

APERÇU SUR LES MÉTHODES DE DOSAGE DES STÉROÏDES

par

J.F. BECKERS, P. BALLMAN, F. ECTORS et J. DERIVAUX

Le déroulement normal du cycle sexuel requiert l'intégrité de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien et une harmonieuse coordination des régulations réciproques des différentes hormones.

Les méthodes de recherche moderne, et notamment la radioimmunologie, permettent d'établir quel est, à chaque moment, le taux plasmatique des diverses hormones, de juger ainsi de leur interférence réciproque et du mécanisme éventuel de leur régulation. On a pu observer de la sorte la synergie des variations des taux plasmatiques de F.S.H. et de L.H. et montrer que les pics de ces hormones apparaissaient quelques heures avant le phénomène de l'ovulation. En dehors de cette période les taux de F.S.H. et de L.H. sont relativement constants; ceux de la première étant plus élevés que ceux de la seconde. L'hypophyse est sous le contrôle des releasing-factors hypothalamiques dont la sécrétion dépend pour une part des hormones ovariennes : folliculine et progestérone.

On ne peut donc arriver à connaître de façon précise le mécanisme du cycle sexuel dans les diverses espèces, qu'en établissant le bilan hormonal complet, ce qui suppose dès lors la recherche des variations du taux des stéroïdes ovariens au même titre que furent recherchées les variations du taux des hormones hypophysaires. C'est de cette manière que l'on peut espérer comprendre les mécanismes régulateurs hypothalamo-hypophyso-ovariens des systèmes folliculotrope et lutéotrope.

Dans l'article qui va suivre, nous allons chercher à donner une vue synthétique des méthodes utilisées pour la mise en évidence des stéroïdes. Avant cela, nous rappellerons brièvement quelle en est l'origine.

STRUCTURE ET NOMENCLATURE DES STÉROÏDES HORMONAUX

Comme tous les stéroïdes naturels, les stéroïdes hormonaux possèdent le noyau stérane ou cyclopentanoperhydrophénanthrène à 17 atomes de carbone conventionnellement numérotés de 1 à 17 (Fig. N° 1). Sur ce squelette de base se greffent en C₁₀ et en C₁₃ les carbonnes C₁₈ et C₁₉ et la structure peut se compliquer d'une chaîne latérale à 3 atomes de carbone fixée sur le carbone 17. Ce noyau stérane est analogue à celui du cholestérol et des acides biliaires. L'ossature comporte 4 noyaux identifiés par les lettres A, B, C, D, les 3 premiers sont hexagonaux, le 4^o pentagonal.

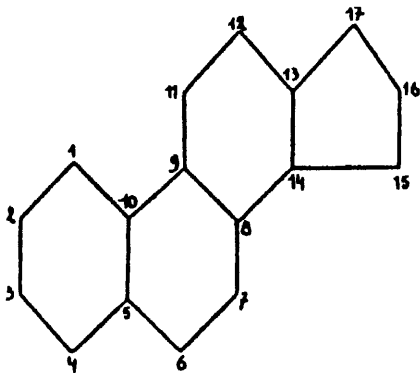


Fig. N° 1 - Noyau du cyclopentanophénanthrène avec la numérotation des différents carbonnes.

Chaque point de jonction porte un carbone dont les valences non satisfaites entre elles, le sont par un ou deux H, généralement non représentés sur les formules de structure.

Les deux cycles A et B sont en position cis (même plan) ou trans (plan différent) l'un par rapport à l'autre; par contre la jonction des cycles B et C, C et D est toujours de type trans. Pour exprimer la stéréoisométrie, on utilise la notation α pour la position trans et la notation β pour la position cis.

Le suffixe *ane* indique que le noyau est entièrement saturé, le suffixe *ène* la présence d'une double liaison, diène de deux doubles liaisons etc... La position de la double liaison est indiquée par le numéro du carbone dont elle part et, sauf indication contraire, qui sera mentionnée, elle aboutit au carbone immédiatement suivant; ainsi la liaison commençant au carbone 5 peut se terminer au carbone 6 ou au carbone 10, elle sera respectivement désignée par les termes 5-ène ou 5(10)ène.

Pour des raisons de convenance la double liaison est souvent mentionnée par le signe Δ ; ainsi la notation Δ^4 signifie une double liaison en partance du carbone 4. La fonction hydroxyle s'exprime par « ol », la fonction cétone en « one » ; le préfixe « nor » signifie l'élimination du groupe méthyl, ex. le 19 nor-testostérone est due à l'élimination du C_{19} de la testostérone.

L'inversion d'un substituant entre les formes α et β est signalée par le préfixe « Epi » (par ex. épiandrostérone).

Il est important de connaître les notions détaillées de structure et de conformation pour comprendre les propriétés physico-chimiques de ces molécules.

BIOSYNTHÈSE DES STÉROÏDES NATURELS (hormones)

Il semble bien que chaque glande endocrine, productrice de stéroïdes, développe les mêmes étapes initiales de la biosynthèse, les différences étant, à ce moment, essentiellement quantitatives. Cette voie synthétique commune passe par le cholestérol.

Au départ, le maillon à 2 atomes de carbone de l'acétate est activé par couplage avec le coenzyme A (acétyl-CoA) ce qui conduit à l'unité isoprénique biologique, dite l'isopentényl pyrophosphate.

Ces unités isopréniques, en se condensant, donnent naissance au squalène qui se cyclise en lanostérol qui deviendra le cholestérol en passant par le stade de zymostérol et de desmostérol.

Le cholestérol subit 2 hydroxylations, puis se clive par l'action d'une desmolase, ce qui aboutit à la formation d'aldéhyde isocaproïque (Fig. N° 2) et d'un stéroïde à 21 atomes de carbone la pregnénolone qui va constituer le pool disponible pour la synthèse des divers stéroïdes actifs : progestérone – corticostéroïdes – androgènes – œstrogènes.

Le passage de la pregnénolone à la progestérone suppose d'abord une oxydation de l'hydroxyle situé en C et le transport de la double liaison de 5-6 à 4-5 ce qui signifie l'intervention d'une oxydo-réductase et d'une insomérase.

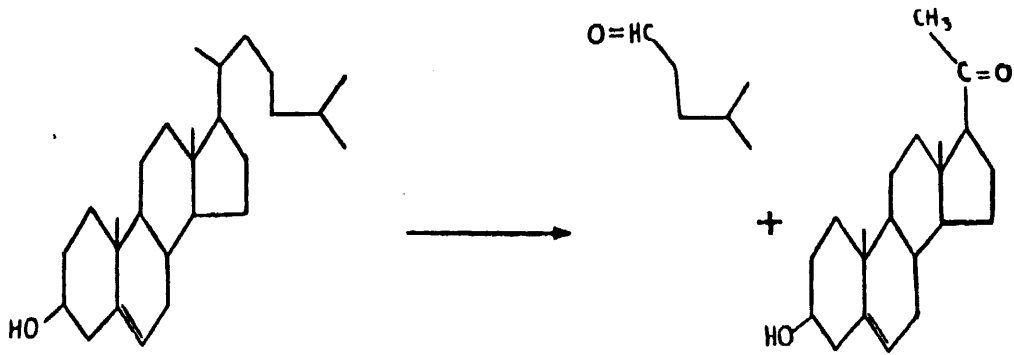


Fig. N° 2 - Clivage du cholestérol en aldéhyde isocaproïque et prégnénolone.

La progestérone apparaît comme la véritable plaque tournante vers les autres composés actifs : corticostéroïdes - androgènes - œstrogènes (Fig. N° 3 et 4).

Les stéroïdes subissent dans l'organisme une série de transformations relevant de l'action de systèmes enzymatiques divers dans lesquels interviennent des déshydrogénases, réductases, hydrolases, liases et transférases. Ces transformations métaboliques se produisent principalement au niveau du foie mais également au niveau des tissus périphériques et des glandes; il en résulte la formation de substances apparentées, souvent moins actives et qui se distribuent dans l'organisme avant d'être éliminées par les urines et dans les matières fécales.

Les métabolites circulants se trouvent sous forme libre, directement active, ou sous forme conjuguée principalement sous forme de sulfate.

Dans le plasma, l'hormone se trouve sous forme libre ou sous forme liée à une protéine (complexe hormono-protéique) du moins la chose a-t-elle été démontrée en ce qui concerne les hormones stéroïdes; le rapport entre la quantité d'hormone libre et la quantité d'hormone liée est régi par la loi d'action des masses à savoir.

$$\frac{\text{(couple hormono-protéique)}}{\text{(protéine porteuse) (hormone libre)}} = K$$

si bien que la concentration de l'hormone libre est directement proportionnelle à la concentration totale de l'hormone et inversement proportionnelle au nombre de sites inoccupés de la molécule porteuse. Les protéines de transport sont essentiellement représentées par les α ou β globulines mais la protéine de transport peut

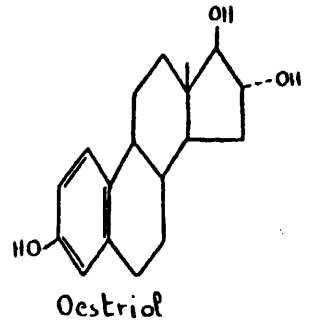
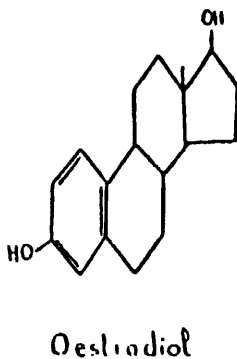
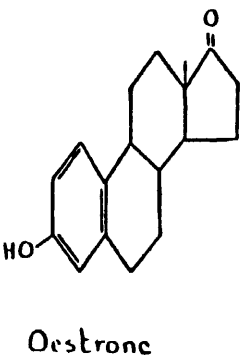
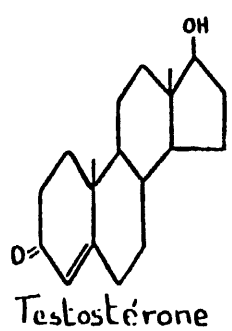
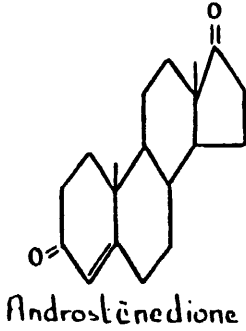
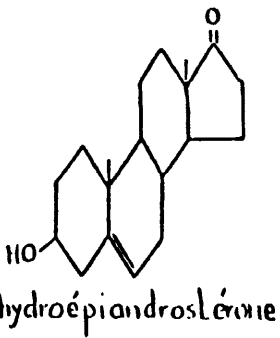
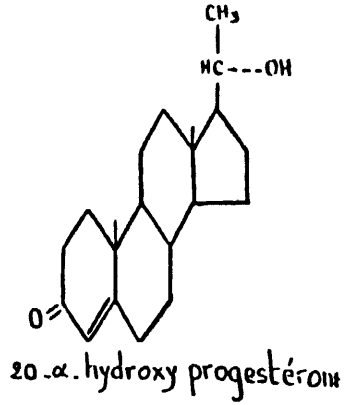
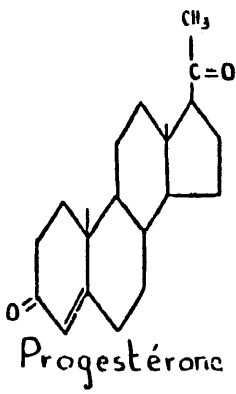
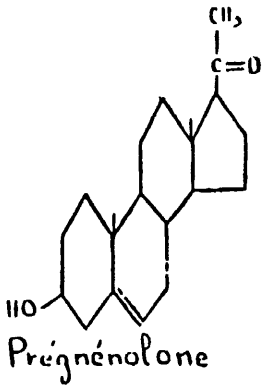


Fig. N° 3 - Principaux stéroïdes en C₁₈ : Œstrone, Œstradiol et Œstriol.
 En C₁₉ : Dehydroépiandrostérone, androsténédione, testostérone.
 En C₂₁ : prégénolone, progestérone, 20 Hydroxyprogestérone.

aussi se situer dans la fraction albumine. Ces protéines vectrices sont élaborées par le foie.

Généralement le transport est spécifique encore qu'une même globuline puisse parfois fixer deux hormones : ainsi en est-il de la transcortine, ou α globuline qui peut fixer à la fois la progestérone et le cortisol. La liaison est réversible et étroitement dépendante de la température : maximale à 4°C, elle s'abaisse progressivement vers 42°C et est détruite à 60°C.

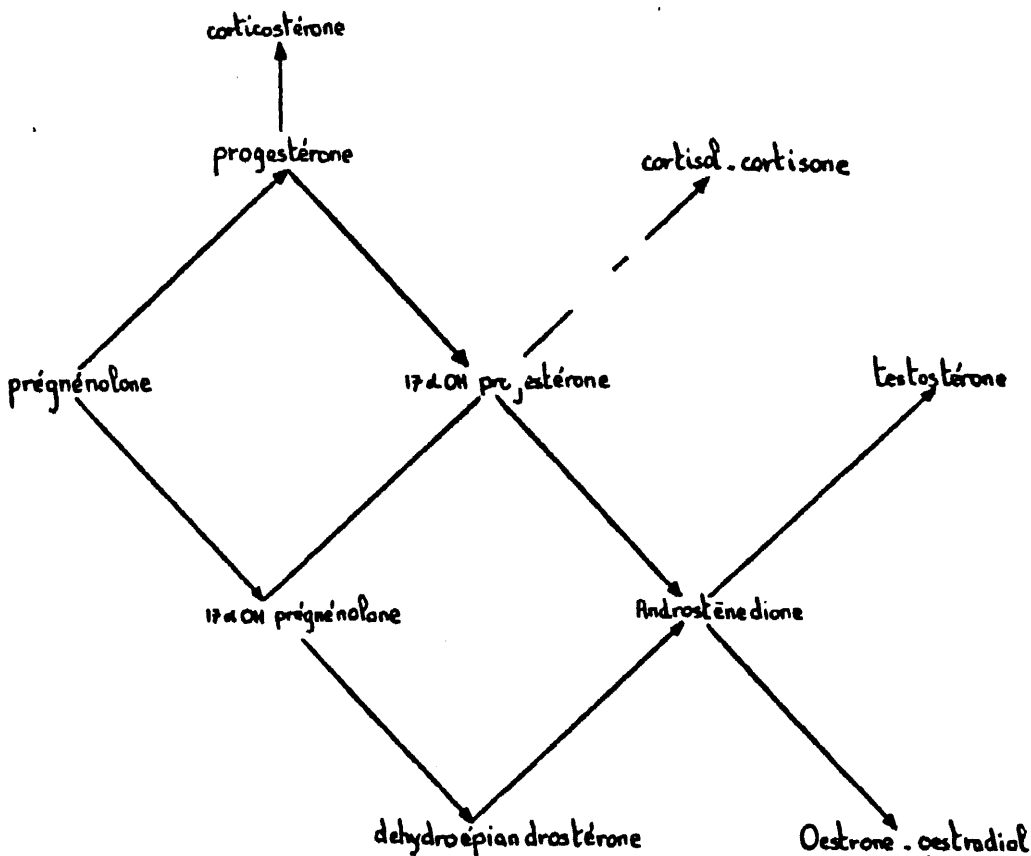


Fig. N° 4 - Principales voies de synthèse des stéroïdes.

L'œstradiol tout comme la testostérone sont transportés électivement par une β globuline.

Cette liaison hormono-protidique représente une sorte de stockage hormonal plasmatique, elle protège l'hormone vis-à-vis des processus de dégradation et d'élimination.

L'hormone libre assure les fonctions de la glande et son rôle physiologique est donc particulièrement important pour ne pas dire capital. Les composés stéroïdes comme les autres hormones agissent comme des éléments de communication intercellulaire, ils peuvent être considérés comme des activateurs génétiques transportant une information, agissant au niveau moléculaire à de très basses concentrations et provoquant une réaction cellulaire spécifique. (Le stéroïde actif doit donc être considéré comme un signal se fixant sur un récepteur).

Ainsi les œstrogènes exercent une action sur la synthèse des protéines comme en témoigne l'élévation des R.N.A. et D.N.A. intracellulaire et l'abolition de ces effets par la puramycine et l'actinomycine inhibiteurs de cette synthèse. Cette synthèse porte à la fois sur les protéines structurales et les molécules enzymatiques.

MÉTHODE DE DOSAGE

Les méthodes de dosage sont variées et d'inégale valeur sur le plan de la précision.

MÉTHODES BIOLOGIQUES

Elles consistent à injecter le plasma contenant l'hormone à identifier ou à doser à un animal réactif, de constater et de quantifier les effets de l'hormone sur un organe récepteur ou sur une fonction.

Au nombre de ces méthodes rappelons la kératinisation de l'épithélium vaginal, l'augmentation de poids de l'utérus chez les rongeurs immatures ou castrés en ce qui concerne les œstrogènes, l'apparition de la dentelle utérine chez la lapine castrée ou immature préparée par l'œstradiol, le maintien de la gestation chez la rate gravide, castrée au 10^e jour de la gestation, le test d'inhibition de l'avortement ocytocinique chez la lapine pour ce qui est de la progestérone. Ces méthodes sont inadéquates pour mesurer les faibles doses de stéroïdes circulants, elles manquent de précision et de spécificité; leur valeur est essentiellement qualitative.

MÉTHODES CHIMIQUES

Elles reposent sur la colorimétrie et la fluorométrie et s'adressent à l'hormone et à ses métabolites.

a) La colorimétrie

La colorimétrie a pour objet de mesurer l'intensité d'absorption lumineuse d'un chromogène obtenu après réaction chimique. Méthode de bonne spécificité, la colorimétrie est cependant d'exactitude assez réduite par suite de la présence fréquente de chromogènes interférents. Si elle présente l'avantage de la simplicité, la méthode reste cependant de sensibilité assez limitée.

b) Fluorométrie

Elle repose sur le principe que certains stéroïdes excités par des radiations de faible longueur d'onde, (U.V.) émettent à une

longueur d'onde supérieure dans le spectre visible. Elle est de moins bonne spécificité que la colorimétrie et son rendement est fonction de la température, de la viscosité et des impuretés éventuelles. La spécificité et la précision peuvent être augmentées si l'on réalise des purifications préalables.

c) La chromatographie

La chromatographie en phase gazeuse est une excellente méthode pour séparer et identifier les différents stéroïdes.

Les produits à tester sont vaporisés à haute température puis entraînés par un gaz neutre à travers une colonne dans laquelle ils se séparent. Les problèmes de stabilité des stéroïdes dans ces conditions ont été résolus par l'emploi de colonnes renfermant une phase stationnaire.

Les composés séparés sur la colonne passent alors devant un détecteur qui permet une détermination quantitative.

Les conditions d'application de cette méthode sont multiples, mais elles exigent une grande habileté et une haute technicité de la part des utilisateurs. De plus les étapes de purifications préliminaires sont parfois assez astreignantes surtout lorsqu'on étudie des stéroïdes présents en très petites quantités comme c'est le cas le plus souvent dans le plasma.

MÉTHODES ISOTOPIQUES

Parmi les méthodes isotopiques, il faut signaler surtout la méthode de Murphy dite « competitive protein-binding essays ».

Le principe de cette méthode repose sur la réaction compétitive existant entre un stéroïde marqué (dit chaud) et un stéroïde non marqué (dit froid) pour une protéine porteuse. L'hormone à doser déplace donc par « compétition » une certaine quantité de l'hormone radioactive fixée sur la protéine et ce déplacement est proportionnel à la quantité d'hormone non marquée (froide) ajoutée dans le milieu.

Il suffit de mesurer le déplacement en comptant la radioactivité soit de l'hormone marquée encore fixée à la protéine, soit de l'hormone déplacée; la séparation de l'hormone marquée libre de l'hormone encore liée s'opère généralement par absorption sur flo-risil ou sur charbon-dextran.

Il faut évidemment établir une courbe standard définissant la décroissance de la radioactivité en fonction de l'augmentation de la quantité d'hormone étalon froide introduite dans le milieu.

Pour réaliser le dosage proprement dit, il suffit d'introduire l'échantillon à doser en lieu et place de l'hormone froide et de reporter les valeurs obtenues sur la courbe standard.

Le choix de la protéine porteuse est fonction de l'hormone à doser; il s'agit d'une globuline humaine pour la thyroxine, d'une globuline d'origine humaine, canine, ou en provenance du singe pour les corticostéroïdes.

La protéine de liaison pour la progestérone est fournie soit par le sérum de cobaye gestant, soit par le sérum de chien.

La protéine de liaison pour la testostérone est fournie par le sérum humain, tandis que celle servant à la recherche des œstrogènes est en provenance du rat.

Ces liaisons spécifiques de l'hormone avec des protéines plasmatiques déterminées ont l'avantage d'être stables, de ne pas nécessiter de manipulations particulières et d'être spécifiques.

Cette méthode de « protein-binding » est très sensible et de réalisation facile.

MÉTHODE RADIOIMMUNOLOGIQUE

Mise au point par Yalow et Berson pour le dosage de l'insuline plasmatique et largement utilisée pour le dosage des différentes stimulines hypophysaires, la méthode radioimmunologique est également employée pour le dosage des stéroïdes. Ceux-ci ne sont pas immunogéniques par eux-mêmes, mais ils le deviennent par couplage avec des protéines porteuses.

Les groupements hydroxyl et cétone portés par les stéroïdes ne peuvent fournir une liaison suffisamment forte avec les protéines; c'est la raison pour laquelle il faut préparer d'abord des dérivés stéroïdes renfermant des groupes COOH libres que l'on couple ensuite à l'albumine bovine ou humaine.

La première étape consiste donc à transformer le stéroïde soit en succinate soit en oxime; la seconde à fixer ceux-ci sur la protéine porteuse.

L'estérification du groupement hydroxyle s'opère à partir de l'anhydride succinique (Fig. N° 5) tandis que la formation

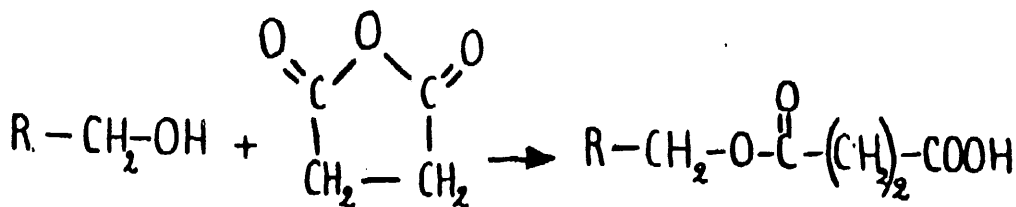


Fig. N° 5 - Estérification d'un groupement hydroxyl par l'anhydride succinique.

d'oxime est obtenue par action de la carboxyméthylhydroxylamine sur le groupement cétone (Fig. N° 6); le couplage avec la protéine s'effectue soit par la carbodiimide, soit par la glutaraldéhyde soit encore par la méthode des anhydrides mixtes.

L'expérience a montré que les meilleurs antisérums étaient obtenus si la protéine était greffée le plus loin possible des groupements déterminants du stéroïde.

Les espèces animales le plus souvent employées pour l'immunisation sont le mouton et le lapin; la technique suivie peut varier suivant les laboratoires. L'hormone préparée est émulsionnée dans l'adjuvant complet de Freund. Chez le mouton les injections sont réalisées par voie sous-cutanée, répétées d'abord toutes les semaines pendant six semaines, puis chaque mois. Les prises de sang sont effectuées par ponction de la jugulaire et le sérum est ensuite examiné quant à son titre, son affinité, sa spécificité.

Pour ce qui nous concerne, nous recourons plus volontiers au lapin; l'antigène préparé est réparti en 20 à 25 injections intradermiques de 0.1 cc chacune, pratiquées au niveau de la région dorsale. Les injections sont répétées jusqu'à obtention d'un taux suffisant d'anticorps, soit environ pendant 21 semaines.

Nous avons déjà décrit en détail les diverses étapes de la méthode radioimmunologique dans son application au dosage des hormones hypophysaires et on voudra bien s'y référer. Les variantes qu'elle impose pour le dosage des hormones stéroïdes, ces-

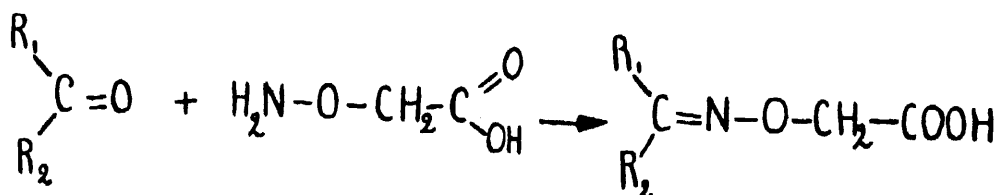


Fig. N° 6 - Réaction d'une fonction cétone avec l'O-carboxyméthylhydroxylamine.

trogènes et progestérone, résident surtout dans la nécessité de procéder à l'extraction préalable de ces dernières.

Cette extraction s'effectue à partir de l'un ou l'autre des solvants suivants : éther de pétrole, hexane ou éther diéthylique.

Le mélange sérum-solvant est soumis à une agitation pendant un temps déterminé, après quoi le solvant est repris en partie ou en totalité et évaporé sous vide ou sous courant d'azote.

L'hormone marquée et l'antisérum sont alors additionnés à l'extrait; le mélange est ensuite bien homogénéisé par passage sur vortex, les tubes sont ensuite incubés au bain-marie à 37°C pendant 1/2 heure, puis maintenus pendant quelques heures, voire une nuit, au frigo à 4°C.

A leur sortie du frigo, les tubes, maintenus en eau glacée, sont additionnés chacun de 0.5 cc d'une préparation de charbon-dextran pour réaliser la séparation de l'hormone marquée et de l'hormone libre, passés sur vortex, replacés dans l'eau glacée pendant 10 minutes exactement, puis centrifugés.

Le liquide surnageant est incorporé, à raison de 0.5 cc dans une fiole de comptage renfermant 10 cc de liquide scintillant. L'utilisation de ce dernier est rendue nécessaire du fait que les radiations émises par le tritium, élément marqueur, sont trop faibles pour permettre un comptage direct. Au contact du liquide scintillant les rayonnements émis par le tritium sont transformés en impulsions électriques qui sont totalisées par le compteur (Fig. N° 7 et 8).

Actuellement la méthode radioimmunologique est de plus en plus utilisée pour le dosage des stéroïdes. C'est une technique très sensible et aisément reproductible. La principale difficulté réside dans l'obtention d'antisérum spécifique car les stéroïdes ne sont pas antigéniques par eux-mêmes.

Leur couplage avec une protéine a permis de surmonter cet obstacle et d'obtenir des immunsérums spécifiques contre les principaux stéroïdes.

L'utilisation des techniques radioimmunologiques a permis de préciser nos connaissances dans le domaine de la physiologie de la sphère génitale.

On peut espérer qu'il sera possible d'aborder, dans un proche avenir, et avec un égal profit, la pathogénie des troubles de la reproduction.

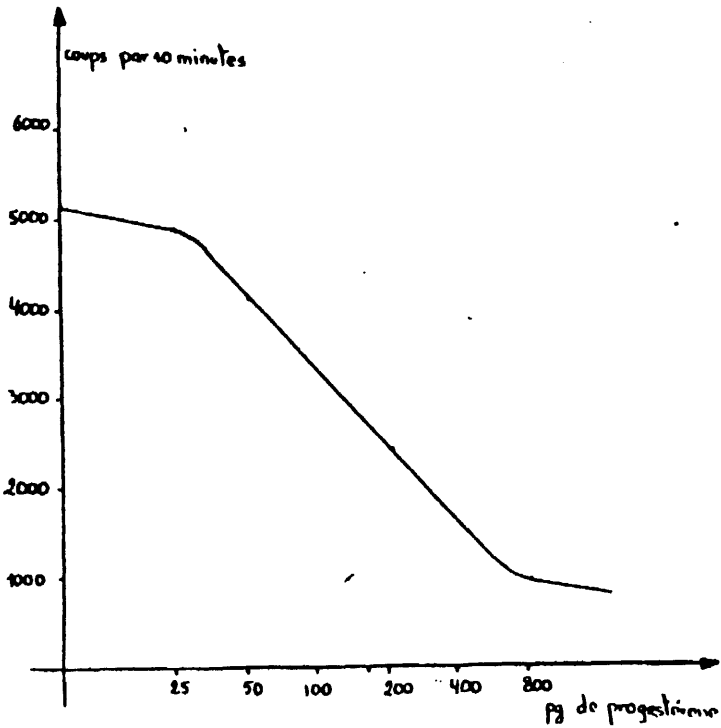


Fig. N° 7 - Courbe standard montrant la décroissance de la radioactivité en fonction de l'augmentation de la dose de progestérone étalon ajoutée dans le milieu.

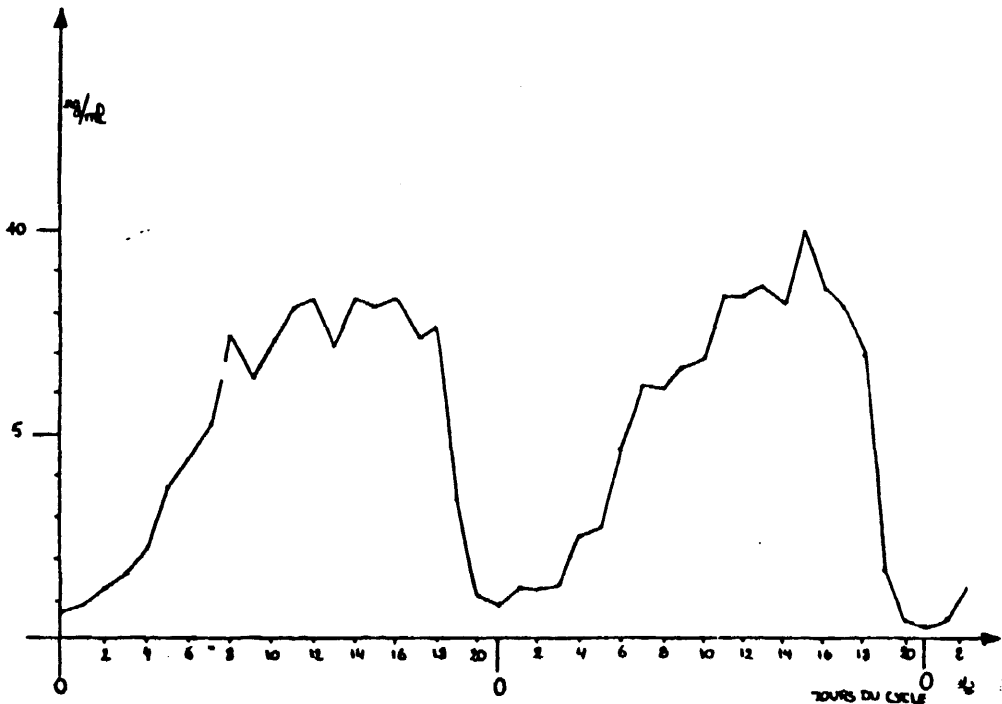


Fig. N° 8 - Evolution du taux de progestérone en fonction du cycle œstral chez la vache, prises de sang journalières.

RÉSUMÉ

Après une brève introduction sur l'origine des stéroïdes, les auteurs passent en revue les différentes méthodes de dosage de ces hormones. Ils insistent sur la méthode du « Competitive protein Binding » et sur la méthode radioimmunologique qui paraissent être les techniques d'avenir. Elles sont très sensibles et permettent le dosage de nombreux stéroïdes sur de très petites quantités de plasma.

BIBLIOGRAPHIE

- ABRAHAM, G., and GROVER, P.K. : Covalent linkage of hormonal haptens to protein carriers for use in radioimmunoassay, p. 134-152 in Principles of Competitive Protein-Binding Assays. ODELLE, W. et DAUGHADAY, W., Ed. J.B. Lippincott Company Philadelphia and Toronto, 1971.
- DERIVAUX, J. : Reproduction chez les animaux domestiques, Ed. Derouaux Liège, 1971.
- DERIVAUX, J. et ECTORS, F. : Ann. Méd. Vét., 1973, 117, 445-457.
- ERLANGER, B.F., BOREK, F., BEISER, S.M. and LIEBERMAN, S. : J. Biol. Chem., 1957, 228, 713-727.
- ERLANGER, B.F., BOREK, F., BEISER, S.M. and LIEBERMAN, S. : J. Biol. Chem., 1959, 234, 1090-1094.
- GARDINER, W.L., HORNING, E.C. : Biochim. et Biophys. Acta, 1966, 115, 524-526.
- GAUTRAY, J.P. : Reproduction humaine, Ed. Masson et Cie Paris, 1968.
- HENRICKS, D.M., DICKEY, J.F., and NISWENDER, G.D. : Steroids, 1973, 22, 413-424.
- HOFFMANN B. und KARG, H. : Ann. Endoc. 1970, 31, suppl., 823-827.
- JAYLE, M.F. : Analyse des stéroïdes hormonaux, Ed. Masson et Cie Paris, 1962.
- KUSS, E. and GOEBEL, R. : Steroids, 1972, 19, 509-518.
- KUSS, E. and GOEBEL, R. : Steroids, 1972, 19, 737-740.
- LEBEAU, M. et VAN PEBORGH, J. : J. Gyn. Obst. Biol. Reprod., 1973, 2, 63-69.
- LINQUETTE, M. : Précis d'endocrinologie, Ed. Masson et Cie Paris, 1973.
- MURPHY, B.E.P. : Nature, 1964, 15, 679-682.
- MURPHY, B.E.P. : Steroids, 1970, 16, 791-799.
- MURPHY, B.E.P. : Hormone assay using binding protein in blood, p. 108-127 in Principles of Competitive Protein-Binding Assays. ODEIL W. et DAUGHADAY W., Ed. J.B. Lippincott Company Philadelphia and Toronto, 1971.
- NISWENDER, G.D. : Steroids, 1973, 22, 413-424.

ANNALES DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

- ROMBAUTS, P., PIERDET, A., et JOUQUEY, A. : C.R. Acad. Sc. Paris, 1973, 277, 1921-1924.
- SHEMESH, M., LINDNER, H.R. and AYALON, N. : J. Reprod. Fert., 1971, 26, 167-174.
- SNOOK, R.B., SAATMAN, R.R. and HANSEL, W. : Endocrinology, 1971, 88, 678-686.
- STANBENFELDT, G.H., HOLT, J.A. and EWING, N. : Endocrinology, 1969, 85, 11-15.
- STANBENFELDT, G.H., EWING, L.L. and McDONALD, L.E. : J. Reprod. Fert., 1969, 19, 433-442.
- TAN, S.Y., and MURPHY, B.E.P. : Endocrinology, 1974, 94, 122-127.
- VÖLLMIN, J.A. : Clinica Chimica Acta, 1971, 34, 207-214.
- WETTEMANN, R.P., HAFS, H.D., EDGERTON, L.A. and SWANSON, L.V. : J. Anim. Sc., 1972, 34, 1020-1024.

Travail réalisé grâce à l'I.R.S.J.A.

Rue de Crayer, 6 - Bruxelles

Laboratoire d'Obstétrique

Professeur J. DERIVAUX

Rue des Vétérinaires, 45 - 1070 Bruxelles