

BBA 3852

MODE DE CONJUGAISON DU PREGNA 5-ENE  $3\beta$ ,21-DIOL 20-ONE  
ET DU PREGNA 5-ENE  $3\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-TRIOL 20-ONE CHEZ L'HOMME.  
IDENTIFICATION DES ESTER-SULFATES CORRESPONDANTS

J. R. PASQUALINI, F. DUTTER ET M. F. JAYLE

*Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine, Paris (France)*

(Reçu le 13 juillet, 1962)

## SUMMARY

*Mode of conjugation of pregna-5-ene,  $3\beta$ ,21-diol and pregna-5-ene,  $3\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-20-one in man. Identification of the corresponding sulfate esters*

We administered 270 mg of 21-hydroxypregnenolone and 300 mg of 17 $\alpha$ ,21-dihydroxypregnenolone to a normal man and studied the forms in which these steroids are found in the blood and in the urine.

21-Hydroxypregnenolone is exclusively found in the  $3\beta$ ,21-disulfate form, whereas 17 $\alpha$ ,21-dihydroxypregnenolone is found in the  $3\beta$ -monosulfate form, both in the blood and urine. The excretion of the  $3\beta$ ,21-disulfate of 21-hydroxypregnenolone is faster than that of the  $3\beta$ -monosulfate of 17 $\alpha$ ,21-dihydroxypregnenolone.

## INTRODUCTION

La 21-hydroxyprégénolone a été mise en évidence dans les urines humaines<sup>1</sup>. Dans un travail récent, nous avons identifié le  $3\beta$ ,21-disulfate de ce stéroïde dans les urines après administration d'ACTH et dans les urines de grossesse<sup>2</sup>.

Dans ce travail, nous avons administré à un homme normal par voie orale du 21-monoacétate de 21-hydroxyprégénolone et du 21-monoacétate de 17 $\alpha$ ,21-dihydroxyprégénolone et nous avons recherché ces deux stéroïdes dans les fractions libre, ester-sulfate et glucosiduronate du plasma et de l'urine.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Matériel biologique*

270 mg de 21-monoacétate de 21-hydroxyprégénolone ont été administrés à un homme normal par voie orale, en trois prises de 90 mg en 4 h. On recueille les urines des 24 h suivant la première prise; 200 ml de sang veineux ont été également recueillis 5 h après le début de l'administration. Le même protocole a été utilisé pour la 17 $\alpha$ ,21-dihydroxyprégénolone dont on a administré 300 mg sous forme de 21-monoacétate. Les prélèvements de sang et d'urine ont été faits comme précédemment.

*Extraits urinaires*

Les stéroïdes libres et conjugués ont été extraits trois fois de suite par un volume du mélange éther-éthanol<sup>3</sup> (3:1, v/v). Le résidu sec est repris par l'eau et les corticostéroïdes libres sont extraits par le dichlorométhane.

Les corticostéroïdes conjugués sont séparés sur colonne d'alumine<sup>4</sup> en deux fractions: la première, peu polaire, contient les monosulfates de stéroïdes et la

deuxième, plus polaire, contient les glucosiduronates et une petite quantité de sulfates polaires. Les ester-sulfates polaires sont séparés des glucosiduronates par une seconde chromatographie sur alumine<sup>2</sup>. Les ester-sulfates peu polaires sont purifiés par la méthode suivante: la fraction contenant ces conjugués est évaporée à sec, reprise dans 50 ml d'eau (A); l'eau est extraite par 3 fois 0.5 volume de butanol; le butanol est additionné de 0.25 volume de toluène et le mélange butanol-toluène (B) est extrait par 3 fois 0.5 volume d'eau (C). La solution B est évaporée à sec et le résidu est repris dans l'acétone à 5 % de méthanol. On obtient un surnageant B<sub>1</sub> et un précipité B<sub>2</sub>.

#### *Extrait plasmatique*

Le plasma provenant de 200 ml de sang veineux, recueilli 5 h après l'administration de la première dose de chaque stéroïde, a été additionné 3 fois de suite de 100 ml d'éthanol à 80 % (précipité I). Après repos à  $-10^{\circ}$  pendant 48 h et centrifugation, ce surnageant est évaporé à sec et repris par 100 ml de méthanol à 80 %, laissé 3 jours à  $-10^{\circ}$  (précipité II), centrifugé à  $-10^{\circ}$ . Le surnageant est évaporé à sec, repris par 50 ml d'eau; la solution aqueuse (III) est extraite d'abord 3 fois par 0.5 volume de chloroforme (IV) et ensuite par 3 fois 0.5 volume de butanol. L'extrait butanolique contenant les stéroïdes conjugués est additionné de 25 % de toluène. Le mélange butanol-toluène (V) est extrait par 3 fois 0.5 volume d'eau (VI).

#### *Systèmes chromatographiques utilisés*

*Pour les stéroïdes conjugués:* I, *n*-acétate de butyle-toluène-*n*-butanol-hydroxyde d'ammonium 4 N-méthanol (60:30:10:50:50, v/v) (voir réf. 5); II, *n*-butanol-toluène-*n*-acétate de butyle-acide acétique-eau (40:10:50:10:90, v/v); III, *n*-acétate de butyle-*n*-butanol-hydroxyde d'ammonium 4 N (25:75:100, v/v) (voir réf. 2); IV, alcool isoamylique-*n*-hexane-hydroxyde d'ammonium concentré ( $\sim 10$  N) (22:28:50, v/v).

*Pour les corticostéroïdes libres:* V, chloroforme-formamide<sup>6</sup>; VI, isooctane-méthanol-eau (5:3:2) (voir réf. 2); VII, isooctane-propanediol<sup>2</sup>; VIII, décane-propanediol<sup>2</sup>; IX, ligroïne-propanediol<sup>7</sup>; X, isooctane-butanol tertiaire-eau (10:5:90, v/v) (voir réf. 8); XI, oxyde d'isopropyle-formamide-eau (50:5:5, v/v); XII, hexane-benzène (1:1, v/v)-propanediol; XIII, benzène-formamide<sup>6</sup>.

*Chromatographie des acétates de stéroïdes:* Le 3,21-diacétate de 21-hydroxyprégnénolone a été chromatographié par chromatographie sur papier non imprégné de phase stationnaire en utilisant les solvants ligroïne et isooctane<sup>9</sup>.

#### *Détection des stéroïdes conjugués*

*Ester-sulfates en solution:* Les ester-sulfates ont été évalués en utilisant la formation du complexe ester-sulfate-bleu de méthylène qui est extrait par le chloroforme et dont l'absorbance est comparée à une gamme de standards de sulfate de déhydroépiandrostérone<sup>10,11</sup>.

*Sur le chromatogramme:* Après chromatographie ou électrophorèse, les ester-sulfates ont été détectés par la technique de VLITOS<sup>10</sup> adaptée au chromatogramme<sup>12</sup>.

*Glucosiduronates:* Les glucosiduronates ont été évalués par l'absorbance du complexe formé avec la naphtrésorcine en milieu sulfurique<sup>13,14</sup>.

#### *Électrophorèse*

Les ester-sulfates sont dissous dans l'éthanol et placés sur des bandes de papier

Carl Schleicher et Schüll-Dassel No. 2043. L'électrophorèse est réalisée dans un appareil de type Grassman et Hannig, en utilisant un tampon carbonate d'ammonium 0.15 M à pH 8.8, pendant 7 h, sous une tension de 130 V, 1 mA/cm à 22° (voir réfs. 15, 16).

#### Hydrolyse

Les différents conjugués urinaires (ester-sulfates peu polaires, ester-sulfates polaires et glucosiduronates, ainsi que les fractions I, II, III, V et VI de l'extrait plasmatique ont été hydrolysés par les enzymes (sulfatase et glucuronidase) du suc digestif d'*Helix pomatia*. La quantité de sulfatase utilisée est de 1500 U. ROY<sup>17</sup> et celle de glucuronidase de 1500 U. FISHMAN<sup>18</sup> par ml d'urine.

#### Solvolyse

Les fractions des ester-sulfates urinaires polaires et peu polaires ainsi que les fractions V et VI du plasma ont été soumises à une solvolyse par le dioxane additionné de 3% (p/v) d'acide trichloroacétique<sup>19</sup>.

#### Acétylation

Les stéroïdes ont été acétylés par le mélange pyridine-anhydride acétique pendant 18 h à la température de la pièce.

#### Oxydation

Les stéroïdes ont été oxydés par le bismuthate de sodium<sup>20</sup>.

#### Préparation du 3 $\beta$ -monosulfate de 17 $\alpha$ ,21-dihydroxyprégnénolone

**Saponification:** 30 mg de 21-monoacétate de 17 $\alpha$ ,21-dihydroxyprégnénolone ont été saponifiés avec 200 ml de méthanol contenant 0.4% (p/v) de KHCO<sub>3</sub> (voir réf. 21). On laisse 48 h à la température de la pièce; on ajoute 20 ml d'eau et on neutralise par de l'acide chlorhydrique 3 N; on évapore à sec; le résidu est repris par 100 ml d'eau et extrait 3 fois par un volume de dichlorométhane. On obtient 21 mg de 17 $\alpha$ ,21-dihydroxyprégnénolone.

**Formation du 3 $\beta$ -monosulfate:** Les 21 mg de 17 $\alpha$ ,21-dihydroxyprégnénolone sont dissous dans 5 ml de pyridine et traités par 45 mg du complexe SO<sub>3</sub>-pyridinium pendant 4 jours à la température de la pièce. La pyridine est évaporée et le résidu est purifié par cristallisation dans le mélange éther-méthanol (3:1, v/v). Cet ester-sulfate est chromatographié sur papier dans les systèmes I, II et IV. Nous avons indiqué dans le Tableau I ses différents R<sub>F</sub> dans chacun des systèmes utilisés.

Il donne une réaction positive au bleu de méthylène (caractéristique des ester-sulfates<sup>12</sup>) et une réaction positive au bleu de tétrazolium ce qui prouve que l'acide

TABLEAU I  
R<sub>F</sub> DE L'ESTER-SULFATE ISOLÉ ET DU 3 $\beta$ -MONOSULFATE  
DE 17 $\alpha$ ,21-DIHYDROXYPRÉGNÉNOLE ET DU 21-MONOSULFATE DE 17 $\alpha$ -HYDROXYCORTÉXONE  
DANS TROIS SYSTÈMES CHROMATOGRAPHIQUES DIFFÉRENTS

Ester-sulfate	Systèmes chromatographiques		
	I	II	IV
Ester-sulfate (extrait urinaire)	0.088	0.46	0.56
3 $\beta$ -Monosulfate de 17 $\alpha$ ,21-dihydroxyprégnénolone	0.088	0.44	0.56
21-Monosulfate de 17 $\alpha$ -hydroxycortéxone	0.10	0.32	0.45

sulfurique estérifie le  $3\beta$ -hydroxyle. Par électrophorèse dans les conditions établies l'ester-sulfate obtenu a une vitesse de migration de 1.4 cm/h, correspondant à la vitesse des monosulfates (dans ces conditions, la vitesse de migration du  $21$ -sulfate de  $17\alpha$ -hydroxycortexone est égal à 1.45 cm/h). Après solvolysé dans le milieu dioxane-trichloroacétique, l'ion sulfate est détecté par la réaction au rhodizonate<sup>22</sup>. La quantité d'ester-sulfate obtenue (5  $\mu$ g) n'était pas suffisante pour réaliser une microanalyse. Nous n'avons pas pu détecter la présence d'ester-sulfates polaires (disulfates) négatifs au bleu de tétrazolium.

#### *Stéroïdes de référence*

Dans ce travail les stéroïdes suivants ont été utilisés: prégn-4-ène  $11\beta,17\alpha,21$ -triol 3,20-dione (cortisol); prégn-4-ène  $17\alpha,21$ -diol 3,11,20-trione (cortisone); prégn-4-ène  $11\beta,21$ -diol 3,20-dione (corticostérone); prégn-4-ène  $21$ -ol 3,11,20-trione ( $11$ -déhydrocorticostérone); prégn-5-ène  $3\beta,21$ -diol 20-one ( $21$ -hydroxyprégnénolone); prégn-5-ène  $3\beta,17\alpha,21$ -triol 20-one ( $17\alpha,21$ -dihydroxyprégnénolone); androsta-5-ène  $3\beta$ -ol  $17$ -one (déhydroépiandrostérone); prégn-4-ène  $17\alpha,21$ -diol 3,20-dione ( $17\alpha$ -hydroxycortexone).

#### MÉTHODE OPÉRATOIRE

##### *Identification du 3,21-disulfate de 21-hydroxyprégnénolone dans l'extrait urinaire*

Les stéroïdes de la fraction libre ainsi que les stéroïdes libérés sulfo- et glucuro-conjugués ont été fractionnés par chromatographie sur papier. Dans les extraits urinaires obtenus après administration de  $21$ -monoacétate de  $21$ -hydroxyprégnénolone nous avons identifié le prégn-5-ène  $3\beta,21$ -diol 20-one dans la fraction ester-sulfate polaire. Ce stéroïde qui avait été libéré d'une part par hydrolyse et d'autre part par solvolysé<sup>19</sup> présentait les mêmes  $R_F$  que la  $21$ -hydroxyprégnénolone dans les systèmes VII, VIII et IX et, après acétylation, avait le même  $R_F$  que le 3,21-diacétate de  $21$ -hydroxyprégnénolone par chromatographie sur papier non imprégné de phase stationnaire et en utilisant les solvants ligroïne et isooctane<sup>9</sup>. Ce stéroïde libéré donnait une réaction positive au bleu de tétrazolium et présentait un maximum d'absorption à 405 m $\mu$  dans le mélange éthanol-acide sulfurique<sup>23</sup> qui est caractéristique des stéroïdes ayant une fonction  $\Delta^5, 3\beta$ -hydroxy. L'ester-sulfate isolé de cette fraction polaire présentait dans les systèmes chromatographiques II et III et par électrophorèse la même vitesse de migration que celle du 3,21-disulfate de  $21$ -hydroxyprégnénolone de synthèse<sup>2</sup>.

##### *Identification du $3\beta$ -monosulfate de 17 $\alpha,21$ -dihydroxyprégnénolone dans l'extrait urinaire et dans le plasma*

Le même protocole a été suivi pour les stéroïdes conjugués des extraits urinaires obtenus après administration de  $17\alpha,21$ -dihydroxyprégnénolone.

Nous avons identifié la  $17\alpha,21$ -dihydroxyprégnénolone exclusivement dans la fraction ester-sulfate peu polaire. Ce stéroïde qui avait été libéré par solvolysé ou hydrolyse présentait le même  $R_F$  que la  $17\alpha,21$ -dihydroxyprégnénolone dans les systèmes X, XI, XII et XIII et, après acétylation, il avait le même  $R_F$  que le 3,21-diacétate de  $17\alpha,21$ -dihydroxyprégnénolone dans le système IX. Ce stéroïde donne une réaction positive au bleu de tétrazolium et présente un maximum d'absorption à 405 m $\mu$  en milieu acide sulfurique-éthanol<sup>23</sup>.

Après oxydation bismuthique, ce stéroïde est transformé en un dérivé qui donne une réaction de Zimmermann positive et qui a le même  $R_F$  que la déhydroépianthrosterone dans les systèmes IX et XII. Les ester-sulfates présents dans la fraction peu polaire ( $B_1$ ) de l'extrait urinaire et les stéroïdes conjugués de la fraction VI du plasma ont été chromatographiés dans les systèmes I, II, IV et soumis à l'électrophorèse. Les migrations observées étaient identiques dans tous les cas à celle du  $3\beta$ -monosulfate de  $17\alpha,21$ -dihydroxyprégnénolone de synthèse.

## RÉSULTATS

Les taux de la  $21$ -hydroxyprégnénolone et de la  $17\alpha,21$ -dihydroxyprégnénolone dans les différentes fractions libre et conjuguées des extraits urinaires sont indiquées dans le Tableau II. Ce Tableau montre les taux de la  $21$ -hydroxyprégnénolone et de la  $17\alpha,21$ -dihydroxyprégnénolone dans les différentes fractions libre et conjuguées des extraits plasmatiques.

La quantité de  $21$ -hydroxyprégnénolone trouvée dans le plasma était trop faible pour permettre une identification. Nous considérons que ce stéroïde est sous la forme ester-sulfate du fait de sa scission par solvolysé en milieu dioxane-acide trichloroacétique<sup>19</sup>. Par contre, la quantité de  $17\alpha,21$ -dihydroxyprégnénolone était beaucoup plus importante et nous a permis d'établir qu'il s'agissait bien du  $3\beta$ -monosulfate.

TABLEAU II

CONJUGAISON DE LA  $21$ -HYDROXYPRÉGNÉNOLE ET DE LA  $17\alpha,21$ -DIHYDROXYPRÉGNÉNOLE

Fractions	$21$ -Hydroxyprégnénolone ( $\mu\text{g}/24 \text{ h urine}^*$ )	$17\alpha,21$ -Dihydroxyprégnénolone ( $\mu\text{g}/24 \text{ h urine}^{**}$ )
Libres	0	0
Ester-sulfates peu polaires	0	1200
Ester-sulfates polaires	3000	0
Glucosiduronates	0	0

\* Après administration de 270 mg de  $21$ -monoacétate de  $21$ -hydroxyprégnénolone.

\*\* Après administration de 300 mg de  $21$ -monoacétate de  $17\alpha,21$ -dihydroxyprégnénolone.

TABLEAU III

CONJUGAISON DE LA  $21$ -HYDROXYPRÉGNÉNOLE ET DE LA  $17\alpha,21$ -HYDROXYPRÉGNÉNOLE DANS LE PLASMA HUMAIN APRÈS ADMINISTRATION DE CES DEUX STÉROÏDES

Fractions	$21$ -Hydroxyprégnénolone ( $\mu\text{g}/100 \text{ ml plasma}$ )	$17\alpha,21$ -Dihydroxyprégnénolone ( $\mu\text{g}/100 \text{ ml plasma}$ )
Libres	10	5
Ester-sulfates	20	120

## DISCUSSION

Les résultats que nous venons de présenter confirment l'hypothèse que nous avons antérieurement émise au sujet de l'influence de la structure sur la sulfoconjugaison des corticostéroïdes<sup>2,24,25</sup>. Ils démontrent qu'un corticostéroïde qui possède à la fois une structure  $\Delta_5$   $3\beta$ -hydroxy et une chaîne latérale 20-céto  $21$ -hydroxy est exclusivement sulfoconjugué sur les deux hydroxyles. Nous n'avons pas trouvé de quantités appréciables d'autres stéroïdes réduisant le bleu de tétrazolium dans la fraction ester-sulfate polaire.

Nous avons déjà constaté antérieurement que la quantité de corticostérone excrétée sous forme de 21-monosulfate était plus importante relativement que celle de 21-sulfate de cortisol<sup>24,25</sup>. Cela laisse déjà supposer que l'introduction d'un 17 $\alpha$ -hydroxyle diminue ou inhibe le processus de sulfoconjugaison. Cela est confirmé par ces recherches qui établissent que l'introduction d'un hydroxyle en C<sub>17</sub> sur la molécule de la 21-hydroxyprégnénolone empêche la sulfoconjugaison de l'hydroxyle en C-21. Il est également intéressant de mentionner l'influence de la polarité des conjugués sur la vitesse d'élimination. Nous constatons ici que la concentration plasmatique du monosulfate de 17 $\alpha$ ,21-dihydroxyprégnénolone est six fois plus importante que celle du sulfate de 21-hydroxyprégnénolone. Par contre, l'excrétion du disulfate de 21-hydroxyprégnénolone est deux à trois fois plus importante que celle du monosulfate de 7 $\alpha$ ,21-dihydroxyprégnénolone, après administration orale de quantités équivalentes de ces deux stéroïdes. Comme la polarité des disulfates est voisine de celle des glucosiduronates, on peut en déduire qu'il existe une relation entre la polarité des corticostéroïdes conjugués et la clearance rénale.

### RÉSUMÉ

Après administration orale de 270 mg de 21-hydroxyprégnénolone-21-monoacétate et de 300 mg de 17 $\alpha$ ,21-dihydroxyprégnénolone-21-monoacétate à un sujet normal, nous avons étudié les modes de conjugaison de ces deux stéroïdes dans le sang et dans les urines.

La 21-hydroxyprégnénolone est éliminée exclusivement sous forme de 3,21-disulfate; au contraire, la 17 $\alpha$ ,21-dihydroxyprégnénolone est trouvée sous forme de 3 $\beta$ -monosulfate. L'excrétion du 3,21-disulfate de la 21-hydroxyprégnénolone est plus rapide que celle du 3 $\beta$ -monosulfate de 17 $\alpha$ ,21-dihydroxyprégnénolone.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> N. DOBRINER AND S. LIEBERMAN, *Ciba Colloquia Endocrinol.*, 2 (1952) 381.
- <sup>2</sup> J. R. PASQUALINI AND M. F. JAYLE, *J. Clin. Invest.*, 41 (1962) 981.
- <sup>3</sup> R. W. H. EDWARDS, A. E. KELLIE AND A. P. WADE, *Mem. Soc. Endocrinol.*, 2 (1953) 53.
- <sup>4</sup> O. CREPY, M. F. JAYLE ET F. MESLIN, *Acta Endocrinol.*, 24 (1957) 233.
- <sup>5</sup> J. R. PASQUALINI, R. ZELNIK AND M. F. JAYLE, *Experientia*, 16 (1960) 317.
- <sup>6</sup> R. B. BURTON, A. ZAFFARONI AND E. H. KEUTMANN, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 763.
- <sup>7</sup> K. SAVARD, *J. Biol. Chem.*, 202 (1953) 457.
- <sup>8</sup> W. R. EBERLEIN AND A. M. BONGIOVANNI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 59 (1955) 90.
- <sup>9</sup> J. R. PASQUALINI AND M. F. JAYLE, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 336.
- <sup>10</sup> A. J. VLITOS, *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 17 (1953) 127.
- <sup>11</sup> O. CREPY ET F. RULLEAU-MESLIN, *Rev. franç. Etudes Clin. Biol.*, 5 (1960) 283.
- <sup>12</sup> O. CREPY AND O. JUDAS, *Rev. franç. Etudes Clin. Biol.*, 5 (1960) 284.
- <sup>13</sup> C. TOLLENS, *Ber.*, 41 (1908) 1788.
- <sup>14</sup> M. F. JAYLE AND O. CREPY, *Ann. biol. clin. (Paris)*, 12 (1954) 108.
- <sup>15</sup> W. GRASSMANN AND K. HANNIG, *Z. Physiol. Chem.*, 290 (1952) 1.
- <sup>16</sup> J. R. PASQUALINI, R. ZELNIK AND M. F. JAYLE, *Bull. Soc. Chim. France*, (1962) 1171.
- <sup>17</sup> A. B. ROY, *Biochem. J.*, 62 (1956) 41.
- <sup>18</sup> W. H. FISHMAN, B. SPRINGER AND R. BRUNETTI, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 449.
- <sup>19</sup> S. C. COHEN AND I. B. ONESON, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 245.
- <sup>20</sup> J. K. NORYMBERSKI AND R. D. STUBBS, *Biochem. J.*, 64 (1956) 168.
- <sup>21</sup> A. MEYER, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 469.
- <sup>22</sup> D. P. BURMA, *Anal. Chim. Acta*, 9 (1953) 513.
- <sup>23</sup> G. W. OERTEL AND K. B. EIK-NES, *Anal. Chem.*, 98 (1959) 31.
- <sup>24</sup> J. R. PASQUALINI, *Compt. rend.*, 246 (1958) 2945.
- <sup>25</sup> J. R. PASQUALINI AND M. F. JAYLE, *Biochem. J.*, 81 (1961) 147.