIN (Helv. Chim. Acta 21, 161), qui trouve un nouvel argument en faveur de l'appartenance de la corticostérone à la lignée des stéroïdes dans la préparation de la 21-hydroxyprogestérone en partant de la stigmastérine.

C'est en poursuivant ses recherches en vue de la synthèse des composés déjà connus, que REICHSTEIN est parvenu en 1937 à synthétiser la substance citée ci-dessus ; substance très active, dont l'action sur des animaux surrénalectomisés était beaucoup plus puissante que celle des corticostéroïdes naturels : c'était la désoxycorticostérone (Steiger et Reichstein) ou DOC en abrégé. Ce n'est que plus tard que ce même chimiste a montré que la DOC se forme également dans le cortex surrénal (Helv. Chim. Acta 21, 1197).

La 17-hydroxycorticostérone a été isolée par REICHSTEIN (Helv. Chim. Acta 20) en 1937, et désignée sous le nom de substance M. Elle était identique au Comp. F isolé par KENDALL la même année (J. Biol. Chem.).



En 1937, REICHSTEIN (Helv. Chim. Acta 20, 953) a préparé la déhydrocorticostérone en partant de la corticostérone, et en 1938 il a isolé cette substance d'extraits corticosurréaliens (Helv. Chim. Acta 21, 1197) ; elle avait été trouvée auparavant par KENDALL qui l'avait nommée Comp. A (Mason et coll.).



A la fin de l'année 1938 c'est encore REICHSTEIN (Helv. Chim. Acta 21, 1209) qui a isolé la 11-désoxy-17-hydroxycorticostérone qu'il a désignée sous le nom de Substance S.

Il a pu préparer cette substance par synthèse partielle en 1941, la déhydrocorticostérone en 1943, et la corticostérone en 1944.

C'est en 1946 que SARETT a réussi sa première synthèse partielle de la cortisone, en partant de l'acide désoxycholique et tout récemment WOODWARD, SONDEHEIMER et TAUB ont réussi à faire la synthèse totale de cette substance.

On peut diviser les corticostéroïdes quant à leur structure en trois groupes, à savoir : 1° le groupe ayant C<sub>21</sub>O<sub>3</sub> dans la molécule, comme la désoxycorticostérone, 2° le groupe des C<sub>21</sub>O<sub>4</sub> comprenant la 11-désoxy-17-hydroxycorticostérone, la corticostérone et la déhydrocorticostérone, et 3° le groupe des C<sub>21</sub>O<sub>5</sub> comprenant la 17-hydroxycorticostérone et la 11-déhydro-17-hydroxycorticostérone.

On remarque certaines différences des propriétés physiques allant de pair avec les différences structurales ; c'est ainsi que les

corticostéroïdes du groupe  $C_{21}O_5$  sont plus hydrosolubles (Reichstein, Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden) que ceux des groupes de  $C_{21}O_4$  et  $C_{21}O_3$ , ce qui n'est pas sans importance pour la séparation des extraits corticosurrénaux et surtout pour leur fractionnement chromatographique.

Tab. 1. Point de fusion, poids moléculaire et pouvoir rotatoire (D) des corticostéroïdes

Dénomination	Appellation nouvelle	Composé			Point de fusion	Poids moléculaire	D dans l'éthanol
		Reichstein	Kendall	Wintersteiner			
Désoxycorticostérone	Cortéxone	Q			142° C	330,45	178°
11-désoxy-17-hydroxycorticostérone	Désoxycortisone	S			213-217° C	346,45	—
Corticostérone		H	B		180-182° C	346,45	223°
17-hydroxycorticostérone	Cortisol	M	F		217-220° C	362,45	167°
11-déhydrocorticostérone			A		178-180° C	344,4	299°
11-déhydro-17-hydroxycorticostérone	Cortisone	Fa	E	F	215° C	360,5	209°

## Biosynthèse et métabolisme des corticostéroïdes

Certains auteurs comme REICHSTEIN (1937) et MARKER avaient émis des hypothèses en vue d'expliquer la genèse des hormones stéroïdes. Ces hypothèses n'ayant pas été confirmées expérimentalement furent abandonnées. Nombreux sont pourtant ceux qui pensent que le cholestérol tissulaire serait le produit d'origine des hormones stéroïdes. Des essais et des observations faits par SAYERS G., SAYERS M. A., LIANG, LONG, par LONG, par MILLER, EVERETT, par CLAESSEON et HILLARP, par RONDONI semblent prouver que le



cholestérol serait en effet la source chimique de ces hormones. C'est BLOCH qui apporta une preuve irréfutable à l'appui de cette idée en administrant à une femme enceinte du deutéro-cholestérol. Il a pu par la suite isoler de l'urine de cette patiente du deutéropregnanediol.

SRERE et collaborateurs ont démontré d'autre part que le cholestérol est formé dans les glandes surrénales par condensation d'acétates. Des perfusions de surrénales de bœuf avec du sang contenant de l'ACTH, en présence soit d'acétate, soit de cholestérol libre marqué au C-14, montrent que la 17-hydroxycorticostérone et la corticostérone isolées des perfusats étaient radioactives (Zaffaroni, Hechter et Pincus), et avaient le même nombre de charges par milligramme et par minute (c. m. m.) que celui que l'on détermine pour des substances ordinaires dans des conditions identiques. Ce qui semble prouver que l'acétate et le cholestérol sont transformés par les glandes surrénales en corticostéroïdes.

A la lumière de ces faits, il n'est pas inconcevable que le cholestérol soit un produit intermédiaire dans les réactions qui mènent à la synthèse des corticoïdes depuis l'acétate. Il n'a toutefois pas encore été déterminé si le cholestérol doit être considéré comme un intermédiaire obligatoire dans la genèse des stéroïdes.

SELYE, d'autre part, intercale la pregnénolone comme produit intermédiaire entre le cholestérol et les stéroïdes surrénaux.

Au cours de ces dernières années, des essais ont été faits par PINCUS (Hechter et coll. 1949-50) et collaborateurs, essais qui jettent une lumière nouvelle dans ce domaine si peu exploré. Des surrénales de vaches et de moutons ont été perfusées avec du sang *in vitro* dans diverses conditions. Au premier abord, c'est l'influence de l'ACTH sur la biosynthèse des corticoïdes qui a été examinée. La perfusion de glandes surrénales avec du sang animal était faite : 1<sup>o</sup> sans addition d'ACTH, et 2<sup>o</sup> avec addition d'ACTH. Il résulte de ces essais un accroissement considérable des substances formaldéhydogéniques dans les perfusats, accroissement dû à l'afflux de stéroïdes synthétisés durant la perfusion. Bien que la synthèse des corticoïdes ait lieu même sans ACTH, on peut constater que la présence de cette substance accroît le rendement d'environ 700-800 %. Des perfusions faites soit avec du sang entier, soit avec des mélanges de sang et de plasma, soit avec du plasma seul, montrent que le



plasma ne transporte pas assez d'oxygène pour permettre la stéroïdogénèse, mais que ce sont les globules rouges du sang qui contiennent un co-facteur indispensable pour ce processus bio-synthétique se basant sur un système enzymatique des glandes perfusées. Des analyses chromatographiques avec fractionnement ont permis d'établir que les corticoïdes produits étaient surtout : la 17-hydroxycorticostérone et la corticostérone ainsi que la déhydrocorticostérone et la cortisone. La désoxycorticostérone s'y trouve dans la proportion la plus faible. Tandis que la 17-hydroxycorticostérone et la corticostérone sont les deux composés les plus importants que l'on obtient par la stimulation avec l'ACTH, la désoxycorticostérone semble s'y trouver en quantités égales avec et sans ACTH.

D'autre part, des glandes perfusées avec de la DOC, fournissent de la corticostérone (l. c.), et des glandes perfusées avec la 11-désoxy-17-hydroxycorticostérone, donnent la 17-hydroxycorticostérone (l. c.), tandis que la corticostérone ne subit plus de transformation par la perfusion. Par ces faits, la bio-oxygénation en C-11 des stéroïdes est donc démontrée d'une façon incontestable, et confirmée par des essais effectués avec des tranches de surrénales et des homogénisats (Savard), ainsi que par la perfusion des glandes. L'organe spécifique de cette réaction paraît être la surrénale : le foie et le placenta (humain) donnent des résultats négatifs (Hechter et coll., Rec. Progr. in Horm. Res. 6, 226). Comme il sera rapporté plus bas, la DOC subit dans le foie une dégradation, qui n'aboutit pas à la corticostérone.

La surrénale qui réalise l'hydroxylation en C-11 des stéroïdes comprenant 19 et 21 atomes de carbone ne réalise pas nécessairement celle de tous les stéroïdes, comme il ressort d'un tableau comparatif emprunté à HECHTER (l. c.) et collaborateurs.

### **Spécificité de la surrénale envers l'hydroxylation (11) des stéroïdes**

1. 11-désoxycorticostérone —————> corticostérone
2. 11-désoxy-17-hydroxy-  
corticostérone —————> 17-hydroxycorticostérone
3.  $\Delta_4$ -androstène-3, 17-dione  $\begin{matrix} \nearrow & & \rightarrow & 11\text{-OH-}\Delta_4\text{-androstène-3, 17-dione} \\ \searrow & & \rightarrow & 11\text{-OH-androstane-3, 17-dione} \end{matrix}$
4. Androstérone —————> 11-hydroxy-androstérone
5. Progestérone —————> Produits hydroxylés en C-11

6. Vinyl-testostérone —————→ Pas d'hydroxylation en C-11  
 7.  $\Delta_4$ -pregnène-17, 20,  
 21-triol-one-3 —————→ Pas d'hydroxylation en C-11

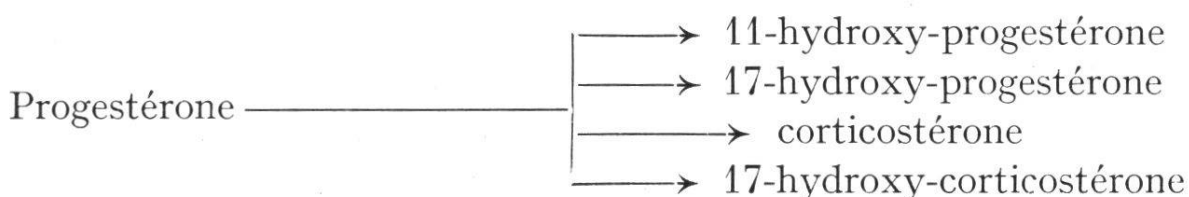
### L'hydroxylation au C-17 des corticostéroïdes

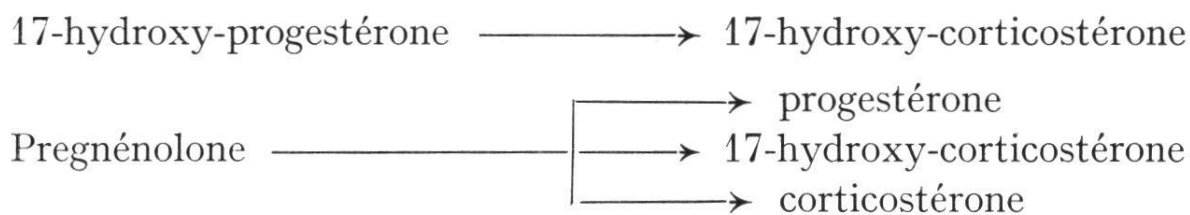
Des considérations qui précèdent il ressort, que ni la corticostérone ni la DOC n'ont pu être hydroxylées en C-17, dans les meilleures conditions de perfusion, et ces mêmes auteurs (Hechter et coll., Rec. Progr. in Horm. Res., 6, 233) concluent que la surrénale ne possède pas de système spécifique capable d'introduire un groupe hydroxyle en C-17 dans les stéroïdes à 21 atomes de carbone, directement. Mais ils supposent que la formation de la chaîne latérale céto-alcoolique pourrait résulter de la condensation de substances actives intermédiaires provenant du métabolisme cellulaire, avec un stéroïde à 19 atomes de carbone, susceptible de fournir la chaîne  $\alpha$ -cétoalcoole en une seule réaction. Des essais de perfusion avec l'androstérone et la déhydro-isoandrostérone en présence ou non d'ACTH, mais combinés avec des métabolites différents comme l'ascorbate, le succinate, le malate, le citrate, le lactate et le propylène-glycol n'ont pu confirmer cette hypothèse.

Ces auteurs (Hechter et coll., Rec. Progr. in Horm. Res., 6, 234) ont alors envisagé que la présence du groupement hydroxyle au C-21 pût empêcher l'hydroxylation en C-17 dans les fonctions  $\alpha$ -cétoalcooles ressemblant à la DOC et la corticostérone. Aussi, ont-ils soumis à la perfusion la progestérone, qui est le stéroïde équivalent de la DOC, excepté le groupe hydroxyle au C-21, ainsi que la 17-hydroxy-progestérone et la pregnénolone.

Tandis que dans les perfusats avec la pregnénolone c'est la progestérone qui avait prévalu, la reprise huit fois répétée de la perfusion avec les perfusats, a donné la prépondérance à la 17-OH-corticostérone et à la corticostérone.

### Produits de perfusion obtenus avec des stéroïdes à 21 C (l. c.)





Quant à la déhydrocorticostérone et la cortisone, elles paraissent être les dérivés secondaires de la corticostérone et de la 17-hydroxy-corticostérone, et leur présence dans les perfusats faits avec l'ACTH semble indiquer l'existence d'un système surrénalien capable d'oxyder le groupe hydroxyle (11) en fonction cétonique. On peut conclure que la pregnénolone serait réellement le précurseur des corticostéroïdes avec la progestérone comme produit intermédiaire, puisque la glande surrénale paraît être l'organe ayant la capacité d'effectuer l'hydroxylation en C-11, C-17, C-21 et de former la fonction  $\alpha$ ,  $\beta$ -cétonique non saturée.

Il n'est toutefois pas possible à ce jour de tracer un tableau précis de la corticostéroïdogénèse, et l'on s'attend à ce que les travaux en cours de nombreux chercheurs apportent de nouveaux éléments dans ce domaine.

## Méthodes de dosage

Des travaux de SELYE sur le syndrome et les maladies d'adaptation comme réaction aux agressions variées auxquelles l'organisme est exposé, et que l'on désigne par le mot anglais « stress », il ressort que le cortex surrénal a dans la physiologie et la pathologie une importance primordiale. Cet organe s'est avéré être le lieu d'élaboration des hormones qui règlent la plupart des métabolismes.

De ce fait, il était nécessaire d'élaborer des méthodes analytiques permettant de suivre les troubles cortico-surrénaux par l'examen des éliminations urinaires.

Avec les tests biologiques (test du froid de SELYE (1938) et SCHENKER, test du glycogène (Reinecke), test anti-insulinique (Jensen), test de survie (Hartmann 1930, Cartland), test antitoxique (Eversole 1942, Parkins, Selye 1940) et bien d'autres), on a trouvé dans l'urine des substances agissant comme les hormones surrénales. Et ce n'est qu'ensuite qu'on a commencé à élaborer des méthodes chi-

miques pouvant suppléer aux tests biologiques bien souvent longs à exécuter et coûteux.

Le fait que, durant ces dernières années, de nombreuses méthodes chimiques aient été mises au point nous montre l'intérêt pratique grandissant du dosage des corticostéroïdes éliminés dans l'urine. Ces méthodes se basent sur le pouvoir réducteur du groupement cétonique et du noyau A  $\alpha$ ,  $\beta$ -non-saturé des hormones extraites de l'urine, en employant l'acide phosphomolybdique ou des sels cuivriques comme réactifs. La teneur en réactif cuivrique ou phosphomolybdique réduit est alors établie par procédé colorimétrique.

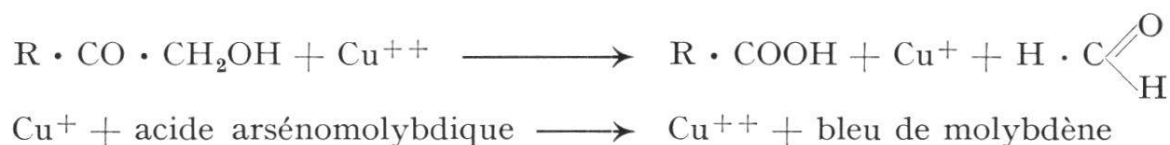
Un autre groupe de méthodes consiste en l'oxydation de la chaîne latérale  $\alpha$ -cétonique par de l'acide periodique avec production de formol.

Il ressort de ce qui précède que toutes ces méthodes ne s'attaquent qu'à un groupement de la molécule et embrassent par conséquent tous les stéroïdes possédant ce groupement caractéristique.

Pour pouvoir atteindre les différents stéroïdes séparément, des méthodes avec séparation fractionnée ont été ensuite élaborées se basant sur les solubilités de ces stéroïdes dans des solvants différents.

Ce n'est que durant ces dernières années que des méthodes de séparation chromatographique ont été mises au point et appliquées avec succès.

La première méthode chimique quantitative a été celle de TALBOT qui repose sur le principe suivant :



L'urine prélevée est extraite à pH neutre par divers solvants, de façon à séparer (en plusieurs groupes) les différents corticostéroïdes d'après leurs solubilités. Ceux-ci sont encore séparés en fractions cétonique et non cétonique par le réactif T de Girard. Les différentes fractions sont alors traitées par le réactif cuivrique en solution alcaline et l'acide arsénomolybdique. Le bleu de molybdène développé est mesuré par colorimétrie photoélectrique à 650-660 m $\mu$ .

Sensibilité : 10  $\gamma$  de corticoïde donnent une absorption d'environ 10 %.

La méthode de HEARD et SOBEL est analogue à celle de TALBOT, avec cette différence que l'extraction se fait à pH = 1. o., et que l'on utilise l'acide phosphomolybdique à la place du réactif cuivrique.

Principe .

$R \cdot CO \cdot CH_2OH + \text{acide phosphomolybdique} \rightarrow R \cdot COOH + \text{bleu de molybdène.}$

Le bleu de molybdène produit par la réduction de l'acide phosphomolybdique est dosé aussi par colorimétrie photoélectrique. Sensibilité : 10 à 100  $\gamma$ .

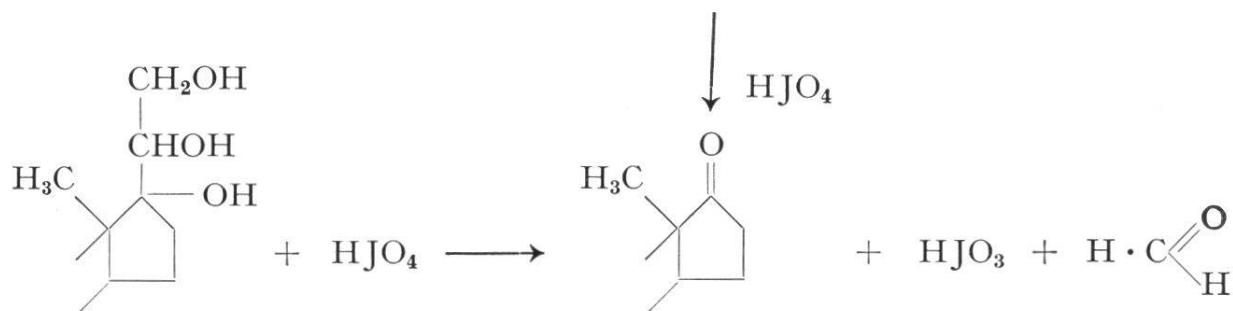
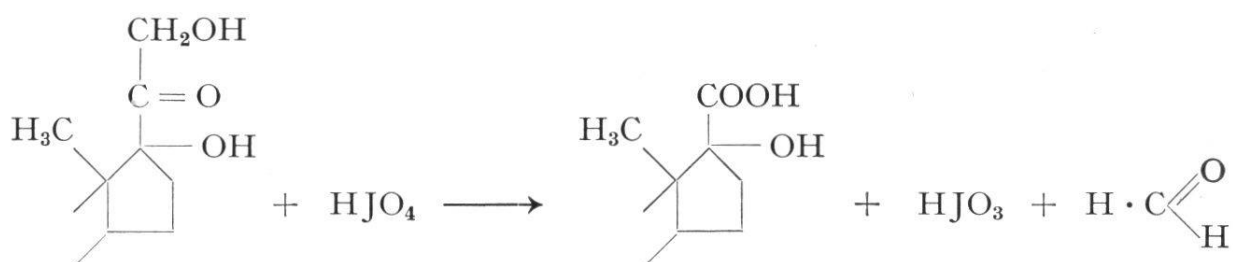
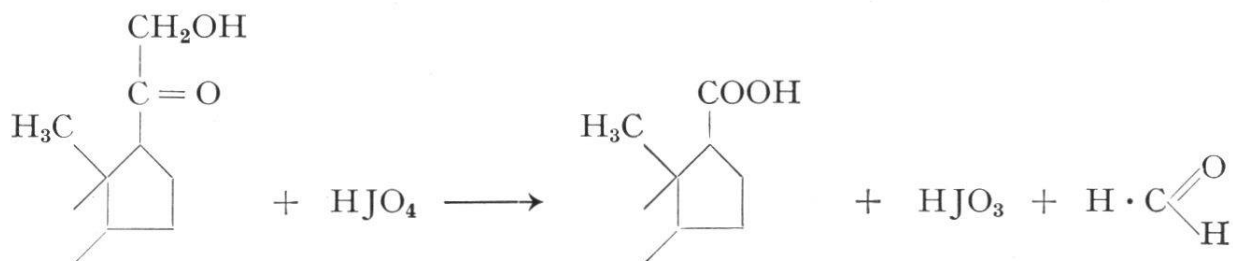
M. SPRECHLER utilise le mode d'extraction de TALBOT avec cette différence qu'il abandonne, comme non avantageuse, la séparation de l'extrait en phases benzénique et aqueuse. Contrairement à TALBOT, SPRECHLER procède à l'extraction chloroformique après avoir ramené l'urine au  $pH = 1.0$  avec de l'acide sulfurique.

Le dosage colorimétrique se fait au moyen du bleu de molybdène d'après HEARD et SOBEL (l. c.). Le pouvoir absorbant est mesuré à 700  $m\mu$  avec un photomètre de Coleman avec filtre rouge.

La désoxycorticostérone est utilisée comme substance-type de référence (substance standard). L'élimination journalière des corticostéroïdes établie par cette méthode semble être huit à dix fois plus élevée que celle fournie par des méthodes biologiques, ce qui s'explique par le fait que la détermination chimique englobe aussi bien les métabolites actifs qu'inactifs, tandis que l'essai biologique ne permet de déterminer que les substances biologiquement actives.

FIESER et coll. ont les premiers introduit l'oxydation avec de l'acide periodique. Par ce procédé d'oxydation, l'hormone est transformée en 17-cétostéroïde en libérant en même temps du formaldéhyde.

Principe :





FIESER et coll. emploient pour le dosage le 17-cétostéroïde formé qu'ils soumettent à la réaction de ZIMMERMANN, réaction de coloration des composés renfermant le groupement  $-\text{CH}_2\text{CO}-$  avec du m-dinitrobenzène alcalin.

E. C. LÆWENSTEIN, A. C. CORCORAN et I. H. PAGE emploient également l'oxydation periodique du groupement alcoolique primaire au C-21, donnant 1 mol de formaldéhyde par mol de corticostéroïde oxydé. Le formaldéhyde est alors déterminé par la méthode de MAC FADYEN dans laquelle la couleur formée par la réaction de l'acide chromotrope avec l'extrait d'hormone est comparée à celle de solutions de formaldéhyde à teneur connue.

La méthode de DAUGHADAY, JAFFE et WILLIAMS est une modification de celle de LÆWENSTEIN et coll. dans ce sens qu'ils introduisent le formaldéhyde libéré dans une solution de sulfite de sodium permettant ainsi d'en recueillir une quantité plus grande. Le dosage se fait également par le procédé colorimétrique décrit par MAC FADYEN (l. c.). Sensibilité : 20-30  $\gamma$ .

G. T. BASSIL et A. M. HAIN proposent une méthode, qui est une modification de celle de DAUGHADAY, en utilisant la technique de diffusion de CONWAY, qui permet d'exécuter l'oxydation et la diffusion simultanément en absorbant le formaldéhyde libéré par une solution de sulfite de sodium se trouvant dans une chambre centrale. L'extrait d'hormone contenu dans de l'éthanol et oxydé par de l'acide periodique se trouvant dans une autre chambre.

Cette technique donnerait une sensibilité plus grande que la méthode de distillation modifiée et permettrait le dosage de formaldéhyde libéré par 40 ccm. d'urine normale ou par 4 ccm. de plasma.

WICK et coll. utilisant aussi le procédé formaldéhydrogénique appliquent une méthode semblable à celle de LÆWENSTEIN et coll. (l. c.) et qui est à peu près la même que celle décrite par DAUGHADAY (l. c.), JAFFE et WILLIAMS.

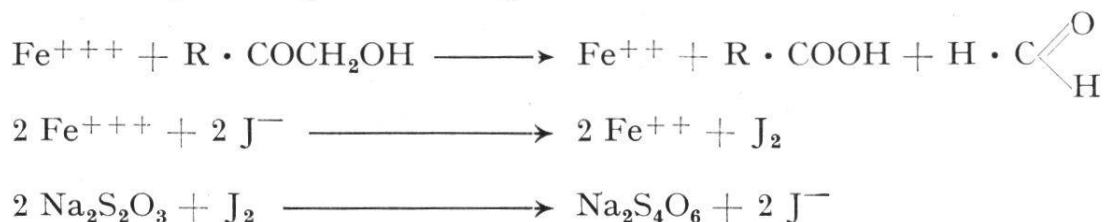
Les auteurs font ressortir que les résultats obtenus avec des méthodes d'analyse chimique se basant sur la formation de formaldéhyde après oxydation par l'acide periodique, sont de 6 à 8 fois supérieurs aux résultats obtenus par essai biologique fondé sur la disparition de glycogène. Ceci s'explique par le fait que la fraction non cétonique contient de grandes quantités de produits formaldéhydrogéniques qui sont biologiquement inactifs.

Après des essais démontrant que les méthodes décrites ci-dessus étaient peu satisfaisantes, vu qu'elles étaient peu spécifiques et qu'elles attaquaient également les produits à chaîne latérale glycolique STAUDINGER HJ. et SCHMEISSER M. ont préconisé une méthode basée sur la destruction spécifique de la chaîne latérale cétonique avec du NaOH 0,1n en présence d'oxygène. Les effets réducteurs de la part « détruite » et de la part « non détruite » sont comparés à l'aide de la réaction avec l'acide phosphomolybdique et de la



mesure colorimétrique. Cette méthode s'applique aussi bien aux tissus corticosurrénaux qu'à l'urine. Sensibilité : on arrive par cette méthode à évaluer des doses d'hormone de l'ordre de 20  $\gamma$  et plus.

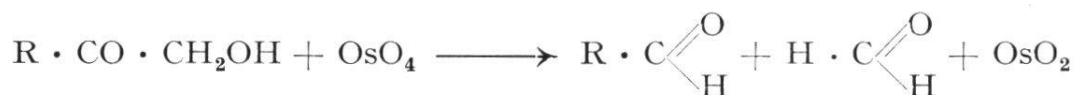
HEMPHILL et REISS ainsi que W. R. ASHBY utilisent le principe de HAGEDORN et JENSEN pour le dosage des corticostéroïdes.



Les teneurs des extraits en substances réductives sont exprimées par des teneurs en glucose possédant un pouvoir réducteur égal.

C. C. PORTER et R. H. SILBER proposent une méthode basée sur l'apparition d'une couleur jaune produite par un mélange d'acide sulfurique et de chlorhydrate de phénylhydrazine dans des solutions contenant certains stéroïdes. Le degré de spécificité de ce procédé ressort du fait que parmi les stéroïdes examinés, la cortisone, l'acétate de cortisone et l'acétate de 11-désoxy-17-hydroxycorticostérone seuls réagissent avec la phénylhydrazine sulfurique, en produisant la bande d'absorption de 410  $\mu$ . Cette méthode a été utilisée pour la détermination de la cortisone dans le sang. C'est ainsi que de la cortisone ajoutée au plasma sanguin, et extraite au chloroforme, est dosée colorimétriquement avec une exactitude allant jusqu'à 85 et 90 %. Par contre, on n'a pu trouver trace de 17,21-dihydroxy-20-céto-corticoïde dans le plasma ou dans l'urine d'un chien auquel on avait administré 100 mg. d'acétate de cortisone ; on n'a pu non plus découvrir l'existence de cortisone conjuguée après hydrolyse de l'urine (avec  $\text{SO}_4\text{H}_2$  1n à 100° C pendant 15 à 30 min.). Les auteurs en question supposent que le stéroïde injecté est rapidement détruit, soit en se fixant dans les tissus, soit en se convertissant en une forme qui se prête mal à l'extraction au chloroforme. La sensibilité de cette méthode est de l'ordre de 1  $\gamma$ .

MAÑARO et ZYGMUNTOWICZ proposent une méthode reposant sur la réaction de BENNETT qui rapporte que du papier-filtre imprégné d'une solution d'acétate de désoxycorticostérone vire au noir quand on l'expose aux vapeurs de tétr oxyde d'osmium.



Les zones de coloration noire du tissu cortical d'un chat correspondaient aux surfaces qui réagissent avec la phénylhydrazine. Cette réaction s'est avérée spécifique pour des corticostéroïdes en solution biologique. Ce procédé qui s'applique aussi à l'examen des extraits chloroformiques d'urine, lavés au NaOH et  $\text{H}_2\text{O}$ , est spécifique pour la corticostérone, la désoxycorticostérone, la cortisone et d'autres stéroïdes. La sensibilité est de l'ordre de 3  $\gamma$ .

Avec les méthodes décrites ci-dessus on arrive à évaluer les corticoïdes urinaires et tissulaires en déterminant soit la totalité des corticoïdes d'un extrait ou en dosant des groupes de corticoïdes suivant leurs solubilités dans des solvants différents. Mais pour que l'étude des stéroïdes éliminés puisse se faire, il était nécessaire d'arriver à une séparation qualitative et quantitative des stéroïdes entre eux. Dans ce domaine, c'est la chromatographie qui nous apporte un concours des plus précieux. Ce sont ZAFFARONI et PINCUS qui les premiers ont obtenu des résultats très intéressants avec cette technique. ZAFFARONI (1949-50) et collaborateurs sont parvenus à séparer les différents corticoïdes et à effectuer leur dosage par comparaison, en se servant de leurs solubilités relativement élevées dans les solvants dipolaires. Ce sont les systèmes benzène-formamide et toluène-propylène-glycol qui ont donné les résultats les plus satisfaisants.

Les auteurs ont pu ainsi constater la présence, dans l'urine de personnes normales, du composé E et de la 17-hydroxycorticostérone. La sensibilité de cette méthode est de l'ordre de 10  $\gamma$ .

S'inspirant de la méthode de ZAFFARONI, HOFMANN et STAUDINGER effectuent la séparation des corticoïdes par chromatographie sur papier en utilisant comme solvant l'eau et l'alcool butylique, et comme révélateur le chlorure de triphényl-tétrazolium (TTC) alcalin. Le formazane qui se forme est extrait par un mélange pyridine-ac. chlorhydrique ou par la tétrahydrofurane et déterminé au spectrophotomètre.

---

Les méthodes analytiques citées ci-dessus se basent de façon générale sur le pouvoir réducteur de la chaîne latérale céto-alcoolique en C-17, qui agit sur les sels de cuivre, le ferricyanure de potassium et l'acide phosphomolybdique. Certaines d'entre elles aboutissent à la formation de formaldéhyde, lequel est utilisé pour le dosage. Ces méthodes ne peuvent pas être considérées comme répondant entièrement aux besoins cliniques, vu :

- 1<sup>o</sup> leur manque de spécificité ;
- 2<sup>o</sup> l'impossibilité d'effectuer une séparation satisfaisante de l'extrait en ses différents composés ;
- 3<sup>o</sup> l'impossibilité d'éliminer entièrement les substances gênant la réaction, ce qui rend ainsi les résultats incertains.

Le fait que les hormones à doser se présentent en quantités minimales, et par groupes de plusieurs ensemble, rend la tâche encore plus difficile. Certains auteurs ont cru pouvoir parer à cet inconvénient en procédant à la séparation en groupes des 11-oxycorticoïdes et 11-désoxycorticoïdes, en utilisant pour cela leurs solubilités différentes dans divers solvants (PINCUS, DAUGHADAY, JAFFE, WILLIAMS, STAUDINGER). Cependant ce procédé s'est avéré impropre à atteindre le but recherché, à cause d'impuretés non spécifiques qui sont entraînées dans l'une ou l'autre des fractions (PINCUS). La pratique clinique montre aussi que les méthodes les plus utiles sont souvent celles qui sont les moins compliquées, et les plus simples à exécuter.

Tab. 2. Méthodes de dosage des corticostéroïdes

N°	Auteurs	Réactifs utilisés	Elimination en mg./24 h.	Sensibilité de la méthode en $\gamma$
1	TALBOT	$\text{Cu}^{++}$ - acide arsénomolybdique	1,1 - 0,38	10 $\gamma$ donnent env. 10 % d'absorption
2	HEARD et SOBEL	Acide phosphomolybdique	1,1 - 2,1	10 - 100
3	SPRECHLER	Acide phosphomolybdique	—	—
4	STAUDINGER	Acide phosphomolybdique	0,75	20
5	FIESER et coll.	$\text{HJO}_4$	—	—
6	LÆWENSTEIN et coll.	$\text{HJO}_4$ - Formaldéhyde	0,5 - 0,8	—
7	DAUGHADAY et coll.	$\text{HJO}_4$ - Formaldéhyde	1,0 - 1,6	20 - 30
8	BASSIL et HAIN	$\text{HJO}_4$ - Formaldéhyde	1,5 - 2,5	—
9	WICK	$\text{HJO}_4$ - Formaldéhyde	0,7	—
10	HEMPHILL et REISS	Ferricyanure de potassium	—	—
11	ASHBY	Ferricyanure de potassium	—	—
12	PORTER et SILBER	Phénylhydrazine- $\text{H}_2\text{SO}_4$	—	1
13	MAÑARO et ZYGMUNTOWICZ	$\text{OSO}_4$	—	3
14	ZAFFARONI	Chromatographie sur papier	{ 20-40 $\gamma$ de Comp. E 20-40 $\gamma$ de cortisol }	15 (DOC 25-30)
15	HOFMANN et STAUDINGER	Chromatographie sur papier	—	10 - 15

De la description faite dans le chapitre précédent il résulte qu'aucune des méthodes chimiques appliquées jusqu'à maintenant au dosage des stéroïdes cortico-surréaliens n'est spécifique : ce sont des groupes de substances à pouvoir réducteur que nous arrivons à déterminer avec ces méthodes et les quantités d'hormones éliminées varient suivant la méthode appliquée (voir tableau comparatif). En ce qui concerne la nature des corticostéroïdes éliminés, ces méthodes, excepté celles par chromatographie, ne nous donnent aucune indication. C'est la raison pour laquelle les données sur la nature des hormones éliminées diffèrent aussi suivant la méthode appliquée.

## Partie expérimentale

Le dosage des hormones corticostéroïdes a une importance aussi bien théorique que pratique. Le clinicien voudrait pouvoir tirer des conclusions sur la fonction du cortex surrénal d'après les corticoïdes éliminés. Il est non moins intéressant de savoir dans quel sens certains aliments exercent une influence sur la production d'hormones corticosurréaliennes, respectivement sur leur sécrétion dans le sang.

Cela exige des méthodes de dosage quantitatives d'une sensibilité et d'une spécificité suffisantes pour permettre le dosage des corticostéroïdes chez les animaux de laboratoire.

Or, comme il ressort de la description faite dans le chapitre précédent, les méthodes utilisées à cette fin sont non seulement d'une sensibilité insuffisante, mais encore impropres à déterminer la nature même des corticostéroïdes en présence. Elles nous renseignent uniquement sur l'existence de groupes chimiques déterminés.

Nous nous sommes donc proposés d'examiner la possibilité d'établir une méthode pouvant suppléer à cette insuffisance.

De toutes les réactions chimiques qui ont été décrites jusqu'à ce jour, celle de DHÉRE et LASZT est la plus sensible, et pour les corticostéroïdes, la plus spécifique. Cette réaction consiste en l'apparition d'une fluorescence rouge produite par une solution chloroformique de désoxycorticostérone ou de corticostérone en présence de sulfate cinéthylique à chaud (100° C). Notre tâche consistait donc à examiner la possibilité d'utiliser cette réaction pour la mise au point d'une méthode quantitative. Les difficultés à surmonter provenaient de la nécessité de purifier la matière première (urine, tissu surréna-

lien, etc.), afin d'en éliminer toute substance pouvant gêner la réaction, tout en évitant des pertes inhérentes à ce genre d'opérations.

Avant d'aborder ces questions, il nous a paru utile, tout d'abord, d'examiner la façon de réagir des différents corticostéroïdes actifs avec le sulfate diméthylique, étant donné que DHÉRE et LASZT n'avaient effectué cette réaction qu'avec la désoxycorticostérone (DOC) et la corticostérone. Nous disposons maintenant des quatre autres corticostéroïdes, et nous les avons soumis à la réaction de DHÉRE et LASZT avec examen de leur couleur et spectre de fluorescence et de leur spectre d'absorption.

Il s'est alors avéré que tous les corticoïdes ne réagissent pas avec le sulfate diméthylique, mais seulement ceux qui ne sont pas oxydés au carbone 11, et ceux qui possèdent un groupe oxhydrile au C-11 ; c'est donc dire que la cortisone et la déhydrocorticostérone ne réagissent pas avec le sulfate diméthylique.

En outre, il s'est révélé qu'avec les quatre derniers corticoïdes la couleur de fluorescence par réaction avec le sulfate diméthylique était différente suivant la constitution, cela aussi bien par excitation avec les rayons ultraviolets, qu'avec la lumière blanche, comme illustré ci-dessous.

N°		Fluorescence	
		rayons u. v.	lumière blanche
1	Désoxycorticostérone	rouge	rouge
2	Désoxycortisone	orange	orange
3	Corticostérone	rouge faible	rouge faible
4	Cortisol	jaune rougeâtre	jaune rougeâtre

### Spectres de fluorescence

a) *11-désoxy-17-hydroxycorticostérone (désoxycortisone)* :

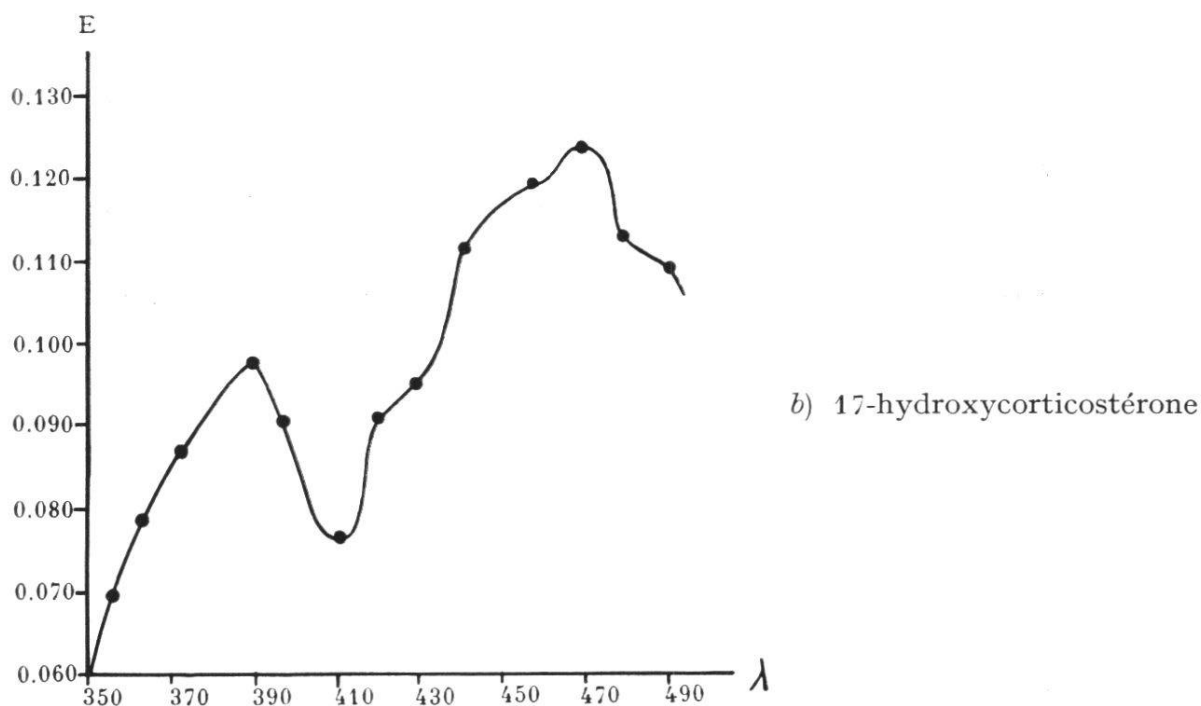
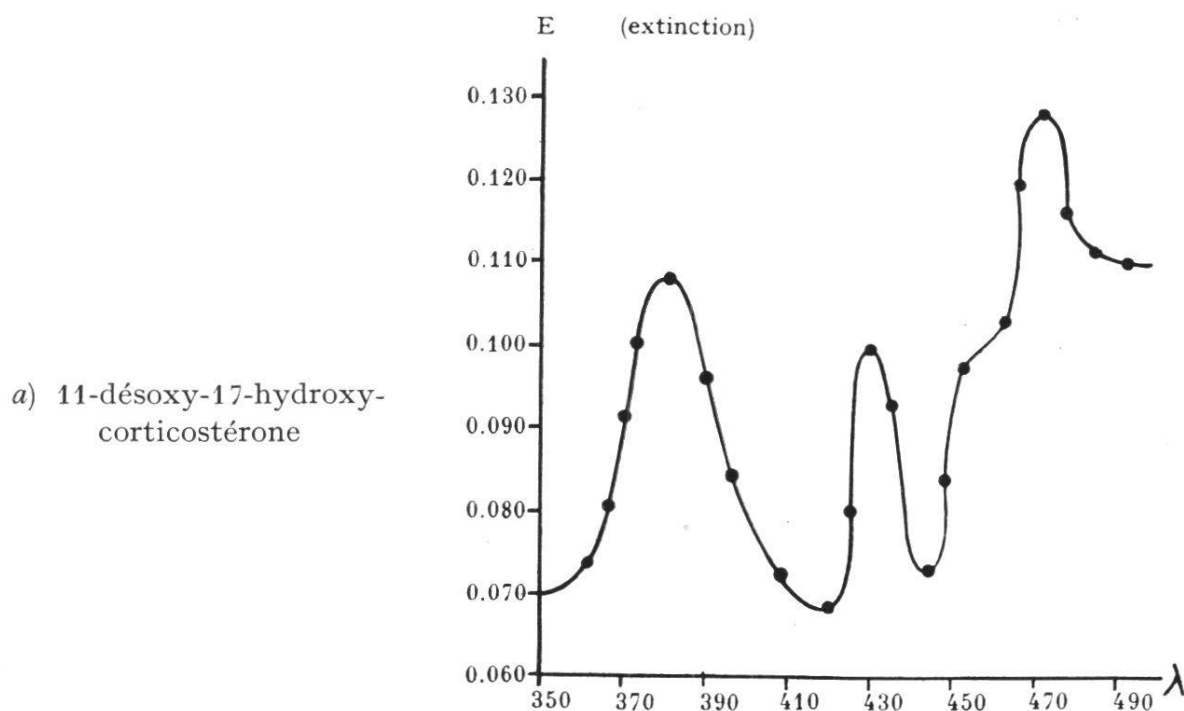
Liqueur presque incolore. Deux bandes de fluorescence : orangée entre 600 et 622 m $\mu$  ; verte entre 515 et 548 m $\mu$  avec séparation nette entre les deux bandes.

b) *17-hydroxycorticostérone (cortisol)* :

Liqueur incolore. Deux bandes de fluorescence : jaune rougeâtre entre 600 et 608 m $\mu$  et verte entre 515 et 548 m $\mu$  nettement séparées l'une de l'autre.

### Spectres d'absorption

Nous avons établi les spectres d'absorption avec le photomètre de Beckmann \* (cuvette de 1 ccm.). Ceux-ci sont représentés graphiquement dans la figure ci-dessous :



\* La mesure des spectres d'absorption a été faite au laboratoire de chimie physique avec le spectrophotomètre Beckmann, modèle B<sub>3</sub>, mis aimablement à notre disposition par l'Institut de Chimie.



### **Détermination quantitative des différents corticostéroïdes dans le cortex surrénal de différents animaux**

Nous avons appliqué toute une série de méthodes chimiques devant servir à extraire et à isoler les stéroïdes corticosurrénaux. Nous ne voulons pas entrer ici dans les détails techniques de ces essais qui ne nous ont pas donné de résultats satisfaisants, et nous nous contenterons de décrire la méthode qui, après différents contrôles, a permis d'extraire quantitativement les corticostéroïdes et d'en éliminer toutes les substances gênantes :

Le tissu est broyé avec du sulfate de sodium déshydraté. A la poudre ainsi obtenue, on ajoute du chloroforme et on laisse macérer le tout pendant 12 heures. On filtre, puis le résidu est lavé plusieurs fois avec du chloroforme. Le filtrat total est alors évaporé dans le vide à une température de 45-50° C. Le résidu sec est repris par 4 ccm. d'acide acétique glacial, auquel on ajoute 12 ccm. d'acide chlorhydrique 3n, et l'on procède à l'hydrolyse en chauffant au bain-marie, à reflux pendant 25-30 min. Après refroidissement, on lave deux fois avec 10 ccm. d'éther de pétrole, puis on ajoute encore 24 ccm. d'eau (volume total 40 ccm.). On extrait ensuite par le chloroforme en quatre fois, à raison de 10 ccm. par fois (volume final de l'extrait = 40 ccm.). L'extrait chloroformique est lavé successivement avec 1° 10 ccm. de NaOH 1n, 2° 10 ccm. de NaOH 0,1n, 3° 10 ccm. de HCl 0,1n et 4° 10 ccm. d'eau, et évaporé à sec à 45-50° C, sous pression réduite.

Le résidu sec est dissous dans 1 ccm. de chloroforme, on y ajoute 4 ccm. de sulfate diméthylque et l'on transvase la solution dans une éprouvette sèche. On chauffe cette dernière à 100° C pendant 10 à 30 min. (le temps de chauffage est déterminé pour chaque flacon de diméthylsulfate séparément pour des raisons que nous verrons plus loin). Après refroidissement, on effectue la mesure.

Il nous a été impossible de déterminer avec exactitude le mode d'action de cette substance sur les stéroïdes sus-mentionnés malgré les nombreux essais effectués dans ce but. Nous avons pu cependant constater que : 1° le sulfate diméthylque fraîchement distillé ne provoque pas ou peu de réaction ; 2° la présence d'acide sulfurique dans le réactif n'est pas à l'origine de la fluorescence en question, vu qu'après addition d'acide sulfurique la réaction ne se produit pas.

Bien au contraire : le réactif ne doit pas contenir d'acide sulfurique, car en sa présence la fluorescence se produit, mais disparaît rapidement ; 3° le sulfate diméthylique réagit plus fortement après élimination de l'acide sulfurique par traitement au carbonate de baryum ; et enfin 4° lorsqu'on laisse reposer le sulfate diméthylique distillé pendant un certain temps il récupère sa capacité de réaction. Il est probable qu'un pouvoir catalyseur provenant du récipient en verre en contact prolongé avec le réactif est à l'origine de cette réaction. Le plus gros inconvénient de notre méthode réside donc dans le fait qu'il nous est impossible d'indiquer quel est le sulfate diméthylique qui se prête le mieux à la réaction. Les différents échantillons de sulfate diméthylique ne réagissent pas avec la même sensibilité et, par conséquent, on doit établir pour chaque portion de ce produit le temps optimum pour l'obtention d'une fluorescence d'intensité maximum. Les résultats les plus constants ont été obtenus avec le produit de la Ciba.

Le plus simple est de comparer l'intensité de fluorescence provoquée par excitation à la lumière blanche avec les intensités de fluorescences de quantités-standard de l'hormone correspondante. Les intensités de fluorescence correspondant à des valeurs de 1 à 8  $\gamma$  obéissent à la loi de Lambert. (L'intensité de la fluorescence persiste pendant plusieurs jours dans l'obscurité et à l'abri de l'air.)

Il est malaisé d'effectuer ces mesures aux rayons ultraviolets, car ceux-ci font disparaître la fluorescence plus rapidement que la lumière blanche.

*Tab. 1. Illustrant la sensibilité de la réaction des différents corticostéroïdes avec le sulfate diméthylique*

N°	Corticostéroïde	Sensibilité en $\gamma$ Liquueur de réaction	
		4 ccm.	1 ccm.
1	Désoxycorticostérone	1 - 2	0,3 - 0,5
2	11-désoxy-17-hydroxy-corticostérone	2	0,5
3	Corticostérone	1	0,3
4	17-hydroxycortico-stérone	4	1

Il est possible d'identifier des fractions de  $\gamma$  en appliquant des quantités de chloroforme-sulfate diméthylque plus petites.

Les surrénales à l'état non frais provenant des abattoirs se prêtaient particulièrement bien au contrôle de notre méthode, puisque dans celles-ci les corticoïdes sont détruits.

On broie trois grammes de cortex surrénalien que l'on répartit en six portions égales ; on y ajoute différentes quantités de DOC, comme indiqué dans le tableau 2, et l'on examine suivant la méthode indiquée plus haut.

Tab. 2

N <sup>o</sup>	Teneur en stéroïde de la surrénale examinée (en $\gamma$ )	DOC ou corticostérone ajoutée (en $\gamma$ )	DOC ou corticostérone retrouvée (en $\gamma$ )
1	0	0,5	0,4
2	0	1	0,9
3	0	2	1,9
4	0	3	2,8
5	0	4	3,7

Comme le tableau 2 le montre : sans addition, pas d'hormone ; après addition on retrouve l'hormone ajoutée, cela avec une erreur de 10 %.

### Séparation chromatographique des corticostéroïdes

La séparation et l'identification des différents stéroïdes s'effectue par chromatographie, d'après ZAFFARONI, BURTON (1950-51) et coll. Dans le cas d'un cortex surrénal de lapin à jeun, nous avons procédé de la manière suivante :

*Système benzène-formamide.* La surrénale d'un poids de 450 mg. a été extraite par la méthode ci-dessus et le résidu final dissous dans 0,1 ccm. de méthanol. Une bande de papier Whatmann N<sup>o</sup> 1 de 3 cm. de large et 35 cm. de long, a été imbibée de formamide après avoir découpé en son milieu une petite bande de 0,6 cm. de large sur une longueur de 23 cm., ce qui nous donne deux bandes parallèles de 1,2 cm. de large, séparées par un espace vide de 0,6 cm. et reliées à l'une des extrémités sur une longueur de 12 cm. Les

bandes sont serrées légèrement entre deux feuilles de papier filtre, afin d'enlever l'excès de solvant. Sur la ligne de départ de l'une des bandes, on applique 15  $\gamma$  de DOC contenus dans une goutte de méthanol (une solution de DOC dans du méthanol a été préparée de telle sorte qu'une goutte contienne 15  $\gamma$  de DOC.) Cette solution est appliquée à l'aide d'un tube capillaire sur une surface ovale de 0,5 cm. de large et 1 cm. de long, formée par l'ouverture d'un tube de verre relié à une trompe à vide servant à faire passer un léger courant d'air à travers cette surface, et à évaporer ainsi la solution de DOC appliquée. L'extrait de surrénale est ensuite appliqué de la même manière et à la même hauteur sur l'autre bande. Les deux bandes reliées entre elles par leur partie supérieure, sont fixées sur une plaque de verre inclinée, placée dans un pétrin de porcelaine avec bord arrondi dépassant le bord du pétrin rempli de formamide saturé de benzène (exempt de thiophène). Le chromatogramme qui adhère à la plaque sur une longueur de 6 à 7 cm. est ainsi immergé dans le formamide et suspendu dans une atmosphère saturée de benzène. Au bout de deux heures, le chromatogramme développé par méthode descendante est retiré, séché dans un tube en verre à travers lequel on faisait passer un courant d'air chaud. L'emplacement de la DOC a été révélé par du nitrate d'argent en solution alcaline 0,1n d'après ZAFFARONI (l. c.). La bande imprégnée de l'extrait surrénal est alors coupée aux endroits correspondant aux témoins. Les morceaux de papier ainsi découpés sont ensuite élués par du chloroforme et lavés par : 1° NaOH 0,1n, 2° HCl 0,1n et 3° H<sub>2</sub>O. Après évaporation à sec, les extraits sont dissous dans du chloroforme et additionnés de sulfate diméthylque à raison de 1 ccm. de ce mélange par portion. Les solutions sont alors versées dans des éprouvettes et chauffées à 100° C.

Pour effectuer cet examen avec d'autres corticoïdes on doit chaque fois établir l'emplacement du stéroïde recherché à l'aide de bandes de contrôle.

L'appareil chromatographique et les différentes solutions ont été préparés d'après ZAFFARONI. Dans le cas particulier, les récipients utilisés étaient les suivants :

- a) un vase cylindrique de 12,8 cm. de diamètre et 42 cm. de haut, avec couvercle en verre ;

- b) un petit pétrin en porcelaine émaillée, de dimensions suivantes : bords supérieurs : 8,8 cm. sur 7,8 cm., fond : 5,6 cm. sur 4,4 cm. et hauteur : 1,6 cm. ;
- c) une plaque de verre de 0,3 cm. d'épaisseur, en forme de trapèze de dimensions : bases : 8,7 et 7,8 cm. et hauteur : 6,5 cm. Une des bases de la plaque est légèrement arrondie.

### **Examen d'un cortex de lapin après ingestion de glucose**

Nous avons examiné la surrénale (370 mg.) d'un lapin à jeun tué après ingestion de 50 ccm. de glucose à 20 %. On y a trouvé de la 17-hydroxy-corticostérone et de la corticostérone. La surrénale (450 mg.) d'un second lapin à jeun, servant de témoin, et n'ayant pas absorbé de glucose, ne contenait pas d'hormone réagissant positivement avec notre méthode.

Il faut dire ici qu'avec cette méthode on réussit également à mettre en évidence les corticostéroïdes chez les rats.

R. NEHER et A. WETTSTEIN ont utilisé le phénomène de fluorescence pour l'identification directe des corticoïdes sur le chromatogramme de papier. Cela est une nette amélioration, parce que cette méthode permet de déterminer non seulement la position sur le chromatogramme, mais encore la couleur de fluorescence du corticoïde correspondant, après traitement à l'acide phosphorique ou au sulfate diméthylque, ce qui est un critère supplémentaire. Cette méthode nous renseigne au point de vue qualitatif et non au point de vue quantitatif. Les auteurs sus-nommés mentionnent dans leur travail que la sensibilité avec l'acide phosphorique est nettement supérieure à la sensibilité avec le sulfate diméthylque.

DHÉRÉ et LASZT (Chimia 1947) avaient déjà examiné en 1947 l'acide phosphorique avant de proposer le sulfate diméthylque pour cet usage, et ils ont trouvé que la sensibilité de ce dernier était plus grande que celle de l'acide phosphorique. Il n'est pas exclu que le produit que NEHER et WETTSTEIN ont utilisé n'était pas suffisamment actif (voir page 34). Ils trouvent aussi, comme nous l'avons trouvé, que les différents corticoïdes produisent des fluorescences différentes. Ce qui nous a paru le plus intéressant dans ces essais c'est que la 11-déhydrocorticostérone développée sur le papier réagit également.



### *Mode opératoire*

Pour imprégner le papier (Whatman N° 1), on le plonge rapidement dans une solution à 20 % de propylène-glycol dans l'acétone, d'après BAKER, et on développe deux bandes de papier d'une longueur de 35 cm., par méthode descendante, avec du toluol pendant 2 heures, temps nécessaire au solvant pour atteindre le bord inférieur du papier. Deux autres bandes sont développées pendant 8-12 heures. Un chromatogramme de 2 heures et un de 8-12 heures sont séchés et traités rapidement avec de l'acide phosphorique à 15 %, chauffés pendant 20 min. à 90° C et examinés aux rayons ultraviolets. Ils obtiennent ainsi des fluorescences caractéristiques de couleurs différentes (jaune-vert, bleu, orange-rouge) avec des sensibilités allant de 0,5  $\gamma$  pour le cortisol, jusqu'à 25  $\gamma$  pour la 11-déhydrocorticostérone. Les deux autres chromatogrammes sont traités par une solution alcaline de diammine d'Ag ou par le chlorure de triphenyl-tetrazolium (TTC). Les auteurs basent ainsi leur examen sur trois critères :

- 1° la position dans le chromatogramme de 2 heures et de 8-12 heures
- 2° le pouvoir réducteur et
- 3° la réaction colorée avec l'acide phosphorique.

### **Détermination des corticostéroïdes dans l'urine d'animaux et d'hommes**

Nous nous sommes donc contentés d'élaborer une méthode visant à déterminer les différents corticostéroïdes présents dans la corticosurrénale. Nous avons renoncé aux recherches prévues dans notre plan et dont le but était d'examiner l'influence de différents facteurs sur la teneur en corticoïdes de la corticosurrénale, puisqu'il nous semblait plus important de rechercher si les corticoïdes sont éliminés comme tels chez l'homme et l'animal et si l'on pouvait tirer des conclusions à partir de ces recherches, quant à la fonction du cortex surrénal.

### *Mode opératoire*

On prélève chez l'homme l'urine de 24 heures, dont 250 à 500 ccm. sont destinés à l'analyse. On acidifie par de l'acide acétique d'après STAUDINGER (1950) ou avec HCl jusqu'à pH = 1, et l'on extrait avec une quantité de chloroforme égale au dixième du volume de l'urine examinée ; l'extraction se fait cinq fois. L'émulsion qui se forme est centrifugée : on sépare le chloroforme et l'urine qui reste est réunie à l'urine de départ non utilisée. Les extraits chloroformiques réunis sont ensuite lavés avec : 1° du NaOH 1n, 2° NaOH 0,1n et 3° HCl 0,1n, puis les eaux de lavage sont encore extraites par un peu de chloroforme que l'on ajoute à l'extrait chloroformique principal. On évapore alors cet extrait dans le vide, à 45-50°, reprend le résidu sec par 4 ccm. d'acide acé-



tique glacial auquel on ajoute 12 ccm. d'acide chlorhydrique 3n, et l'on procède à l'hydrolyse en chauffant au bain-marie, à reflux pendant 25-30 min. Après refroidissement, on lave deux fois avec 10 ccm. d'éther de pétrole, puis l'on ajoute encore 24 ccm. d'eau (volume total 40 ccm.). On extrait ensuite par le chloroforme en quatre fois, à raison de 10 ccm. par fois (volume final de l'extrait = 40 ccm.). L'extrait chloroformique est lavé successivement avec 1° 10 ccm. de NaOH 1n, 2° 10 ccm. de NaOH 0,1n, 3° 10 ccm. de HCl 0,1n et 4° 10 ccm. d'eau, et évaporé à sec à 45-50° C, sous pression réduite.

Le résidu sec est dissous dans 1 ccm. de chloroforme, on y ajoute 4 ccm. de sulfate diméthylique et l'on transvase la solution dans une éprouvette sèche. On chauffe cette dernière à 100° C pendant 10 à 30 min. (le temps de chauffage est déterminé pour chaque flacon de diméthylsulfate séparément). Après refroidissement on effectue la mesure.

### *Hydrolyse :*

C'est avec la désoxycorticostérone libre que la réaction est la plus rapide. Comme dans l'urine, les stéroïdes se trouvent habituellement sous forme conjuguée, il était nécessaire d'examiner quelle est la concentration en acide et le temps optima pour mettre en liberté les stéroïdes, sans que pour autant les corticostéroïdes soient détruits. Nous avons procédé à ces essais avec une quantité connue de DOC-glucoside. Les résultats obtenus sont réunis dans les tableaux 3 et 4.

*Tab. 3. L'influence de l'acidité sur l'hydrolyse de DOC-glucoside en un temps déterminé*

N°	DOC-glucoside en $\gamma$	Temps min.	Acide acétique glacial ccm.	Température	HCl 12 ccm.	Quantité d'hormone obtenue à l'extraction en $\gamma$
1	25	20	4	100° C	1n	15
2	25	20	4	100° C	2n	18
3	25	20	4	100° C	3n	24
4	25	20	4	100° C	4n	12
5	25	20	4	100° C	5n	8

Comme il ressort de ces tableaux, l'hydrolyse avec l'acide chlorhydrique 3n pendant 20 à 30 min. suffit pour libérer la DOC de sa forme conjuguée. Des concentrations plus basses sont insuffisantes ; des concentrations plus élevées, par contre, détruisent la majeure partie de la DOC.

Tab. 4. *L'influence du temps sur l'hydrolyse de DOC-glucoside pour une concentration d'acide déterminée*

N°	DOC-glucoside en $\gamma$	CH <sub>3</sub> COOH anhydre ccm.	HCl 3n ccm.	Temps de chauffe à 100° C (hydrolyse) min.	Résultats à l'extraction en $\gamma$
1	25	4	12	10	16
2	25	4	12	15	21
3	25	4	12	20	24
4	25	4	12	25	24
5	25	4	12	30	24
6	25	4	12	35	19
7	25	4	12	40	15

### Résultats chez l'animal

L'urine de rats adultes a été conservée à l'abri de la lumière ; puis l'urine de 24 heures complétée jusqu'à concurrence de 50 ccm. avec de l'eau a été examinée suivant la méthode décrite plus haut. Nous avons effectué ces essais avec 5 mâles et 5 femelles et dans aucun de ces cas nous n'avons pu mettre en évidence des quantités décelables de stéroïdes réagissant avec le sulfate diméthylique.

Il se posait alors deux questions : 1° la quantité de stéroïdes éliminés est-elle si petite qu'elle ne peut être décelée par notre méthode ? 2° notre méthode est-elle insuffisante ou la réaction est-elle troublée par des impuretés entraînées dans les extraits ?

Pour examiner cette question, nous avons injecté aux mêmes rats des doses élevées de DOC-glucoside ou d'acétate de désoxycorticostérone (DOCA) (2,5 mg. par jour) et nous avons suivi l'élimination urinaire. Il s'est alors avéré que même dans ce cas aucun stéroïde réagissant avec le sulfate diméthylique n'a été éliminé.

Ensuite nous avons examiné la deuxième question, à savoir, si notre méthode d'extraction est suffisante. Nous avons additionné à la quantité journalière d'urine différentes doses de DOC ou de DOC-glucoside, et il en résulta que les stéroïdes additionnés étaient retrouvés avec une erreur de  $\pm 10\%$ .

## Résultats chez l'homme

### a) Sans administration d'hormone :

Après avoir obtenu ces résultats avec des rats, résultats nous montrant que ni avant ni après injection de DOC aucun des stéroïdes n'est éliminé, il nous parut d'autant plus important d'effectuer ces essais avec de l'urine de personnes que de plus grandes quantités de corticoïdes sont éliminées chez l'homme, comme il est décrit dans la littérature, quantités qui peuvent encore bien augmenter dans des cas pathologiques. Nous avons aussi analysé avec notre méthode des quantités d'urine humaine allant de 100 à 500 ccm. et dans aucun cas n'avons pu mettre en évidence la présence de stéroïdes réagissant avec le sulfate diméthylque.

Pour prouver l'exactitude de notre méthode, nous avons ajouté dans ces cas aussi à différentes quantités d'urine des quantités variables de DOC, de DOCA ou de DOC-glucoside, et déterminé la quantité de ces stéroïdes qui pouvait être récupérée.

Comme il ressort du tableau 5, nous avons retrouvé non seulement les hormones ajoutées à l'extrait, mais aussi les hormones ajoutées à l'urine avec une erreur de  $\pm 10\%$ . En utilisant la DOC ou le DOCA, l'erreur est sensiblement plus faible qu'avec le DOC-glucoside.

### b) Avec administration d'hormone :

STAUDINGER et SCHMEISSER (l. c.) avaient trouvé qu'après injection intramusculaire de 10 mg. de DOC chez l'homme, 20-25 % environ de celle-ci étaient éliminés dans l'urine.

Vu qu'il nous a été impossible après injection de DOC à des rats de retrouver cette dernière dans les urines, il nous a paru d'autant plus important d'effectuer ces essais chez des hommes. Nous avons injecté à différentes personnes en bonne santé 10 mg. de DOCA en solution huileuse i. m. et à partir de ce moment nous avons recueilli l'urine de 24 heures ; sa teneur en corticoïdes était ensuite examinée. Comme il ressort du tableau 7 il nous a été impossible, dans ce cas également, d'identifier des stéroïdes réagissant avec le sulfate diméthylque.

Dans une autre série d'essais nous avons injecté 10 mg. de DOC-glucoside non pas i. m. mais i. v., et l'urine a été collectionnée

Tab. 5. Essais de contrôle avec addition d'hormone :

A) à l'urine,  
B) à l'extrait d'urine

A)

N°	Urine examinée en ccm.	Addition à l'urine de		Quantité d'hormone révélée à l'examen en $\gamma$
		hormone	quantité en $\gamma$	
1	100	DOC	10	9
2	100	DOCA	10	9
3	100	DOC-glucoside	10	8
4	200	DOC	10	9
5	200	DOCA	10	9
6	200	DOC-glucoside	10	8
7	300	DOC	10	9
8	300	DOCA	10	8
9	300	DOC-glucoside	10	8
10	400	DOC	5	4
11	400	DOCA	5	4
12	400	DOC-glucoside	5	3
13	500	DOC	5	4
14	500	DOCA	5	4
15	500	DOC-glucoside	5	3

B)

N°	Urine examinée en ccm.	Addition à l'extrait d'urine		Quantité d'hormone révélée à l'examen en $\gamma$
		hormone	quantité en $\gamma$	
1	100	DOC	10	10
2	100	DOCA	10	10
3	100	DOC-glucoside	10	10
4	200	DOC	10	10
5	200	DOCA	10	10
6	200	DOC-glucoside	10	10
7	300	DOC	10	10
8	300	DOCA	10	10
9	300	DOC-glucoside	10	10
10	400	DOC	5	5
11	400	DOCA	5	5
12	400	DOC-glucoside	5	5
13	500	DOC	5	5
14	500	DOCA	5	5
15	500	DOC-glucoside	5	5

pendant 4 h. 30. Comme il ressort du même tableau, dans ce cas-ci on retrouve dans l'urine une certaine partie de l'hormone administrée.

Dans ce dernier cas, le taux de DOC dans le sang ayant atteint et dépassé le seuil rénal, il en résulte l'impossibilité de réabsorption totale du DOC-glucoside injecté, et c'est ainsi qu'une partie de cette substance est éliminée dans l'urine.

Il est probable que l'hormone injectée a été éliminée sous forme de glucoside, vu que, comme le montre le tableau 6 on retrouve sans hydrolyse 19  $\gamma$  tandis qu'avec hydrolyse on retrouve 400  $\gamma$ .

Tab. 6. L'élimination de DOC-glucoside dans l'urine chez l'homme

N°	Sujet examiné	Quantité d'urine examinée en ccm.	Résultats de l'examen de la moitié d'urine traitée	
			avec hydrolyse en $\gamma$	sans hydrolyse en $\gamma$
1	G. R.	340	400	18-20
2	F. K.	380	410	18-20

Tab. 7. L'élimination de désoxycorticostérone par les voies urinaires chez l'homme sans et après injection de désoxycorticostérone

Sujet d'expérience	Diagnostic clinique	Quantité de corticostéroïdes éliminée calculée en mg. de désoxycorticostérone éliminée		
		Avant administration de DOC	4,5 h. ap. adm. 10 mg. DOC-glucoside i. v. mg.	24 h. ap. adm. 10 mg DOC-acétate i. m.
K. J.	Carcinome (estomac)	0	—	—
B. L.	Carcinome (œsophage)	0	—	—
F. J.	Carcinome (œsophage)	0	—	—
C. R.	Carcinome (rein)	0	—	—
P. J.	sain	0	0,400	—
R. G.	sain	0	0,400	—
N. B.	sain	0	—	0
N. B.	sain	0	0,420	—
L. L.	sain	0	—	0
L. L.	sain	0	0,350	—
K. F.	sain	—	0,380	—



Ces données nous semblaient assez importantes et cela nous a incités à en faire une courte publication. *Experientia* Vol. VII. Fasc. 11, 1951, p. 430.

Les résultats de nos recherches avec l'urine sont confirmés par les travaux de ZAFFARONI (*Science* 111, 6) et coll. qui ont abouti aux mêmes résultats, à savoir : l'absence de DOC et de corticostérone dans l'urine de personnes. Ils trouvent par contre dans l'urine de personnes saines des quantités minimales de cortisone, qu'il nous est impossible d'identifier avec notre méthode, vu que cette substance ne donne pas de fluorescence avec le sulfate diméthylé.

Entre-temps, nos données furent confirmées par STAUDINGER et coll. (Weissbecker et Staudinger), à savoir que ni avant, ni après injection i. m. de DOC, celle-ci n'est éliminée dans l'urine. Les corticostéroïdes déterminés avec d'autres méthodes chimiques sont probablement des produits de transformation plutôt que des corticostéroïdes actifs. Et de ce fait l'on ne saurait parler d'élimination de corticostéroïdes dans l'urine, mais de corticoïdes. (L'on comprend, sous la dénomination de corticostéroïdes, les stérines actives telles qu'on les trouve dans le cortex surrénal. Tandis que sous corticoïdes, l'on entend des substances possédant des propriétés de réduction semblables à celles des corticostéroïdes, mais dont la nature chimique n'est pas bien définie.)

Par la suite, nous nous sommes posé la question de savoir quelles transformations les corticostéroïdes pourraient subir lors de l'élimination. On sait que la progestérone, stéroïde très proche des corticostéroïdes, est éliminée sous forme réduite en tant que pregnandiol, les groupes cétoniques de la progestérone étant réduits à des groupes hydroxyles. Il a été démontré ensuite qu'après injection de plus grandes quantités de DOC, l'élimination de pregnandiol augmentait aussi. Nous avons pensé qu'il y aurait une possibilité de transformation réductrice des groupes cétoniques en groupes hydroxyles. C'est pour cette raison que nous avons réduit de la DOC et de la cortisone et avons examiné la réaction de ces substances réduites avec le sulfate diméthylé.

*Mode préparatoire de la DOC réduite et de la cortisone réduite* (Finholt et Nystrom).

La moitié d'un millimol de DOC, c'est-à-dire 116 mg. ont été traités avec 200 mg. d'hydrure de lithium-aluminium et 100 ccm. de tétrahydrofurane sèche pendant 2 heures à ébullition sous reflux. Après quoi, la tétrahydrofurane

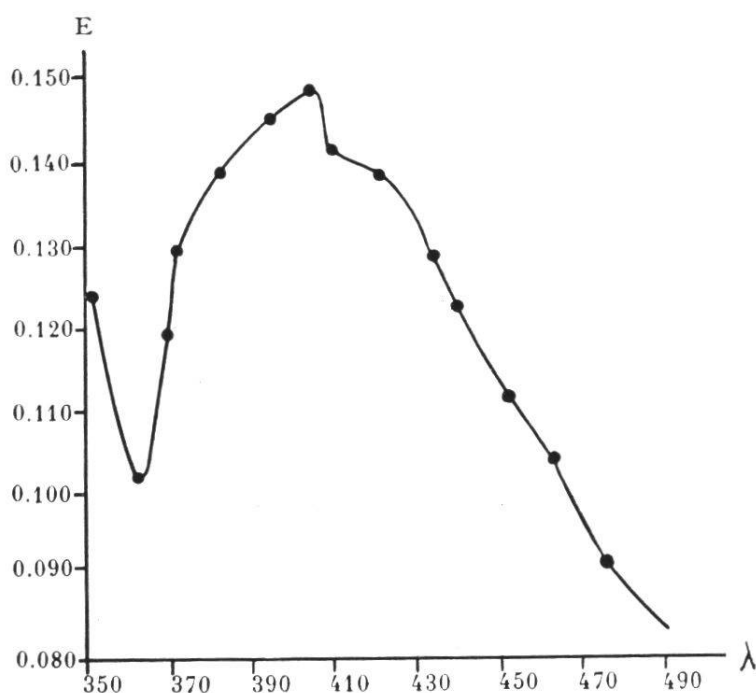
a été éliminée par distillation et le résidu repris par de l'éther. L'excès d'hydrure de lithium-aluminium a été détruit par addition d'eau et, après avoir ajouté de l'acide sulfurique  $2n$ , on a extrait le produit de réduction avec de l'éther. L'extrait a été évaporé et le résidu séché sous vide. On a obtenu ainsi une huile incolore que l'on a dissoute dans le chloroforme à fin d'examen par la réaction au sulfate diméthylique. La réduction de la cortisone a été effectuée de façon analogue, à cette différence près que dans ce cas la substance a été obtenue sous forme cristalline.

### La réaction de la DOC réduite et de la cortisone réduite avec le sulfate diméthylique

Tandis que la cortisone non réduite ne donne pas de réaction avec le sulfate diméthylique, nous avons obtenu avec la cortisone réduite une solution brunâtre ; par excitation à la lumière blanche ou aux rayons ultra-violets on obtient pour la :

- 1° cortisone réduite : 2 bandes de fluorescence : orange-jaune entre 588 et 613  $m\mu$ , et verte entre 515 et 567  $m\mu$  ;
- 2° pour la DOC réduite : 2 bandes de fluorescence : rouge très faible entre 588 et 613  $m\mu$ , et verte entre 503 et 548  $m\mu$ .

Nous n'avons pas obtenu cette réaction avec l'urine non hydrolysée. Par contre, en hydrolysant l'urine avant l'extraction avec de l'acide chlorhydrique, nous avons pu obtenir une réaction se comportant, aussi bien quant au spectre d'absorption qu'au spectre



Courbe d'absorption de la cortisone réduite en fonction de différentes longueurs d'ondes.

de fluorescence, de façon semblable à la cortisone réduite. Pour constater cependant si réellement ces corticoïdes sont éliminés sous cette forme, une opération d'isolement serait nécessaire.

### **L'action exercée par le foie sur les corticostéroïdes**

Comme nous l'avons démontré par des essais ci-dessus, il n'est pas possible par notre méthode d'identifier dans l'urine, ni avant ni après administration de DOC, aucun des corticostéroïdes réagissant avec notre méthode ; bien que l'on trouve dans la littérature des indications selon lesquelles on peut constater la présence de DOC dans l'urine même sans administration préalable de la DOC. Etant donné qu'après injection de fortes doses de DOC, on ne retrouvait pas cette hormone dans l'urine, on pouvait envisager les possibilités suivantes : 1<sup>o</sup> l'utilisation par l'organisme de grandes quantités de corticoïdes, ce qui est improbable, 2<sup>o</sup> déposition dans les organes ou 3<sup>o</sup> transformation de ces corticoïdes dans l'organisme en d'autres substances.

D'après ce qui a été relaté au début de ce travail, il apparaît que nous sommes maintenant en possession de quelques notions sur la genèse des hormones corticosurréaliennes. Mais nous ignorons par contre ce que deviennent ces hormones dans l'organisme ; nous ignorons quelle est la part qui y est dégradée et quelle est la part qui est éliminée. Nous avons quelques indications concernant des transformations auxquelles sont sujets des stéroïdes dans le foie.

FORBES, GREEN, SAMUELS en effet ont fait sur des animaux des essais, qui permettent de conclure à une action d'inactivation des hormones dans le foie.

FORBES, TH. R. et HOOKER CH. W. (l. c.) ont introduit de la progestérone dans la rate ou dans la veine porte ; de cette manière l'hormone doit traverser le foie avant d'atteindre le système circulatoire. La progestérone absorbée fut inactivée dans ce sens que l'on n'a pu observer d'effet de cette substance sur les animaux traités.

GREEN D. M. (l. c.) a constaté une diminution des effets de la DOC dont des boulettes avaient été implantées dans la rate.

EVERSOLE W. J. et GAUNT R. (1943) ont implanté les boulettes de DOC dans le mésentère ou la rate d'animaux surrénalectomisés ce qui a eu pour effet une diminution de la croissance et du degré de survie chez ces animaux.

THORN G. W. et coll., d'autre part, ont observé que l'extrait cortical administré à des malades addisoniens par voie orale était actif et soulageait les symptômes pathologiques chez ces malades.

VENNING et BROWNE avaient déjà apporté la preuve d'une conversion possible progestérone-pregnandiol. Et CUYLER avait isolé du pregnandiol dans l'urine après avoir administré de la DOC à un homme.

WESTPHAL aussi trouve qu'une grosse partie de DOC administrée est éliminée sous forme de pregnandiol. L'hormone corticosurrénalienne est donc réduite dans l'organisme humain ou animal à un diol.

SAMUELS L. T. (l. c.), d'autre part, trouve que le foie de rat *in vitro* détruit la constitution  $\alpha$ ,  $\beta$ -non saturée de la testostérone et de la progestérone et exerce une action similaire sur le noyau A des corticoïdes  $\alpha$ ,  $\beta$ -non saturés, ce qui fait conclure à une action de saturation.

Tous ces faits permettent de conclure qu'il existe un système de transformation hépatique qui consiste en une action de saturation des stéroïdes dans le foie. D'autre part, le fait qu'une grande partie d'hormones corticosurrénales injectées à des personnes ou des animaux est éliminée sous forme de 17-cétostéroïdes (Engstrom, Pincus) est une preuve que la dégradation de ces hormones dans l'organisme s'effectue aussi sur la chaîne latérale.

Nous avons tenté, par des essais *in vitro*, d'examiner à quelles transformations est soumise la DOC dans l'organisme. Etant donné que ces transformations ont lieu surtout dans le foie, nous avons en premier lieu concentré nos efforts sur cet organe.

Par des essais de contrôle préliminaires nous avons constaté l'absence de corticoïdes, réagissant avec le sulfate diméthylique, dans les tissus de différents organes d'animaux, comme : les reins, les testicules, les poumons, les muscles, les ovaires et le foie. A cet effet, nous avons partagé les organes traités en deux parties dont l'une était additionnée respectivement de : 1  $\gamma$ , 5  $\gamma$  et 10  $\gamma$  de DOCA et l'autre laissée telle quelle. Après extraction de chacune des parties, la réaction au sulfate diméthylique était faite. Tandis que la partie additionnée de DOCA donnait une fluorescence correspondant à la teneur en DOCA ajoutée, l'autre partie de l'organe examiné ne réagissait pas.

Tab. 8. Détermination des corticoïdes dans les différents organes avec et sans adjonction de DOCA

N°	Organe examiné	Résultats sans addition de DOCA	DOCA ajouté en $\gamma$	Résultats après examen de l'organe additionné de DOCA en $\gamma$
1	Rein	0	1	0,9
2	»	0	5	4,5
3	»	0	10	9
4	Testicules	0	1	0,9
5	»	0	5	4,5
6	»	0	10	8
7	Muscles	0	1	0,9
8	»	0	5	4,5
9	»	0	10	9
10	Poumon	0	1	0,8
11	»	0	5	4,5
12	»	0	10	9
13	Ovaire	0	1	0,9
14	»	0	5	5
15	»	0	10	8
16	Foie	0	1	0,7
17	»	0	5	4
18	»	0	10	8

Dans la première partie de ces expériences, nous avons essayé tout d'abord d'examiner si la dégradation de la DOC peut avoir lieu dans l'homogénisat de foie et, si tel était le cas, si c'est un processus de fermentation. Par d'autres essais, nous avons recherché des points de repère pouvant nous indiquer quel genre de transformation s'effectue dans le foie.

A cette fin, nous avons examiné l'homogénisat quant à sa teneur en DOC avant et après l'incubation, avec notre méthode et en même temps avec celle de STAUDINGER. Une partie aliquote a été examinée pour sa teneur en 17-cétostéroïdes (Callow).



*Mode opératoire :*

Des rats adultes mâles d'un poids de 200-250 gr. ont été tués par saignée ; le foie aussitôt extirpé et pesé a été homogénéisé avec une solution-tampon d'un pH = 7,38. Cette solution a été préparée comme suit : une part de tampon de phosphate était mélangée avec quatre parts de solution de Ringer. 1 gr. de foie était homogénéisé avec la quantité de tampon mentionnée dans les tableaux 9 à 12 et l'homogénéisat était centrifugé. On prélevait du liquide ainsi séparé 10 ccm. que l'on introduisait dans un Erlenmeyer de 50 ccm. Suivant les essais projetés, des quantités différentes de DOC-glucoside y étaient ajoutées. L'incubation se faisait dans un thermostat à 37° C. La durée d'incubation variait suivant la quantité de corticostéroïde ajoutée, de 10 min. à 7 heures. Au terme de l'incubation désirée, on prélevait des quantités nécessaires pour les déterminations quantitatives.

Dans les essais avec la cortisone on procédait aux déterminations d'après la méthode Staudinger, dans ceux avec les 17-céto-stéroïdes d'après la méthode modifiée par Callow, N. H. et coll.

*Résultats :*

*Tab. 9. Influence de l'homogénéisat de foie sur la transformation du DOC-glucoside*

N°	Poids du foie en gr.	Solution tampon par 1 gr. de foie	Temps d'incubation min.	DOC-glucoside par 0,5 ccm. d'homogénéisat	
				avant	après
				l'incubation en $\gamma$	
1	7,6	2,9	10	12,5	traces
2	6,4	3,2	15	12,5	0
3	7,2	3,0	20	12,5	0
4	8,0	3,0	20	12,5	0

Comme il ressort de ce tableau le DOC-glucoside additionné à l'homogénéisat de foie se transforme dans certains essais en l'espace de 10 min. en un composé qu'il a été impossible d'identifier avec notre méthode. Afin d'examiner si cette transformation est un processus de fermentation, nous avons divisé l'homogénéisat de foie en deux parties. Dans une partie nous avons inactivé les ferments en chauffant à 72° C pendant 10 min. Comme on le voit d'après le tableau 10, l'homogénéisat traité ainsi par la chaleur ne possède plus ce pouvoir de transformation.

*Tab. 10. Influence de la température sur la transformation du DOC-glucoside dans l'homogénisat*

N°	Poids du foie en gr.	Solution tampon par 1 gr. de foie	Temps d'incubation min.	DOC- glucoside ajouté en $\gamma$	Résultats d'examen	
					avec chauffage préalable à 72°	sans chauffage préalable en $\gamma$
1	7,2	3,2	15	50	46	7
2	6,8	3,2	15	50	45	9
3	8,1	3,0	15	50	40	0
4	7,9	3,0	15	50	46	3

Par d'autres essais, nous avons examiné l'influence exercée par le pH sur la transformation de la DOC dans l'homogénisat. Dans ce but, nous avons divisé la purée de foie en deux parties, dont une a été utilisée à la préparation d'un homogénisat avec une solution tampon de Ringer à pH = 7,34, tandis que l'autre partie était traitée par des solutions tampon de pH autres que 7,34.

*Tab. 11. Influence du pH sur la transformation du DOC-glucoside dans l'homogénisat de foie*

N°	Poids du foie en gr.	Solution tampon par 1 gr. de foie	Temps d'incubation min.	DOC-glucoside ajouté en $\gamma$	DOC-glucoside retrouvé après incubation			
					pH	en $\gamma$	pH	en $\gamma$
1	6,4	3,2	15	25	5,9	20	7,34	0
2	6,9	3,0	15	25	6,1	12	7,34	0
3	8,0	3,1	15	25	7,1	5	7,34	traces
4	7,9	3,2	15	25	8,3	12	7,34	0
5	7,8	2,8	15	25	8,1	12	7,34	traces

Comme il ressort du tableau 11, la transformation est la plus forte pour un pH de 7,34 ; avec des pH supérieurs ou inférieurs, la réaction se déroule plus lentement. Les essais démontrent qu'il s'agit là d'un processus de fermentation et non pas d'une destruction non spécifique de la DOC dans l'homogénisat de foie.

Dans la seconde partie de ces recherches, nous avons procédé à des essais visant à déceler des points de repère afin d'élucider comment se déroule cette transformation de la DOC dans l'homogénisat de foie.

Tab. 12. Tableau résumant les résultats obtenus avec des homogénisats de foie de rats avec addition de DOC-glucoside et d'acétate de cortisone

1 Essai N°	2 Poids du foie en gr.	3 Solution tampon par 1 gr. de foie en ccm.	4 Temps d'incubation en heures	5		6		7		8		9	
				avant	après	avant	après	avant	après	avant	après	avant	après
				incubation en γ		incubation en γ		incubation en γ		incubation en γ		incubation en γ	
				DOC-glucoside par 0,5 ccm. d'homogénisat méthode au sulfate diméthylrique		DOC-glucoside par 0,5 ccm. d'homogénisat méthode de Staudinger		Acétate de cortisone par 0,5 ccm. d'homogénisat méthode de Staudinger		17-cétostéroïdes par 1 ccm. d'homogénisat additionné de DOC-glucoside		17-cétostéroïdes par 1 ccm. d'homogénisat additionné d'acétate de cortisone	
1	7,9	2,8	3	57	7	58	33	58	51	0	0	0	0
2	5	4	4	56	7	57	30	58	54	0	0	0	0
3	7	3	5	56	6	55	36	48	32	0	0	0	0
4	7	3	4,5	57	9	57	32	54	44	0	0	0	0
5	6,5	3,2	4,5	58	7	56	27	54	48	0	0	0	0
6	6,5	3,2	5,5	57	7	58	38	47	44	0	0	0	0
7	6,8	3,2	4,5	57	6	54	38	58	47	0	0	0	0
8	8	3	4,5	56	7	58	28	50	41	0	0	0	0
9	8	3	4,5	56	7	54	36	48	40	0	0	0	0

Si cette transformation avait son origine dans la scission de la chaîne latérale en transformant l'hormone traitée en un cétostéroïde, on devrait pouvoir alors retrouver la quantité correspondante de 17-cétostéroïde dans l'homogénisat. Si, par contre, la transformation s'effectuait sur le noyau A, le pouvoir réducteur du corticoïde transformé, que l'on peut mesurer avec la méthode de Staudinger, devrait persister.

Pour pouvoir faire ces constatations, nous avons ajouté à l'homogénisat de plus grandes quantités d'hormones, et avons prolongé le temps d'incubation de façon correspondante. La durée d'incubation n'était plus de quelques minutes, comme c'était le cas lors des essais précédents, mais d'une durée de 3 à 7 heures. En plus, nous avons fait ces essais non seulement avec de la DOC, mais aussi avec de la cortisone, ce qui devait nous permettre de voir s'il y avait aussi dans cette réaction des différences entre les différents corticostéroïdes. Comme il ressort du tableau 12, on remarque tout d'abord : 1° l'absence totale de cétostéroïdes aussi bien avant qu'après incubation, 2° des différences dans l'appréciation de la teneur en DOC-glucoside après incubation d'après notre méthode et d'après celle de Staudinger, et 3° une diminution sensible du pouvoir réducteur, ceci d'après la méthode de Staudinger également. Par contre, les essais avec la cortisone aboutissent à des résultats approximativement semblables avant et après l'incubation. Cela veut dire qu'il y a des différences entre la vitesse de transformation de la DOC et celle de la cortisone. Ensuite, que cette transformation a lieu probablement en partie dans le noyau comme pour les autres stéroïdes, par saturation de la double liaison, et en partie par la transformation de la chaîne latérale.

## RÉSUMÉ

Dans la première partie de ce travail, nous avons donné un aperçu général des six principaux stéroïdes, biologiquement actifs, du cortex surrénalien. Leur structure et leur constitution ont été décrites d'une façon sommaire ainsi que leur biogénèse probable.

Les méthodes de dosage chimique de ces corticostéroïdes, élaborées jusqu'à ce jour, ont été décrites. Toutes ces méthodes sont

peu spécifiques, vu qu'elles déterminent des groupes de substances, et elles sont peu sensibles.

Dans la seconde partie, la réaction de certains corticostéroïdes actifs avec le sulfate diméthylque de DHÉRÉ et LASZT a été examinée en vue d'en élaborer une méthode de dosage quantitative. Le sulfate diméthylque donne avec quatre des six corticostéroïdes actifs des réactions de fluorescence avec une sensibilité allant jusqu'à une fraction de  $\gamma$ .

La méthode de dosage mise au point a été utilisée d'abord pour l'examen du tissu corticosurrénalien. Le fractionnement des corticoïdes extraits a été effectué par séparation chromatographique.

Cette méthode nous a permis aussi de procéder à l'examen des éliminations urinaires chez l'animal et chez l'homme.

Ni avec, ni sans administration de désoxycorticostérone-glucoside ou d'acétate de désoxycorticostérone (DOCA), on n'a pu retrouver dans l'urine aucun des corticoïdes décelables avec notre méthode.

Par contre, après injection i. v., la désoxycorticostérone (DOC) était en partie retrouvée dans l'urine.

A la suite de ces constatations, nous avons recherché le lieu de transformation probable des corticoïdes dans l'organisme.

Ces recherches ont abouti à des résultats montrant que la DOC subit une transformation dans le foie, probablement par saturation.

### Bibliographie

- ADDISON Th., On Constitutional and Local Effects of Disease of Suprarenal Capsules, M. Classies 1937, Nr. 2, 244.  
ASHBY W. R., The Journal of Mental Science 1949, XCV.  
BAKER P. B., DOBSON F. et STROND S. W., Nature 168 (1951) 114.  
BASSIL C. T. et HAIN A. M., Nature 165 (1950) 525.  
BENNETT H. S., Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med. 42 (1939) 768.  
BIEDL A., Innere Sekretion III. Auflage, Berlin 1916, S. 407, 474.  
BLOCH K. J., J. Biol. Chem. 157 (1945) 661.  
BRITTON S. W. et SILVETTE H., The Adrenal Cortex and Carbohydrate Metabolism-Cold Spring Harbor, N. Y. 1937, Nr. 5, 537.  
CALLOW N. H., CALLOW R. K. et EMMENS C. W., Biochem. Journ. 7 (1938) 32.  
CARTLAND G. F. et KUIZENGA M. H., Amer. J. Physiol. 117 (1936) 678.  
CLAESSON L. et HILLARP N. A., Acta Physiol. Scand. 13 (1947) 115.  
— — — — Acta Physiol. Scand. 16 (1948) 183.



- CONN J. W., FAJANS S. S., LOUIS L. H. et JOHNSON B., Proc. Second. Clin. ACTH 1 (1951) 221.
- CUYLER W. K., ASHLEY C. et HAMBLEN E. C., Endocrinology 27 (1940) 177.
- DAUGHADAY W. H., JAFFE H. et WILLIAMS R. H., J. CLIN. Endocr. 8 (1948) 166.
- DHÉRÉ CH. et LASZT L., C. R. Acad. d. Sci. 224 (1947) 681.
- — — — Chimia I (1947) 10.
- ENGEL L. L., Rec. Progr. in Horm. Res. 5 (1950) 335.
- ENGSTROM W. W. et MASON H. L., J. Clin. Endocr. 4 (1944) 517.
- EVERSOLE W. J., GAUNT R. et KENDALL E. C., Amer. J. Physiol. 135 (1942) 378.
- — — — Endocrinology 32 (1943) 51.
- FIESER L. F., FIELDS M. et LIEBERMANN S., J. Biol. Chem. 156 (1944) 191-201.
- FINHOLT A. E., BOND A. C. et SCHLESINGER H. J., Am. Soc. 69 (1947) 1199.
- FORBES TH. R. et HOOKER C. W., Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med. 70 (1949) 682-85.
- de FREMERY P., LAQUEUR E., REICHSTEIN T., SPANNHOF R. W. et UYLDERT J. E., Nature 139 (1937) 26.
- GREEN D. M., Endocrinology 43 (1948) 325-28.
- HARTMANN T. A., Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med. 23 (1926) 4671.
- — et coll., Amer. J. Physiol. 86 (1928) 353.
- — et THORN G. W., Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med. 28 (1930) 94.
- HAYANO M., DORFMANN R. J. et PRINS D. A., Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med. 72 (1949) 700.
- HEARD R. D. H., SOBEL H. et VENNING E. H., J. Biol. Chem. 165 (1946) 687.
- HECHTER O. et coll., J. Amer. Chem. 71 (1949) 3261.
- — — — Arch. Biochem. 25 (1950) 459.
- — — — Rec. Progr. in Horm. Res. 6 (1951) 226, 233, 234.
- HEMPHILL R. E. et REISS M., Endocrinology 41 (1947) 17-20.
- HENCH P. S., Proc. Staff Meetings Mayo Clinic 8 (1933) 430.
- HENLE J., Z. rat. Med. III Reihe 24 (1865) 143.
- HOFMANN H. et STAUDINGER HJ., Biochem. Zeitschr. 322 (1951) 231.
- JENSEN H. et GRATTAN J. F., Amer. J. Physiol. 128 (1940) 270.
- KENDALL E. C., Proc. Staff Meetings Mayo Clinic 12 (1937) 136.
- — MASON H. L., HÖHN W. M. et MC KENZIE, B. F., J. Biol. Chem. 119 (1937) lvi.
- — — — Proc. Staff Meetings Mayo Clinic 12 (1937) 270.
- — HARRIS A. S. et THIMANN K. V., Vitamins et Hormones 1948, vol. VI, 277-327.
- LÖB R. F., Science 76 (1932) 420.
- LÖWENSTEIN B. E., CORCORAN A. C., PAGE I. H., Endocrinology 39 (1946) 82.
- LONG C. N. H., Rec. Progr. in Horm. Res. 1 (1947) 177.
- — KATZIN B. et FRY E. G., Endocrinology 26 (1940) 309.
- MAC FADYEN D. A., J. Biol. Chem. 158 (1945) 107.
- MAÑARO J. M. et ZYGMUNTOWICZ A., Endocrinology 48 (1951) 114.
- MARKER R. E., J. Amer. Chem. Soc. 60 (1938) 1725.
- MASON H. L., MYERS C. S. et KENDALL E. C., J. Biol. Chem. 114 (1936) 613-631.
- — HÖHN W. M., MCKENZIE B. F. et KENDALL E. C., J. Biol. Chem. 120 (1937) 719.

- MILLER D. C. et EVERETT J. W., *Endocrinology* 42 (1948) 421.  
NEHER R. et WETTSTEIN A., *Helv. Chim. Acta* 34 (1951) 2278.  
NYSTROM R. F. et BROWN W. G., *Am. Soc.* 69 (1947) 1197, 2548.  
PARKINS W. M., SWINGLE W. W., TAYLOR A. R. et HAYS H. W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med.* 37 (1938) 675.  
PINCUS G., *Endocrinology* 32 (1943) 176.  
PORTER C. C. et SILBER R. H., *J. Biol. Chem.* 185 (1950) 201.  
REICHSTEIN T., *Helv. Chim. Acta* 19 (1936) 1107.  
— — *Helv. Chim. Acta* 20 (1937) 953, 978.  
— — *Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden* 1938, vol. V, 1411.  
— — *Helv. Chim. Acta* 21 (1938) 161, 1197, 1209.  
— — *Helv. Chim. Acta* 24 (1941) 1140.  
— — *Helv. Chim. Acta* 26 (1943) 747.  
— — *Helv. Chim. Acta* 27 (1944) 1287.  
— — et coll., *Koninkl. Akad. v. Wetensch. Amsterdam. Proc.* 39 (1936) 10.  
— — et SCHOPPEE C. W., *Vitamins et Hormones* 1943, vol. I, 346-412.  
REINECKE R. M. et KENDALL E. C., *Endocrinology* 31 (1942) 573.  
RONDONI P., CARMINATI V. et CORBELLINI A. Z., *Physiol. Chem.* 244 (1936) 71.  
SAMUELS L. T., *Rec. Progr. in Horm. Res.* 4 (1949) 65-83.  
SARETT L. H. J., *J. Biol. Chem.* 162 (1946) 601.  
SAVARD K., LEWIS L. H. et GREEN A. H., *Fed. Proc.* 9 (1950) 223.  
SAYERS G., SAYERS M. A., LIANG T. Y. et LONG C. N. H., *Endocrinology* 38 (1946) 1.  
SELYE H., *Brit. Med. Journ.* 1 (1950) 203.  
— — *Textbook of Endocrinology*, Acta Endocrinologica Inc., Montreal, Canada 1950, 78, 86.  
— — *The Physiology and Pathology of Exposure to Stress*, Acta Inc., Medical Publishers, Montreal, Canada 1950.  
— — DOSNE C., BASSETT L. et WHITTAKER J., *Can. Med. Assoc. J.* 43 (1940) 1.  
— — et SCHENKER V., *Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med.* 39 (1938) 518.  
SPRECHLER M., *Acta Endocrin.* 4 (1950) 205.  
SRERE P. A., CHAIKOFF I. L. et DAUBEN W. C., *J. Biol. Chem.* 176 (1948) 829.  
STAUDINGER HJ. et SCHMEISSER M., *Z. Physiol. Chem.* 283 (1948) 94.  
— — — — *Biochem. Zeitschr.* 321 (1950) 83-92.  
STEIGER M. et REICHSTEIN T., *Nature* 139 (1937) 925.  
— — — — *Helv. Chim. Acta* 20 (1937) 1164.  
STEWART G. N., *J. of Pharmacol.* 29 (1926) 373.  
— — et ROGOFF J. M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med.* 22 (1925) 394.  
— — — — *Amer. J. Physiol.* 78 (1926) 683.  
SWINGLE W. W., *Amer. J. Physiol.* 79 (1927) 666.  
— — *Amer. J. Physiol.* 86 (1928) 25-31, 450.  
— — et coll., *Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med.* 25 (1928) 472.  
— — et PFIFFNER J. J., *Science* 72 (1930) 75-76.  
— — — — *Amer. J. Physiol.* 96 (1931) 153, 164, 180.  
— — — — *J. Biol. Chem.* 104 (1934) 701.

- TALBOT N. B. et SALTZMANN H. A., *J. Biol. Chem.* 160 (1945) 535.  
THADDEA S., *Die Nebennierenrinde*, Georg Thieme Verlag, Leipzig 1936, 10.  
THORN G. W., EMERSON K. JR. et EISENBERG H., *Endocrinology* 23 (1938) 403.  
VENNING E. H. et BROWNE J. S. L., *Endocrinology* 21 (1937) 711.  
VERZAR F. et LASZT L., *Biochem. Zeitschr.* 278 (1935) 396.  
VULPIAN A., *C. r. Acad. d. Sci.* 43 (1856) 663.  
WEISSBECKER L. et STAUDINGER HJ., *Klin. Wochenschr.* 29 (1951) 59.  
WESTPHALL U., *Zeit. Physiol. Chem.* 273 (1942) 13.  
— — *Zeit. Physiol. Chem.* 281 (1944) 14.  
WICK A. N., RECKA E. JR. et MEDZ. R., *J. Clin. Endocrin.* 10 (1950) 84.  
WINTERSTEINER L. et PFIFFNER J. J., *J. Biol. Chem.* 111 (1935) 599.  
— — — — *J. Biol. Chem.* 116 (1936) 291.  
— — VARS H. M. et PFIFFNER J. J., *J. Biol. Chem.* 111 (1935) 585.  
WOODWARD R. B., SONDHEIMER F. et TAUB D., *J. Amer. Chem. Soc.*  
73 (1951) 4057.  
ZAFFARONI A., BURTON R. B. et KEUTMANN E. H., *J. Biol. Chem.* 177 (1949) 109.  
— — — — *Science* 111 (1950) 6.  
— — — — *J. Biol. Chem.* 188 (1951) 763.  
— — HECHTER O. et PINCUS G., *Journ. of Amer. Chem. Soc.* 73 (1951) 1390.