

Pour un dosage électrochimique de la gonadotrophine d'origine placentaire

Autor(en): **Peguiron, Marcel**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mémoires de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**

Band (Jahr): **11 (1955-1956)**

Heft 1

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-257485>

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.

**Pour un dosage électrochimique
de la gonadotrophine d'origine placentaire**

PAR

Marcel PEGUIRON

(Séance du 27 octobre 1954)

I. INTRODUCTION

Par gonadotrophines ou gonadostimulines, on désigne des hormones agissant sur les glandes sexuelles. On emploie indifféremment l'un ou l'autre de ces termes. Le premier insiste sur la propriété de ces hormones de maintenir en bon état de nutrition le testicule ou l'ovaire ; le second souligne leur pouvoir stimulant sur la fonction de ces organes. On parle de gonadotrophines au pluriel parce qu'elles proviennent d'origines différentes. Les unes s'élaborent dans le lobe antérieur de l'hypophyse. D'autres prennent naissance dans cet ensemble d'annexes fœtales que l'on nomme placenta. D'autres enfin, d'origine tumorale, sont sécrétées par certains cancers. En purifiant les extraits hypophysaires, on a découvert l'existence d'au moins deux facteurs gonadotropes distincts. Le premier détermine la croissance et la maturation des follicules, le second les fait passer à l'état de corps jaunes. Les gonadotrophines connues peuvent donc se classer selon deux points de vue : d'après leur origine hypophysaire, placentaire ou tumorale, ou d'après leur mode d'action folliculo ou luteo-stimulant. La gonadotrophine d'origine placentaire appartient au type lutéinisant. On l'appelle aussi gonadotrophine chorionique ou choriale. Elle fait seule l'objet de ce travail.

L'indication (1) renvoie à la référence bibliographique numéro 1 de la liste bibliographique donnée à la fin du travail.

L'organisme de la femme enceinte est littéralement inondé de gonadotrophines élaborées par les annexes fœtales dès les premiers jours de la grossesse. On en trouve dans le sang, la salive, le liquide céphalorachidien, et surtout dans les urines. ASCHHEIM et ZONDEK, qui découvrirent ce fait vers 1927, fondèrent sur sa généralité leur fameux test de diagnostic précoce de la grossesse. Il consiste à injecter de l'urine à un animal impubère, dont les ovaires ne subissent pas encore de stimulation hypophysaire. Après plusieurs injections réparties sur trois jours, on autopsie l'animal. S'il présente des corps jaunes dans les ovaires, c'est l'indice que les urines, riches en gonadotrophines, proviennent d'une femme très probablement enceinte. Le test de ZONDEK intéresse la médecine à plus d'un titre (avortement, grossesse extra-utérine, « missing abortion », chorio-épithéliome, séminome, etc.) et pourtant il fait attendre sa réponse pendant plusieurs jours ; de plus, il est qualitatif, il indique si des taux importants de gonadotrophine se trouvent ou non dans les urines, mais n'en donne pas une valeur numérique. Si la médecine courante s'en contente, les recherches dans le domaine des hormones et du cancer voudraient par contre que la réponse du test se traduise en chiffres.

Le test peut devenir quantitatif si l'on injecte des doses croissantes d'urine à des animaux impubères, en définissant l'unité d'activité gonadotrope par la quantité de substance juste nécessaire à l'apparition d'un corps jaune. Cette méthode cependant rencontre de grandes difficultés. En effet, la sensibilité des individus d'une population de souris impubères varie considérablement. S'il y a dans les élevages un nombre assez grand d'animaux normalement sensibles, on en trouve qui le sont à un degré exagérément fort ou faible. On risque en ne prenant qu'une souris par quantité d'urine injectée, de tomber tantôt sur un animal ultrasensible, tantôt sur une souris qui ne l'est presque pas. Il faut donc, par dose, un nombre suffisamment grand d'animaux pour avoir dans un lot une majorité de souris normalement sensibles. Une détermination quantitative de gonadotrophine sur la souris impubère demande au moins cinq lots de quinze animaux chacun, tous de même poids, de même âge et tous femelles. Les recherches n'avancent guère avec une méthode qui ne peut s'appliquer plus d'une fois par semaine sans décimer le plus important des élevages. Des variantes du test de ZONDEK ont été proposées en grand nombre depuis 1927, soit pour accélérer le test qualitatif, soit pour simplifier les conditions du test quantitatif.

La multiplicité de ces tentatives montre qu'aucune n'a vraiment résolu le problème (2). Elles se heurtent toutes aux fluctuations de sensibilité de l'animal utilisé, qu'il s'agisse du rat, du lapin, du pigeon ou du crapaud africain. La précision de la réponse vaut ce que valent les conditions statistiques dans lesquelles s'effectue le test, conditions qui ne peuvent être bonnes si l'on n'utilise pas un nombre d'animaux suffisamment grand.

C'est pourquoi il vaut la peine de chercher un procédé de dosage des gonadotrophines fondé non plus sur leur activité biologique, mais sur l'une de leurs propriétés chimiques ou physiques. Au Centre anticancéreux romand, M. le Dr NEUKOMM, que ce problème préoccupait alors, eut l'idée de recourir au polarographe pour atteindre ce but (3). Il étudia les propriétés polarographiques de la gonadotrophine placentaire purifiée, mais plusieurs constatations firent bientôt douter de la valeur de la méthode. D'une part l'effet polarographique d'un même échantillon de gonadotrophine variait considérablement avec la composition du milieu étudié. D'autre part, des activités biologiques égales n'engendraient pas des effets polarographiques identiques d'une préparation gonadotrope à l'autre. Le problème se posait ainsi quand on me le proposa en automne 1952. Les recherches faites depuis lors au Centre anticancéreux sont résumées dans ce travail. Elles tendent à préciser dans quelles conditions physico-chimiques apparaît la vague polarographique des gonadotrophines placentaires, et quelle peut être la substance réellement responsable de l'effet observé.

II. CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES D'APPARITION DE LA VAGUE POLAROGRAPHIQUE DE LA GONADOTROPHINE D'ORIGINE PLACENTAIRE.

Le polarographe est un instrument d'analyse qui fait subir au liquide examiné une électrolyse particulière. Du mercure, tombant goutte à goutte d'un fin capillaire plongé dans ce liquide, constitue la cathode de l'appareil. En guise d'anode, on utilise le mercure qui s'amoncele, après sa chute, au point le plus déclive de la cuve. Une résistance variable, commandée par un moteur électrique, permet d'appliquer entre anode et cathode une différence progressive de potentiel, croissant jusqu'aux valeurs pour lesquelles une électrolyse devient possible. Quand elle a lieu, un courant passe, dont l'intensité

s'enregistre photographiquement sur un tambour (fig. 1 et 2). Le graphique obtenu après développement du papier sensible enroulé sur le tambour s'appelle polarogramme. Il exprime l'intensité du courant d'électrolyse en fonction du potentiel appliqué aux électrodes de l'appareil. Ce potentiel se reporte le long des abscisses du polarogramme de dixième en dixième

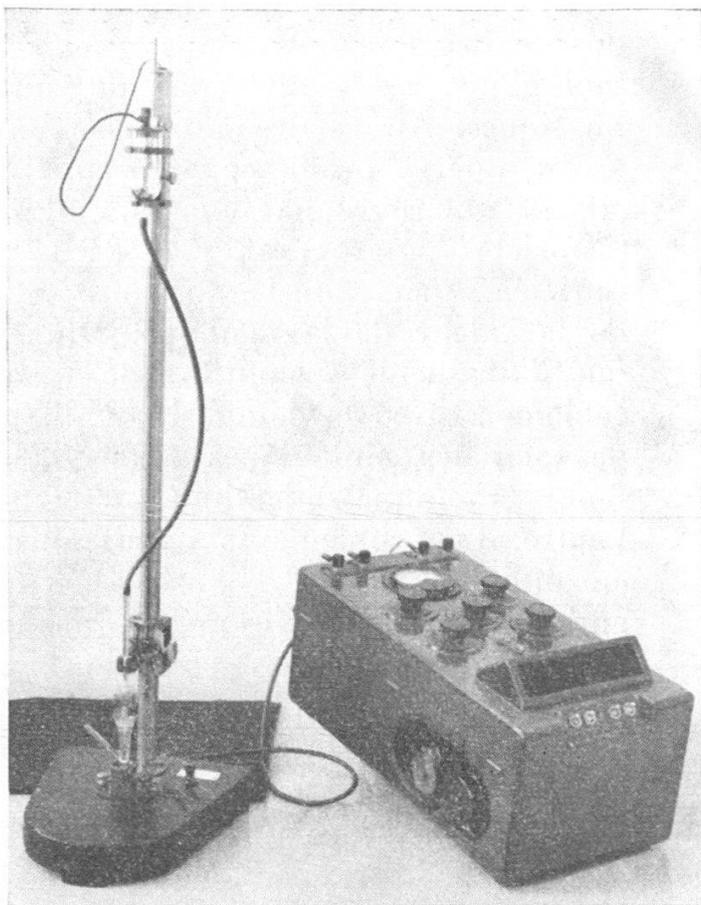
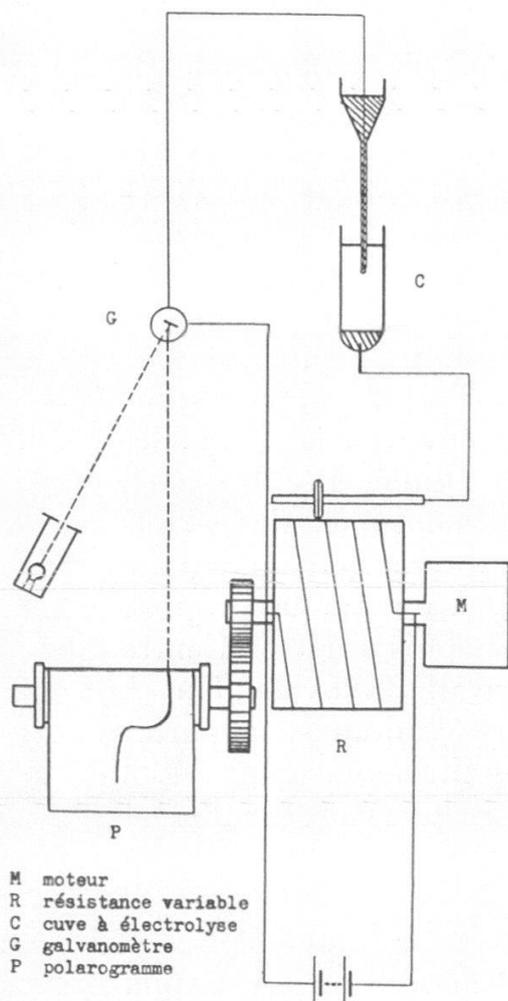


FIG. 1. — Schéma du polarographe. FIG. 2. — Le polarographe «Cambridge».

de volt. Il ne dépasse guère deux volts ordinairement. Les intensités correspondantes se lisent en ordonnée. Un millimètre sur cet axe représente une intensité comprise, selon la sensibilité choisie du galvanomètre, entre 0,001 et 1,0 microampère.

Au cours d'une électrolyse, les cations subissent une réduction à la cathode (4). Les ions hydrogène en particulier devraient se réduire pour un potentiel théorique de -1 volt. En réalité, ce phénomène survient à la cathode du polarographe vers -2 volts seulement (5). Ce retard vient de ce qu'on appelle la surtension de l'hydrogène vis-à-vis du mercure. En

ajoutant une protéine à la solution, la réduction de l'hydrogène s'effectue plus tôt, comme l'ont montré les travaux tchèques de polarographie parus dès 1930 à ce sujet (6). L'électrolyse d'une solution $10^{-3} n$ d'un sel de cadmium, par exemple, engendre un courant maximum de l'ordre du microampère. Pour obtenir une intensité du même ordre sur le polarogramme d'une protéine, une concentration mille à dix mille fois plus faible suffit encore. La démesure existant entre l'importance de l'effet produit et l'extrême dilution protéique qui le provoque encore pousse à voir dans ce phénomène l'expression d'une catalyse. Le catalyseur serait la protéine, la réaction catalysée serait la réduction de l'ion hydrogène.

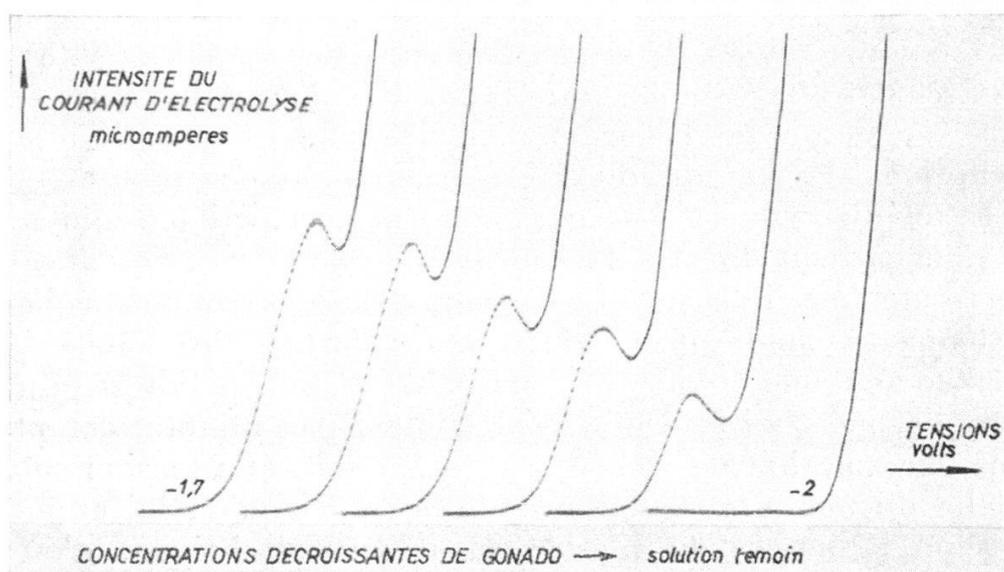


FIG. 3.

C'est pourquoi on appelle catalytiques les enregistrements obtenus par la mesure de solutions protéiques au polarographe.

La gonadotrophine placentaire est une protéine (7). Ce travail tend à démontrer qu'elle jouit des mêmes propriétés polarographiques que les protéines en général. La figure 3 en donne un exemple. Normalement, la réduction de l'hydrogène dissocié de l'eau ne survient pas avant -2 volts appliqués à la cathode. C'est ce qu'exprime l'enregistrement d'une solution témoin. En ajoutant à la solution des gonadotrophines en quantités croissantes, l'électrolyse apparaît plus tôt, et l'intensité de son courant, exprimée en fonction du potentiel, prend l'allure d'une « vague » d'autant plus haute que s'élève la teneur du liquide en gonadotrophine. Dix milligrammes d'un produit gonadotrope par litre provoquent encore une

vague importante. Dans les mêmes conditions, la réduction de n'importe quel ion n'offre plus d'effet polarographique mesurable, d'où la vraisemblance du caractère catalytique de la vague des gonadotrophines.

La relation obtenue entre la concentration de l'hormone et son effet polarographique n'est pas linéaire. Pour l'interpréter convenablement, certaines précautions expérimentales doivent être prises, que nous allons passer rapidement en revue.

Renouvellement de l'électrode à goutte de mercure.

Dans les montages électrochimiques ordinaires, les produits d'électrolyse ne tardent pas à modifier la surface des électrodes, changeant au cours du temps les propriétés de celles-ci. L'emploi d'une électrode à goutte de mercure évite cet inconvénient : la cathode ne s'altère que durant la brève existence de la goutte. L'inertie du galvanomètre amortit les interruptions de courant dues à la succession des gouttes et il ne reste plus, sur le polarogramme, qu'une petite trémulation du trait en dent de scie. La valeur moyenne de ces oscillations représente une intensité de courant d'électrolyse indépendante du temps, à condition que les gouttes de mercure tombent de la cathode à une fréquence convenable et tout à fait régulière. Nous l'avons choisie égale à 24 gouttes par minute, comptées dans une solution de KCl $n/2$ à $-1,5$ volt. (La tension superficielle du mercure change avec le potentiel qu'on lui applique et selon la nature du liquide dans lequel il baigne, d'où la nécessité d'indiquer à quel potentiel et dans quelle solution se mesure cette fréquence.)

Choix d'un électrolyte indifférent.

Pour être bon conducteur, le liquide examiné doit contenir un électrolyte, choisi de préférence parmi les chlorures. En effet un dépôt de chlore transforme l'anode du polarographe en électrode au calomel, impolarisable et de potentiel constant (8). Le cation de l'électrolyte se réduit de son côté nécessairement au cours de la mesure. Il importe que cette réduction ne survienne pas avant l'épanouissement complet de la vague des gonadotrophines, située entre $-1,7$ et -2 volts.

Parmi les sels qui ne précipitent pas les protéines, seuls les cations alcalins se réduisent aussi tard. L'ion potassium en particulier s'est révélé favorable aux mesures. C'est pourquoi nous avons adopté le chlorure de potassium comme électrolyte indifférent.

Quand on augmente la concentration de ce sel, la vague de la gonadotrophine placentaire s'accroît considérablement (fig. 4).

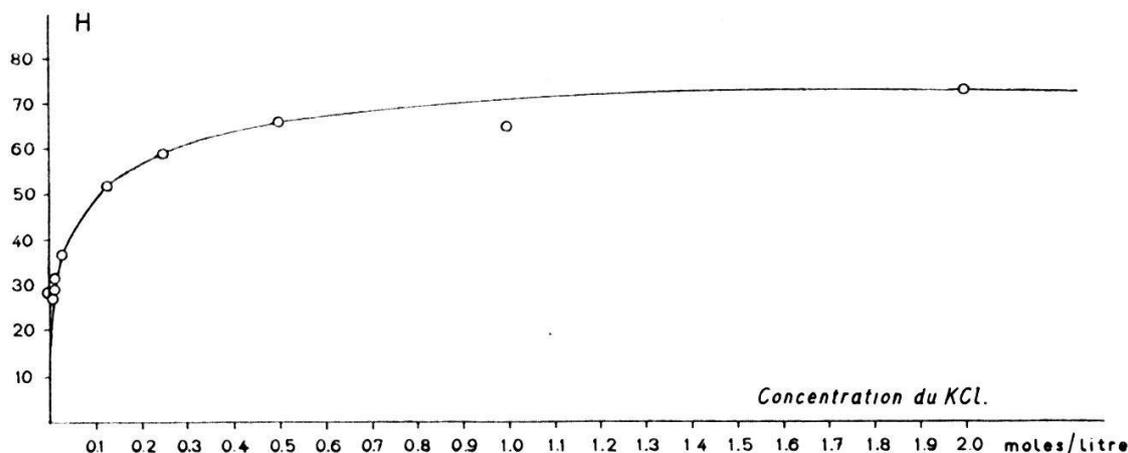


FIG. 4. — Hauteur de la vague polarographique de 6,7 UI/2 cc de Prolan en fonction de la concentration du KCl. (Sensibilité S 1/100).

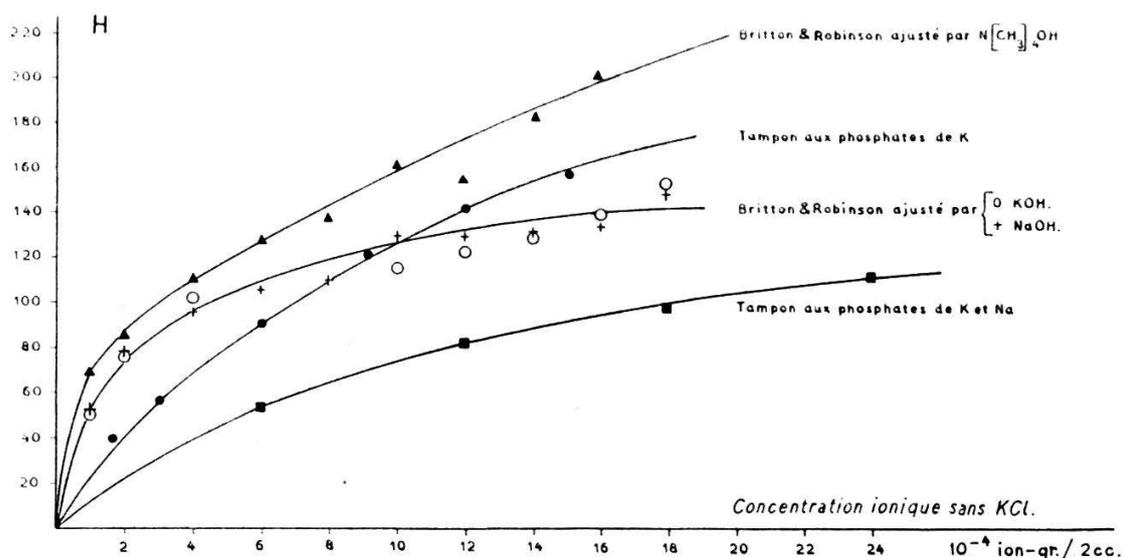


FIG. 5. — Influence de la nature et de la concentration du tampon sur la vague catalytique de 6,7 UI/2 cc de Prolan. pH constant, KCl 0,5 n.

Les travaux publiés dans ce domaine signalent ce fait, sans l'expliquer. BRDICKA et ses collaborateurs ont aussi constaté l'effet exaltant des solutions concentrées d'électrolyte sur la vague catalytique des protéines du sang (9). Il offre ceci de particulier qu'au delà d'une certaine concentration d'électrolyte la hauteur de la vague ne croît plus guère. La gonadotrophine placentaire possède donc bien les mêmes propriétés polarographiques que les protéines en général.

Choix du pH et d'un système tampon.

Dans la polarographie des protéines, la valeur du pH joue un grand rôle. Pour la fixer, on ajoute un mélange tamponnant le liquide analysé. Pour un même pH, la hauteur de la vague d'une même quantité de gonadotrophine varie encore avec la nature des constituants du tampon (fig. 5).

Ce fait connu à propos des protéines du blanc d'œuf, demeure inexpliqué (10). Le tampon qui accroît le plus le polarogramme de la gonadotrophine est un mélange d'acides acétique, phosphorique et borique, neutralisé par de l'hydroxyde de tétraméthylammonium. On obtient ainsi une variante du tampon de BRITTON et ROBINSON (11). A capacité égale, les phosphates primaire et secondaire de potassium, respectivement de sodium, constituent le système qui amplifie le moins l'effet polarographique de la gonadotrophine. Nous l'avons choisi pour nos mesures, il permet l'étude de concentrations relativement fortes d'hormone sans que la vague dépasse le cadre des papiers enregistreurs.

Du pH 1 au pH 7, la vague polarographique de la gonadotrophine n'existe pas. Puis elle devient visible sous forme d'abord d'un simple ralentissement ascensionnel (fig. 6). HERLES et VANCURA, puis HEYROVSKY et BABICKA observèrent le même fait à propos des protéines de la bière, des farines cuites, etc., en présence d'eau physiologique et de tampon ammonium (6). Ignorant tout encore des vagues catalytiques, ces chercheurs parlèrent de « prenatrium wave », c'est-à-dire de vague survenant avant celle de l'ion sodium. Le polarogramme de la gonadotrophine entre le pH 7 et le pH 8 apparaît sous forme de « prenatrium wave » (fig. 6). Quand le pH dépasse 8, la vague offre un maximum arrondi, suivi d'un minimum plus aigu (fig. 3).

Ce polarogramme s'apparente aux enregistrements de cystéine obtenus par BRDICKA en présence d'ions cobalt (12). Les protéines étudiées plus tard par cet auteur, au pH 9,5, dans divers tampons, donnent un effet polarographique analogue, connu sous le nom de vague simple (simple wave) (fig. 7). Enfin les protéines étudiées par l'école tchèque engendrent un effet catalytique à double maximum, dans un tampon ammonium enrichi d'ions cobalt (double wave de BRDICKA, 13). C'est le cas également des gonadotrophines d'origine placentaire placées dans les mêmes conditions (fig. 8). Leurs propriétés polarographiques s'identifient une fois de plus avec celles des protéines en général.

Ayant choisi le système tampon et le pH, il faut encore déterminer la concentration des constituants du tampon. Ce facteur, au pH 8 par exemple, peut modifier la hauteur et

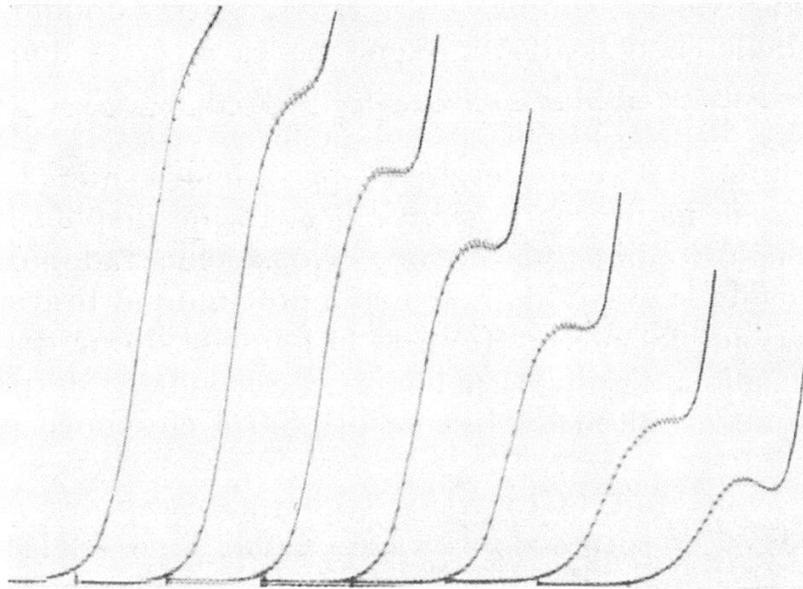


FIG. 6. — 134 UI/2 cc de gonadotrophine Organon ; KCl 0,5 n ; tampon BRITTON-ROBINSON m/5. La hauteur de la vague décroît quand le pH passe de 7,2 à 10. (De gauche à droite : pH 7,2 7,7 8,2 8,6 9,0 9,5 10,0).

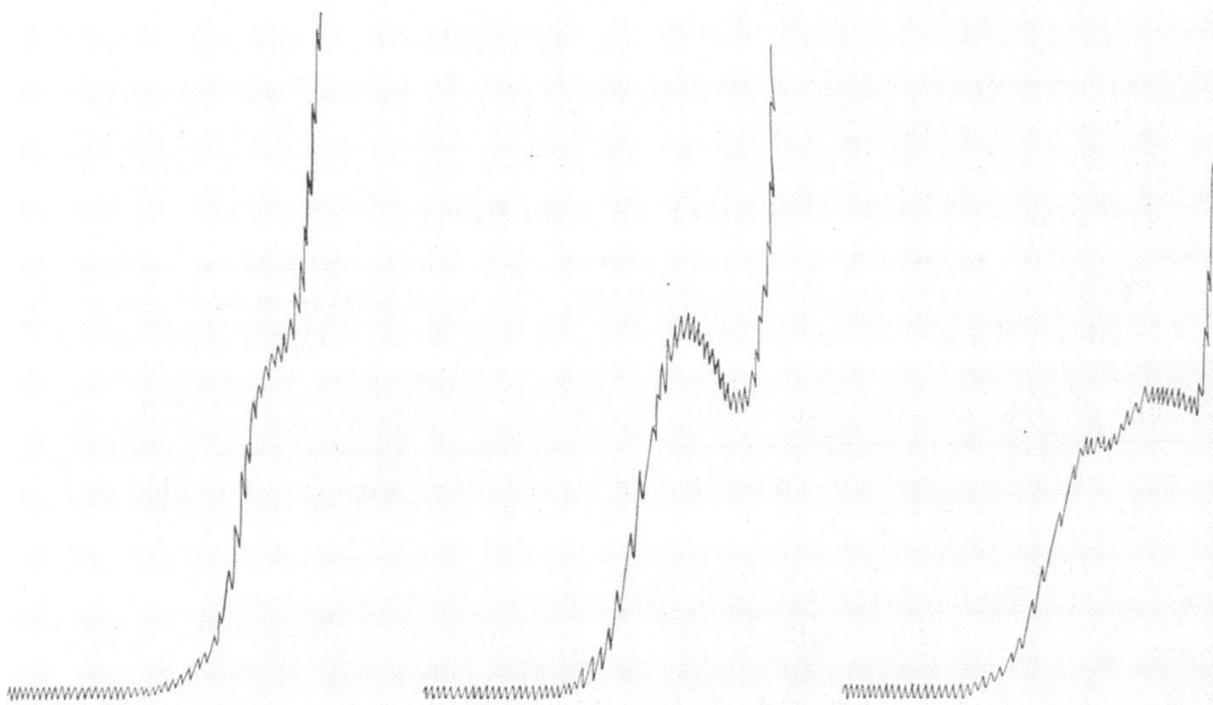


FIG. 7. — Les différents types de vague catalytique. A gauche : « Pre-natrium wave » ; au milieu : « Simple wave » ; à droite : « Double wave ».

la forme de la vague catalytique des protéines. Dans un tampon fortement concentré, la vague des gonadotrophines est du type « prenatrium wave » (fig. 10). Quand la concentration baisse, le polarogramme offre l'allure d'une vague double, puis d'une vague simple (fig. 9). L'aspect double, simple ou seulement ébauché de la vague ne caractérise donc pas le genre de protéine étudié, mais uniquement la composition du milieu dans lequel on entreprend sa mesure.

Il résulte des considérations précédentes que l'on peut choisir, par la nature de la solution, la forme du polarogramme de la gonadotrophine placentaire. Nous avons adopté le type simple (« simple wave »). Son maximum unique prévient toute ambiguïté dans la mensuration de la hauteur. Pour ces raisons, le tampon aux phosphates primaire et secondaire de potassium et de sodium m/30 en PO_4 et de pH 8,0 a été choisi pour nos mesures.

Nous avons fait le tour des facteurs susceptibles d'altérer la hauteur et la forme de la vague catalytique de la gonadotrophine d'origine placentaire. Ils sont nombreux, mais en fixant la valeur de chacun d'eux le polarogramme ne dépend plus que de la teneur du liquide en gonadotrophine.

Conditions expérimentales de mesure.

Nos mesures se font à volume constant dans une cuve à polarographe contenant 2,0 cc. L'installation, alimentée par un accumulateur de 6 volts, provient de la manufacture anglaise de polarographes « Cambridge » (fig. 2). Pour étudier la loi reliant la concentration gonadotrope à l'effet polarographique, on pipette dans une série de tubes :

1,0 cc de KCl normal confectionné à partir de KCl pour analyse Riedel de Haen et d'eau bidistillée; 0,33 cc de tampon aux phosphates primaire et secondaire de potassium et de sodium pour analyse de Riedel de Haen, m/5 en PO_4 et de pH égal à 8,5, soit jusqu'ici 1,33 cc de liquide (fig. 11). La différence de 1,33 à 2,00 cc est complétée par pipetage dans chaque tube d'une quantité choisie de solution-mère de gonadotrophine et d'une quantité complémentaire d'eau bidistillée. Par exemple :

1,00 cc KCl n,

0,33 cc tampon PO_4 m/5 pH 8,5,

0,50 cc d'une solution-mère de gonadotrophine titrant 20 unités internationales par centimètre cube,

0,17 cc d'eau bidistillée. On obtient ainsi deux centimètres cubes d'un liquide contenant dix unités internationales de gonadotrophine. Pour ne pas allonger, on a convenu d'exprimer les concentrations gonadotropes en UI/2 cc (unités internationales de gonatrophine placentaire par 2 cc).

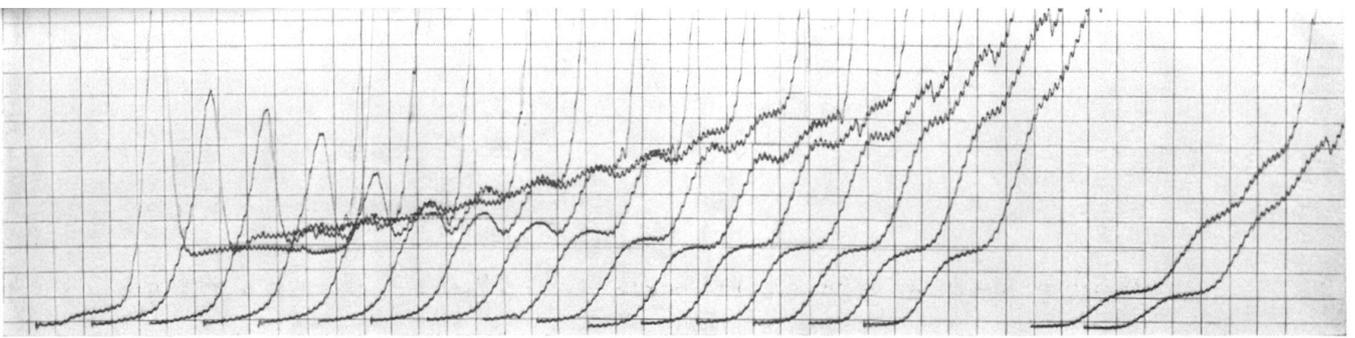


FIG. 8. — Comportement de la gonadotrophine CIBA 400 UI/mgr dans le milieu de BRDICKA. La première pointe à gauche provient du phénomène dit : «maximum» de l'ion cobalt. Ce maximum disparaît quand augmente la concentration de gonadotrophine et fait place au courant de diffusion de l'ion cobalt. Ce courant forme à droite la première marche d'escalier du polarogramme. Les deux marches suivantes sont dues à la double vague de la gonadotrophine. S 1/150.

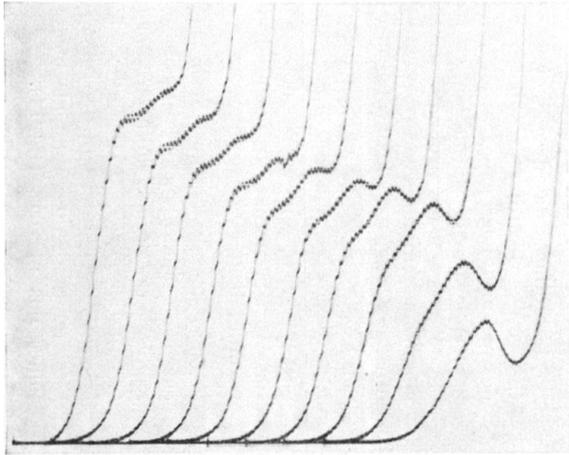


FIG. 9. — Influence de la concentration sur la hauteur et la forme de la vague de 6,7 UI/2cc de Protan. Tampon PO_4 0,4 n à gauche, 0,025 n à droite. S 1/300. pH 8,1. KCl 0,5 n.

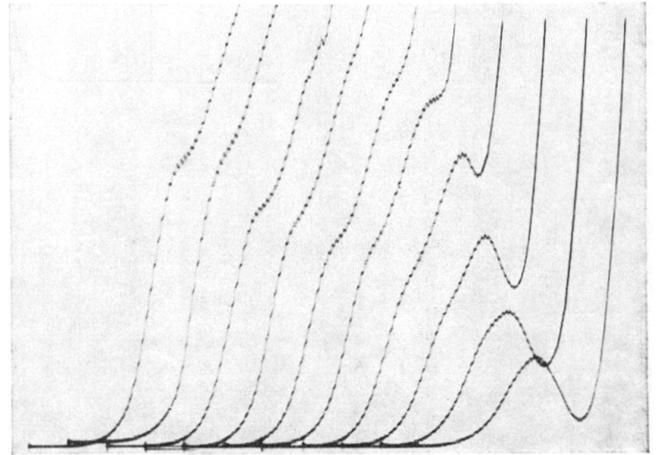


FIG. 10. — Influence de la concentration du tampon sur la vague de 6,7 UI/2cc de Protan. (Tampon 0,5 n à gauche, 0,01 n à droite. pH 8,0; KCl 0,5 n; S 1/300).

Le tampon, à l'origine 1/5 molaire, se trouve dilué finalement six fois. Sa concentration devient donc m/30. Cette dilution déplace son pH initial de 8,5 à 8,0, contrôlé à l'électrode de verre. Le chlorure de potassium, dilué de moitié par le pipetage, devient 0,5 n. On polarographie le liquide ainsi composé à partir de $-1,5$ volts, à sensibilité de 1/100 (soit 3.10^{-7} ampère/mm) avec une fréquence de renouvellement des gouttes cathodiques égale à 24 par minute, comptées dans KCl 0,5 n à $-1,5$ volts. Dans ces conditions les mesures sont reproductibles avec une précision de l'ordre de 10 % (fig. 12 et 13).

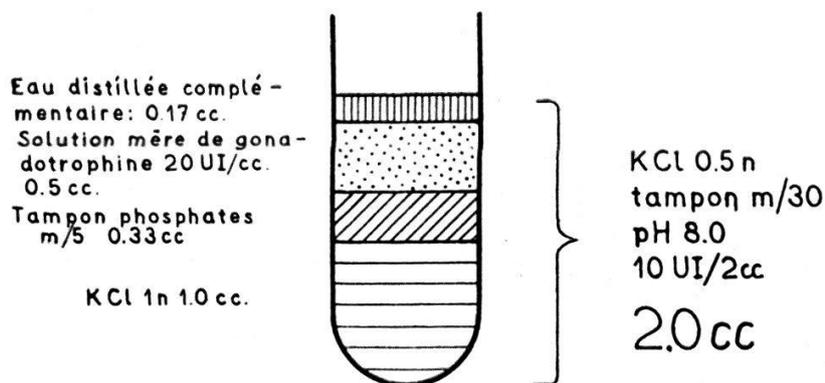


FIG. 11.

Il convient cependant d'observer les précautions suivantes :

1. N'utiliser que des solutions extemporanées de gonadotrophines. Ces corps s'hydrolysent spontanément en solution aqueuse au bout de quelques jours déjà, même à la glacière. Des acides aminés libres apparaissent en solution, en particulier de la cystéine dont l'effet polarographique propre se surajoute à celui de la gonadotrophine elle-même. On observe en effet qu'une même solution gonadotrope offre une vague d'autant plus élevée que les jours s'écoulent.

2. Transvaser le moins possible les solutions déjà préparées de gonadotrophine. Les concentrations mesurées, comprises entre 10^{-6} et 10^{-4} gr/cc, sont assez faibles pour que la perte des micelles adsorbées aux parois du flacon devienne sensible si les transvasages se multiplient.

3. Pour cette même raison, la mesure doit avoir lieu dans des cuves de même forme, offrant une surface constante au liquide analysé. Ce dernier doit en outre se mesurer à volume constant (2 cc). L'influence de la forme du récipient est bien connue en polarographie dès que l'on détermine de faibles quantités de substance. C'est pourquoi nous donnons le modèle de cuve qui fut utilisé pour toutes nos mesures (fig. 14).

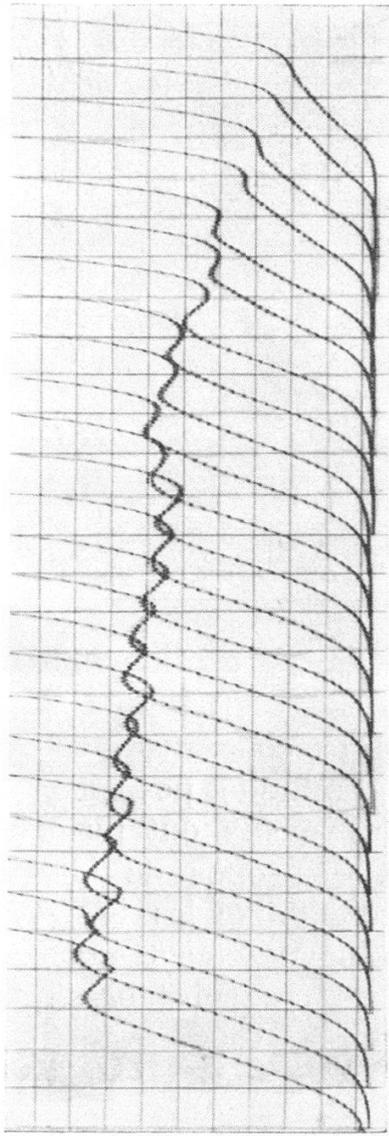


Fig. 12. — Reproductibilité de la vague catalytique de la gonadotrophine CIBA. Douze concentrations ont été préparées à partir de pesées différentes et enregistrées côte à côte. S 1/300, KCl 0,5 n, tampon PO_4 m/30, pH 7,5.

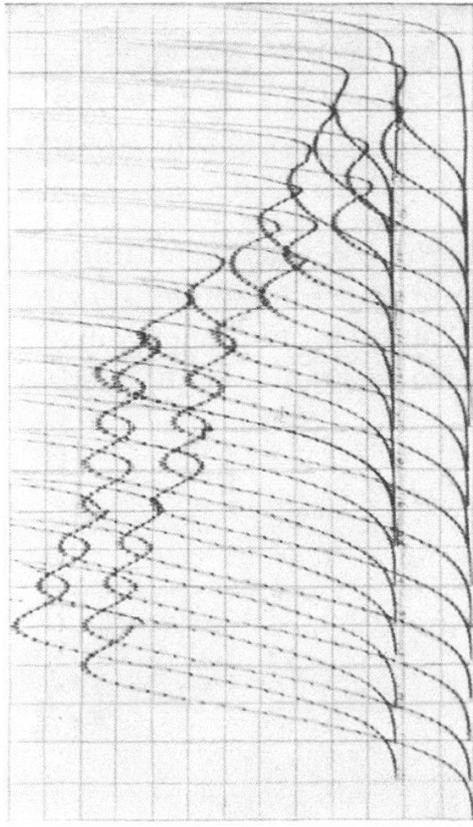


Fig. 13. — Comme pour la fig. 12, mais pH 8,0 et S 1/200.

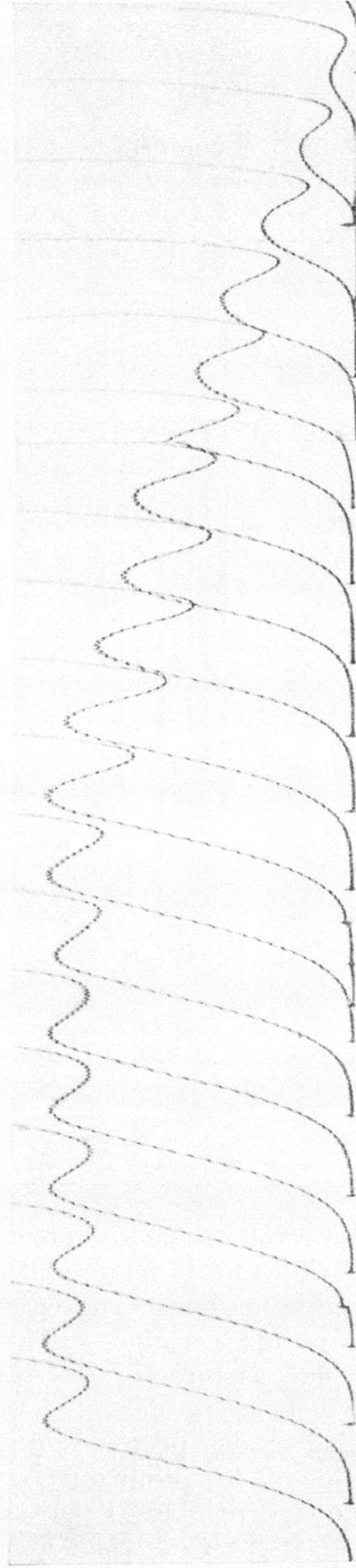


Fig. 15. — Hauteur de la vague catalytique en fonction de la concentration du Prolan. pH 8,0, KCl 0,5 n, S 1/200, tampon PO_4 m/30. De gauche à droite, concentrations de : 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 16 12 10 8 6 4 2 1 0,5. UI/2 cc.

Relation entre effet polarographique et concentration gonadotrope.

Dans les conditions définies plus haut, nous avons étudié la relation existant entre la concentration de l'hormone que l'on cherche à doser et l'effet polarographique qu'elle engendre. Elle n'est pas linéaire : à des accroissements égaux de

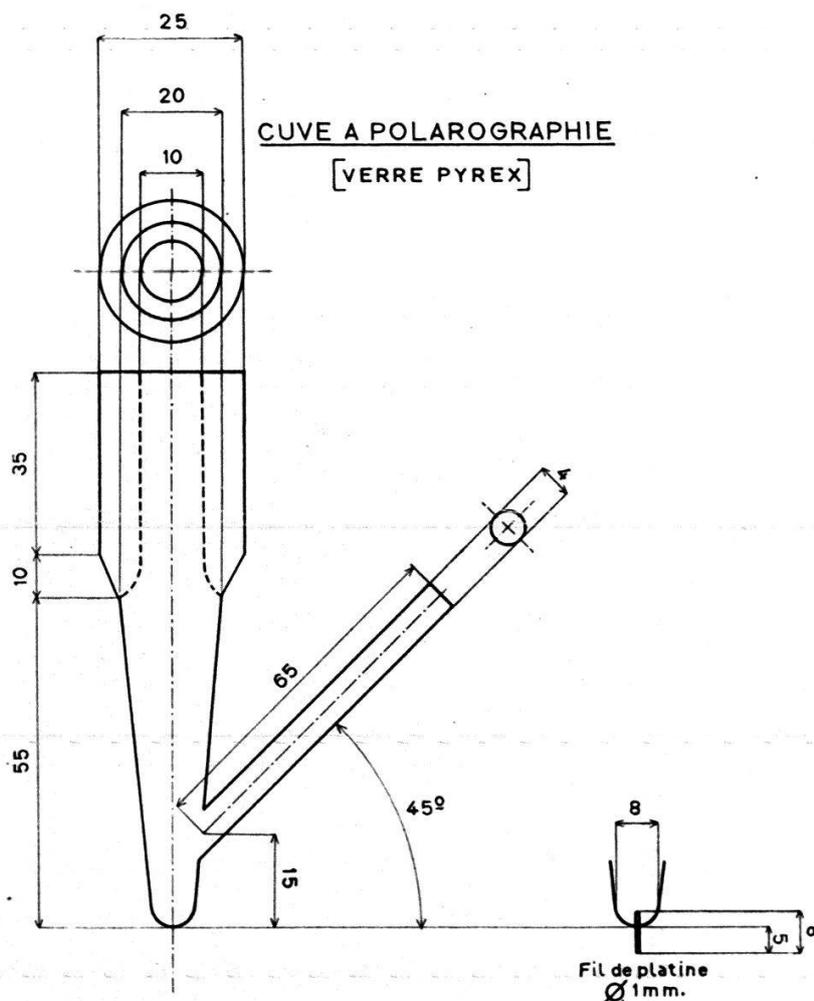


FIG. 14.

concentration correspondent des accroissements de plus en plus faibles de la hauteur des vagues catalytiques. L'effet polarographique tend à devenir constant quand la concentration dépasse une certaine valeur (fig. 15). Le graphique possède donc une asymptote. Les collaborateurs d'HEYROVSKY ont publié, dès 1933, des observations analogues, à propos de la cystéine et des protéines du sang. Ils montrèrent que les isothermes d'adsorption de LANGMUIR s'adaptent parfaitement aux relations exprimant l'effet polarographique de ces substances

en fonction de leur concentration (14). Nous avons tenté d'ajuster une isotherme de LANGMUIR aux graphiques obtenus avec la gonadotrophine placentaire. La coïncidence est satisfaisante pour de faibles concentrations, mais nos vagues se rapprochent moins rapidement de la valeur asymptotique que celles des Tchèques. La mise en équation par l'expression de LANGMUIR n'étant pas suffisamment exacte, nous avons essayé de soustraire d'une constante A, égale à l'ordonnée de l'asymptote horizontale et déterminée expérimentalement, un terme Λ/e^{zc} diminuant exponentiellement quand la concentration augmente. Pour les fortes concentrations, ce terme devient si petit qu'il ne reste plus que la valeur constante A, ordonnée de l'asymptote. Sous sa forme la plus concise, cette expression devient :

$$y = \Lambda (1 - e^{-zc})$$

C, la concentration, est à l'exposant ; α est une constante à déterminer, conditionnant la courbure plus ou moins prononcée du graphique ; A, autre constante, se trouve déterminée graphiquement ; y est mesuré au polarographe ; on l'exprime en millimètres à sensibilité 1/100 du galvanomètre. Chaque millimètre vaut alors $3 \cdot 10^{-7}$ ampères ; cette équivalence étant donnée, on garde pour les calculs des valeurs de y exprimées en millimètres, pour abrégé. C, la concentration, est connue et se lit en UI/2 cc. En traçant sur le graphique une asymptote horizontale on détermine la constante A, mesurée en mm à sensibilité 1/100. A partir des valeurs connues de y, C et A, on peut trouver les valeurs d' α (fig. 16). Le calcul montre que ces valeurs se dispersent entre certaines limites, mais qu'elles n'augmentent ni ne diminuent systématiquement en fonction de la concentration. C'est la preuve que nos graphiques obéissent bien à l'expression mathématique qu'on en propose.

FIG. 16. — Exemple de mise en équation de la relation expérimentale trouvée entre la concentration de la gonadotrophine et la hauteur de sa vague polarographique. Produit étudié : HGC CIBA 400 UI/mgr.

L'avant-dernière colonne à droite donne les valeurs numériques de la constante cherchée α obtenues à partir des concentrations C et des hauteurs de vague H relevées sur le polarogramme. C est donné en UI/2 cc, H en millimètres à sensibilité 1/100 du galvanomètre. On remarque dans l'avant-dernière colonne à droite que les valeurs d' α , sauf les trois premières et quelques autres chiffres aberrants, sont faiblement dispersées autour de la valeur moyenne $0,0135 \cdot 2,303 = 0,0315$. A partir de cette moyenne,

S des valeurs expérimentales de C et de l'ordonnée A de l'asymptote horizontale, on a recalculé la hauteur théorique y des vagues. Ces hauteurs sont reportées dans la dernière colonne à droite et, comparées aux hauteurs expérimentales H, montrent le bon accord existant entre l'expérience et l'expression mathématique par laquelle on se propose de la traduire.

La précision avec laquelle on connaît α s'obtient en faisant la somme du carré des écarts entre les diverses valeurs d' α et la valeur d' α moyen. On divise cette somme par le nombre de valeurs moins un, et on prend la racine carrée du résultat. L'écart-type obtenu de cette façon vaut dans le cas ci-dessus 0,0026, soit environ 8 % de la valeur d' α moyen. On a calculé de la même manière la constante α et son écart-type pour les autres produits étudiés.

C	H	A - H	$\frac{A}{A-H}$	$\log \frac{A}{A-H}$	$\frac{2,303}{C} \log \frac{A}{A-H}$	y
0,5	3	84	1,035	0,015	0,0300 . 2,303	1,5
1	4,5	82,5	055	0,024	0,0240 . »	2,7
2	8	79	102	0,043	0,0215 . »	5,3
4	10	77	130	0,053	0,0132 . »	10,3
5	15	72	210	0,082	0,0164 . »	12,6
7	20	67	300	0,124	0,0263 . »	17,4
8	21	66	318	0,120	0,0150 . »	19,5
10	24	63	380	0,140	0,0140 . »	23,0
13	30	57	530	0,184	0,0142 . »	29,6
15	34,5	52,5	660	0,219	0,0146 . »	32,6
20	42	45	930	0,287	0,0143 . »	40,7
25	45	42	2,070	0,316	0,0127 . »	47,4
30	53	34	2,56	0,408	0,0136 . »	53,4
35	54	33	2,64	0,422	0,0121 . »	58,1
40	62	25	3,48	0,542	0,0136 . »	62,3
45	63	24	3,63	0,560	0,0124 . »	65,9
50	68	19	4,58	0,661	0,0132 . »	69,1
55	67,5	18,5	4,46	0,650	0,0118 . »	71,3
60	74	13	6,70	0,825	0,0138 . »	73,8
65	73,5	13,5	6,45	0,809	0,0125 . »	75,8
70	80	7	12,43	1,095	0,0156 . »	77,4
80	82	5	17,4	1,241	0,0155 . »	80
90	86	1	87	1,94	0,0216 . »	82
100	85	2	43,5	1,638	0,0164 . »	83,3
110	86	1	87	1,94	0,0176 . »	84,3
134	86	1	87	1,94	0,0145 . »	85,7

Adsorption des micelles de gonadotrophine à la surface de la goutte de mercure.

L'existence d'une asymptote peut venir de ce que la goutte de mercure tombant de la cathode du polarographe offre un nombre de places limité aux molécules de gonadotrophine ou aux micelles qui en tiennent lieu. Quand la concentration augmente, toutes les places deviennent occupées et les micelles supplémentaires ne peuvent plus exercer d'effet catalytique,

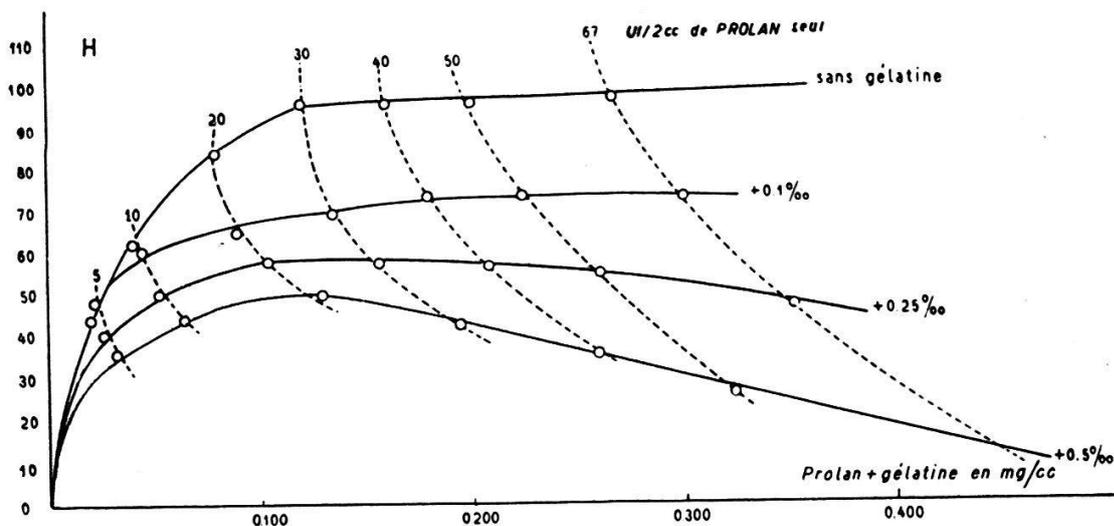


FIG. 17. — Action de la gélatine sur la hauteur de la vague de diverses quantités de Prolan. pH 8,1, KCl 0,5 n, S 1/100, tampon PO_4 m/30.

d'où l'apparition d'une valeur asymptotique. Nous avons tenté de donner une démonstration expérimentale de cette interprétation, due aux Tchèques HERASYMENKO, SLENDYK et BRDICKA (15). Dans ce but nous avons eu recours à la gélatine. D'une part, c'est l'une des seules protéines connues qui ne possède pas d'effet polarographique. D'autre part, elle offre des propriétés de tension superficielle qui font qu'elle s'adsorbe aux surfaces qu'elle rencontre. On prévoit que l'adjonction de gélatine au liquide à tester diminuera la surface efficace de la cathode. Le nombre de places libres s'abaissant, la valeur asymptotique sera plus vite atteinte. L'expérience, faite avec plusieurs concentrations de gélatine, confirme entièrement cette manière de voir (fig. 17).

III. ESSAIS DE DÉTERMINATION QUANTITATIVE DE LA GONADOTROPHINE D'ORIGINE PLACENTAIRE.

L'isolement de la gonadotrophine sous forme pure en partant d'urine de femme enceinte n'est pas une mince affaire. Personne n'y est parvenu jusqu'ici. C'est pourquoi cette hormone se mesure encore en unités biologiques, comme la digitale au siècle passé. Un standard gonadotrope international fut préparé par l'O. M. S. en 1939 à partir de produits purifiés par différents laboratoires. La poudre obtenue après mélange et dilution dans du lactose sert de référence. Un dixième de milligramme de cet étalon, conservé sous ampoule en tablettes de dix milligrammes, représente par convention une unité biologique internationale d'activité gonadotrope.

Les produits que nous pouvons doser ne sont donc pas purs. Ils contiennent de la gonadotrophine, et autre chose. Dans ces conditions, on peut se demander si la portion gonadotrope proprement dite des préparations disponibles engendre seule un effet polarographique, ou si les impuretés qui s'y trouvent contribuent à l'existence de la vague catalytique observée. Dans le premier cas, un dosage polarographique devient possible même si le produit extrait des urines n'est pas rigoureusement pur. Dans le second, le dosage demeure impossible sans un procédé de purification préalable, qu'il reste à mettre au point. Une troisième éventualité se présente enfin : la vague enregistrée pourrait provenir des impuretés seulement, ce qui rendrait illusoire toute tentative de dosage de la gonadotrophine par le polarographe.

Le présent travail se propose de trancher la question. Dans ce but, nous nous sommes adressés aux laboratoires de recherche des établissements Ciba à Bâle et Organon en Hollande¹. Ils nous ont obligeamment fourni des gonadotrophines placentaires diversement purifiées, exemptes d'adjonctions pharmaceutiques, et biologiquement titrées par comparaison avec le standard international. Ces préparations sont :

1. L'hormone gonadotrope chorale CIBA, titre: 125 UI/mgr, opération 386 C. Elle est fréquemment désignée dans le texte qui va suivre par le terme de «Prolan» pour éviter qu'on la confonde avec l'autre préparation CIBA.

¹ Nous tenons à remercier ici les Maisons Ciba et Organon pour les produits qu'elles ont bien voulu mettre à notre disposition.

2. L'hormone gonadotrope chorale CIBA, titre: 400 UI/mgr, opération 542. Abrégée dans ce travail en : HGC CIBA.

3. La gonadotrophine chorale ORGANON, titre : 4750 UI/mgr, désignée par HGC ORGANON dans les pages qui suivent.

On a réalisé, à partir de chacun des produits ci-dessus, une série de concentrations comprises entre 1 et 500 unités internationales par centimètre cube. Les vagues catalytiques enregistrées et reportées en fonction de la concentration de ces produits donnent les courbes expérimentales de la figure 18.

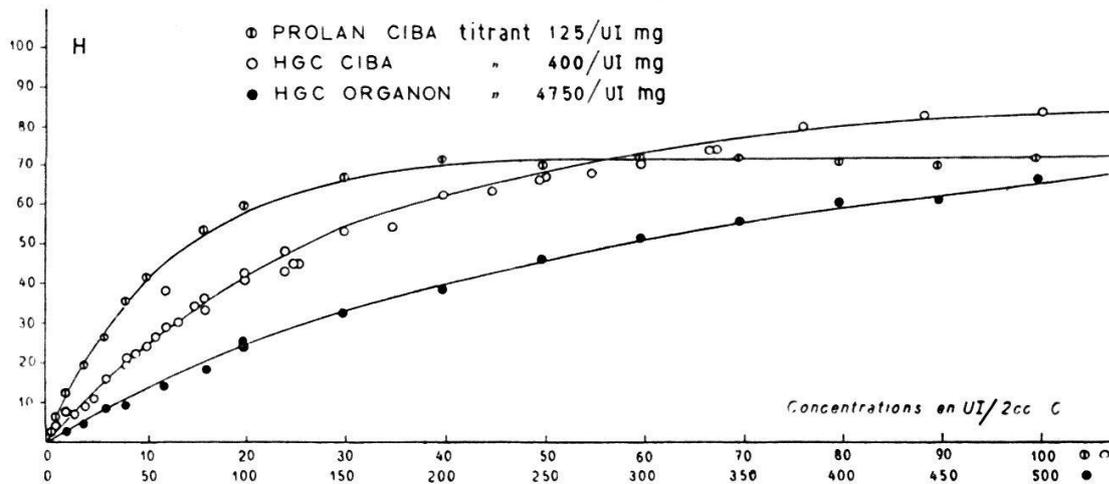


FIG. 18. — Courbes expérimentales reliant la hauteur de la vague des gonadotrophines purifiées à leur concentration. Conditions standard de mesure.

Une première constatation s'impose : un même nombre d'unités n'engendre pas un effet polarographique égal. Afin d'éclairer mathématiquement le problème, on a mis en équation la courbe dose-effet de chacune des préparations étudiées (fig. 16). Les trois expressions obtenues sont de la même forme. Cependant la valeur numérique des constantes A et α dépend de chaque cas particulier :

$$\text{Equation du Prolan : } y = 83 (1 - e^{-0,087C})$$

$$\text{Equation HGC CIBA : } y = 87 (1 - e^{-0,0315C})$$

$$\text{HGC ORGANON : } y = 86 (1 - e^{-0,00295C})$$

Soit l'expression générale : $y = A (1 - e^{-\alpha C})$

Une même concentration biologique n'engendre pas un effet polarographique constant. La discordance est particulièrement nette entre l'HGC ORGANON et le Prolan : 30 UI/2 cc de Prolan possèdent un effet dix fois plus considérable qu'une

même concentration de produit ORGANON. C'est d'autant plus curieux que l'HGC ORGANON est environ quarante fois plus riche en hormone gonadotrope que le Prolan. (Un milligramme de Prolan contient 125 UI seulement, un milligramme d'HGC ORGANON en contient 4750).

PREMIÈRE HYPOTHÈSE

L'hormone gonadotrope elle-même n'est pas polarographiquement active, puisque le produit qui en contient le plus par unité de poids engendre, à concentration égale, la vague la plus petite. L'une des impuretés du produit doit par contre posséder un effet catalytique. Si rien n'exige par la suite le contraire, on peut admettre en première approximation qu'il n'y a dans nos préparations déjà purifiées qu'une seule impureté, douée de propriétés polarographiques. Notre hypothèse se présente alors ainsi :

$$\text{gonadotrophine étudiée} = H + P$$

où H est la partie gonadotrope pure, responsable du titre biologique de la préparation, mais dénuée d'effet catalytique ; où P est une impureté, à coup sûr dénuée d'effet biologique, mais engendrant à elle seule la vague polarographique du produit étudié.

Dans l'HGC ORGANON, le constituant P serait dix fois moins abondant que dans le Prolan ; par contre, le constituant H serait près de quarante fois plus abondant dans l'HGC ORGANON que dans le Prolan. Nous allons voir si nos constatations expérimentales vérifient ces premières approximations.

Définition de l'effet polarographique-unité.

Pour apprécier la pureté biologique du produit, on dispose d'une unité : l'unité internationale. Mais il nous faut, pour en déterminer la proportion dans chacune des préparations étudiées, apprécier le pouvoir polarographique du constituant P, ce qui nous oblige à définir l'unité d'activité polarographique de ce constituant. Par convention, nous allons la définir de la manière suivante :

L'exposant des équations trouvées est de la forme $\alpha \cdot C$, où C est une concentration. Pour que l'exposant soit, comme il doit toujours l'être, un nombre pur, la constante α doit avoir la dimension physique d'un inverse de concentration :

$$\alpha = x \cdot \frac{1}{C}$$

où x est un facteur de proportionnalité qui dépend des unités choisies. Comme ce choix reste à faire, on va justement admettre que le nombre d'unités internationales de gonadotrophine rendant le facteur x égal à 1 définit l'effet polarographique-unité. Cet effet s'exprime donc par une certaine concentration C_u de gonadotrophine, variant avec la valeur de la constante α du produit considéré. En effet on a :

$$\alpha = x \cdot \frac{1}{C} \text{ où } C \text{ devient } C_u \text{ si } x = 1$$

La concentration C_u définissant l'unité d'effet polarographique se calcule donc à partir de la constante α .

On trouve alors que 31,8 UI/2 cc d'HGC CIBA, 11,5 UI/2 cc de Prolan et 339,0 UI/2 cc d'HGC ORGANON engendrent une vague de même hauteur, prise pour unité d'effet polarographique (fig. 19).

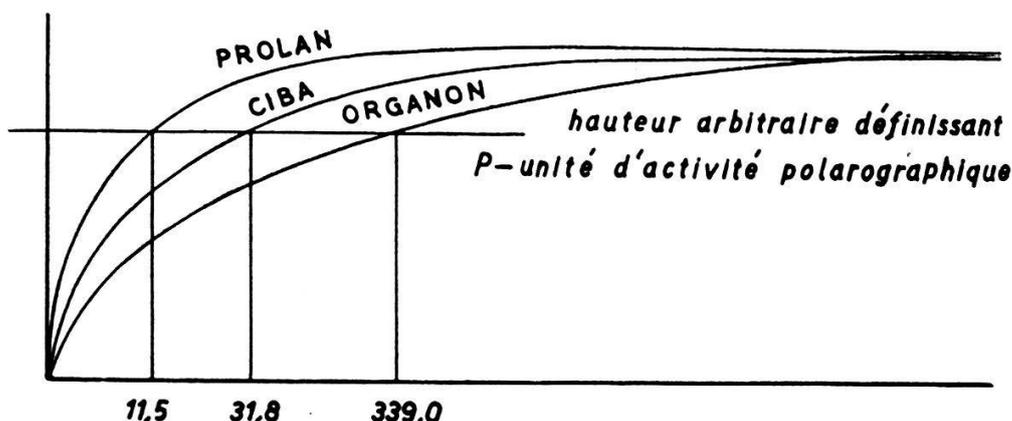


FIG. 19.

Ces valeurs s'obtiennent à partir des valeurs d' α :

$$\alpha \text{ du Prolan} = 0,087 \quad C_u = \frac{1}{0,087} = 11,5 \text{ UI/2 cc}$$

$$\alpha \text{ de l'HGC CIBA} = 0,0315 \quad C_u = \frac{1}{0,0315} = 31,8 \text{ UI/2 cc}$$

$$\alpha \text{ de l'HGC ORGANON} = 0,00295 \quad C_u = \frac{1}{0,00295} = 339,0 \text{ UI/2 cc}$$

Ces valeurs expriment en unités internationales la quantité de produit qu'il faut prendre pour avoir un certain poids P_u du constituant P purement catalytique et non gonadotrope, ce poids P_u engendrant un effet polarographique unité.

Poids de l'effet biologique-unité.

Avant de vérifier notre hypothèse, il nous faut définir les poids π soit de Prolan, soit d'HGC CIBA ou ORGANON qui possèdent une activité biologique identique, égale à une unité internationale. Ces poids sont :

titre du Prolan : 125 UI/mgr	$\pi = \frac{1}{125} = 8 \gamma$
titre de l'HGC CIBA : 400 UI/mgr	$\pi = \frac{1}{400} = 2,5 \gamma$
titre de l'HGC ORGANON : 4750 UI/mgr	$\pi = \frac{1}{4750} = 0,211 \gamma$

Ces valeurs expriment en poids la quantité de produit qu'il faut prendre pour avoir un certain poids H_u du constituant H purement gonadotrope et non catalytique, ce poids H_u engendrant un effet biologique égal à l'unité internationale.

Relation entre π , C_u , P_u et H_u .

Grâce aux définitions précédentes, nous pouvons préciser que dans une solution contenant un certain nombre C_u d'unités internationales se trouve un poids de substance égal à $\pi \cdot C_u$, π étant le poids d'une unité internationale. Ce poids contient, selon notre hypothèse de départ, une quantité P_u de constituant P engendrant un effet catalytique unité, et une quantité de substance gonadotrope H égale à $C_u - H_u$, H_u étant le poids de l'unité biologique. Ce raisonnement peut s'exprimer à l'aide de ces symboles par la relation :

$$\pi \cdot C_u = P_u + C_u \cdot H_u$$

Divisons par C_u les deux membres de cette relation :

$$\pi = P_u \cdot \frac{1}{C_u} + H_u$$

On sait d'autre part que $1/C_u = \alpha$. Donc on a :

$\pi = P_u \cdot \alpha + H_u$

Le graphique π en fonction d' α .

Dans un système de coordonnées où les valeurs de π sont reportées en abscisses et celles de α en ordonnées, la relation ci-dessus représente une droite. Son ordonnée à l'origine nous donnera le poids que pèserait l'unité H_u du constituant gonadotrope hypothétique H rigoureusement pur. Sa pente donnera le poids que pèserait l'unité P_u du constituant hypothétique P polarographiquement actif.

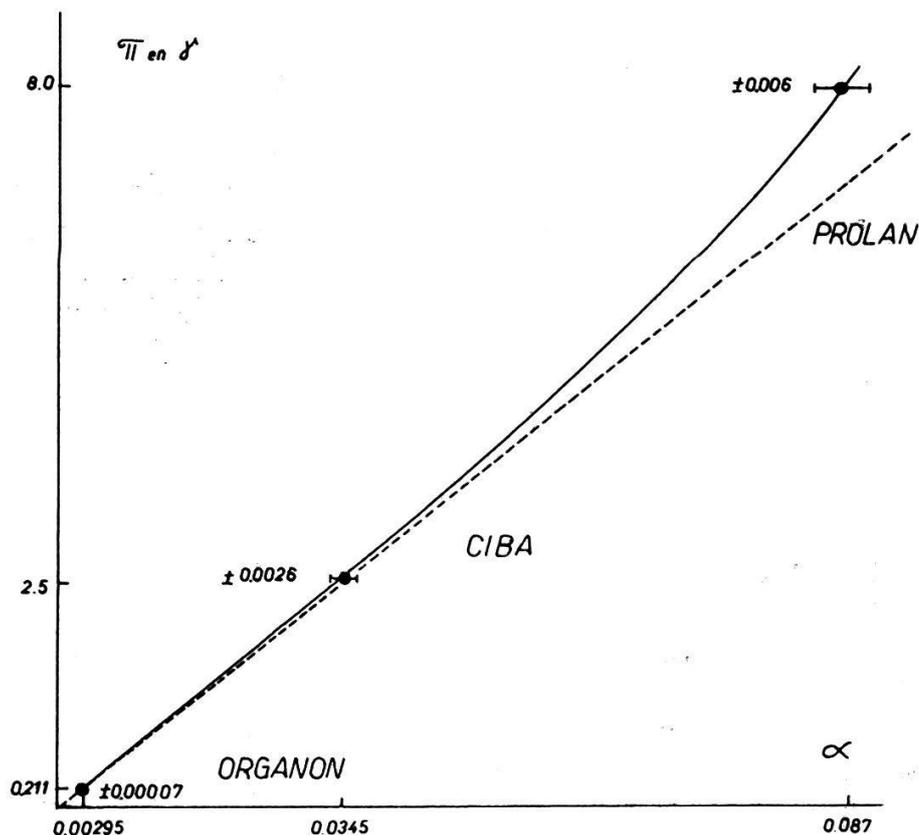


FIG. 20.

D' α on possède trois valeurs expérimentales, dont on connaît la précision par la dispersion des valeurs d' α vis-à-vis d' α moyen. De π on possède également trois valeurs. On a reporté dans la figure 20 les valeurs d' α en abscisses et celles de π en ordonnées, afin de déterminer la droite cherchée.

Cette droite passe par l'origine. Il n'y a pas d'ordonnée à l'origine, il n'y a donc pas de produit à la fois purement gonadotrope et dépourvu d'activité polarographique. Notre hypothèse de départ est donc fautive. Elle supposait que l'hormone gonadotrope d'origine placentaire ne possède pas de propriétés polarographiques, les impuretés en étant seules responsables.

Le raisonnement, appuyé sur les données expérimentales, prouve par l'absurde que la gonadotrophine possède nécessairement un pouvoir catalytique mesurable au polarographe. Examinons encore sous un autre aspect la relation entre π et α .

Le graphique π/α en fonction de $1/\alpha$.

En divisant par α les deux membres de la relation précédente, il vient :

$$\frac{\pi}{\alpha} = P_u + \frac{H_u}{\alpha}$$

Dans un système de coordonnées où les valeurs de $1/\alpha$ sont reportées en abscisses et celles de π/α en ordonnées, l'expression ci-dessus représente encore une droite. Sa pente H_u/α donnerait le poids de l'unité biologique de la gonadotrophine pure. Son ordonnée à l'origine indiquerait le poids P_u du constituant P qui développe une unité d'effet polarographique (fig. 21). En réalité, on trouve trois points tels que la

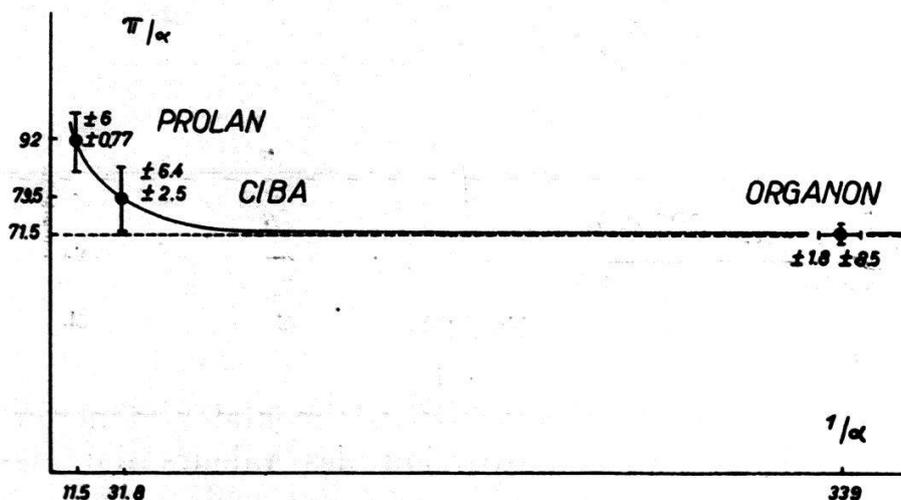


FIG. 21.

droite, n'ayant pas le droit d'avoir une pente négative (ce qui reviendrait à parler de poids négatifs !), ne peut au mieux qu'être horizontale. Sa pente est nulle : cela signifie qu'il n'y a pas de substance purement gonadotrope dénuée de propriétés polarographiques.

Puretés comparées des produits étudiés.

Du graphique π en fonction d' α , on tire que le poids d'une unité d'effet polarographique vaut 71,5 γ (pente de la droite). Cette valeur coïncide avec celle de l'ordonnée à l'origine de l'horizontale passant par le point de l'HGC ORGANON de la figure 21. Cela signifie que l'HGC ORGANON ne contient pratiquement que des substances polarographiquement actives, quelles qu'elles soient. Les autres préparations contiennent un ballast non gonadotrope et polarographiquement inerte donné par l'écart des autres points de la figure 21 rapportés au point de l'HGC ORGANON :

$$\frac{79,5 - 71,5}{71,5} = 11 \% \text{ de ballast pour l'HGC CIBA}$$

$$\frac{92 - 71,5}{71,5} = 27 \% \text{ de ballast pour le Prolan.}$$

SECONDE HYPOTHÈSE

Les préparations étudiées demeurent composées de deux constituants. L'un est une impureté, un ballast r que l'on suppose dépourvu de toute propriété polarographique et biologique. L'autre est la gonadotrophine placentaire pure, à la fois catalytique et gonadotrope. Ce qui s'exprimerait ainsi :

$$\begin{aligned} \text{Prolan} &= 73 \% \text{ H} + 27 \% r \\ \text{HGC CIBA} &= 89 \% \text{ H} + 11 \% r \\ \text{HGC ORGANON} &= 100 \% \text{ H} \end{aligned}$$

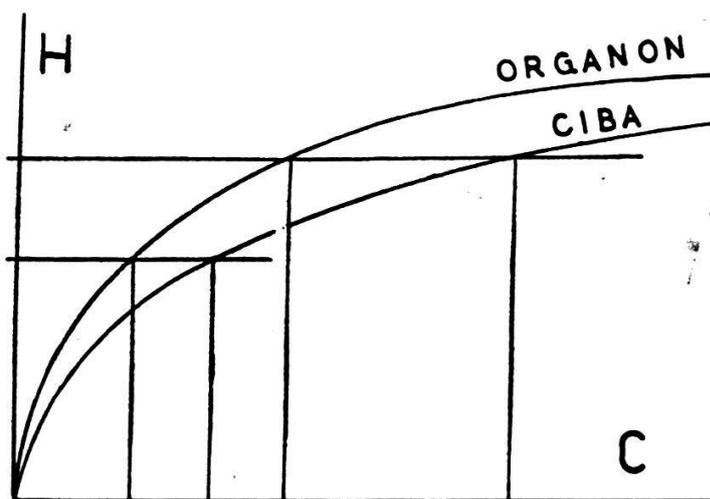


FIG. 22.

Cette hypothèse implique que des concentrations d'HGC CIBA et ORGANON engendrant une vague d'égale hauteur sont dans un rapport constant égal à 89/100 (fig. 22). En fait,

on trouve sur les graphiques expérimentaux un rapport de 10 % au lieu de 89 %. La seconde hypothèse est donc également incorrecte.

TROISIÈME HYPOTHÈSE

On vient d'établir que dans un produit comme l'HGC CIBA se trouvent 89 % de substances polarographiquement actives.

Dans cette fraction, responsable de la vague polarographique, il y aurait 10 % d'hormone gonadotrope chorale pure ou G_o . Le reste est un produit G_x également dosé par le polarographe, mais biologiquement non gonadotrope. Cette façon d'interpréter nos mesures est la seule qui n'aboutisse pas à une contradiction mathématique. Par conséquent la composition des produits étudiés peut s'exprimer comme suit :

$$\begin{aligned} \text{Prolan} : & 125 \text{ UI/mgr} = 73 \% (G_x + G_o) + 27 \% r \\ \text{HGC CIBA} : & 400 \text{ UI/mgr} = 89 \% (G_x + G_o) + 11 \% r \\ \text{HGC ORGANON} : & 4750 \text{ UI/mgr} = 100 \% (G_x + G_o). \end{aligned}$$

C'est la présence du constituant non gonadotrope G_x qui fait différer les titres biologiques des produits étudiés, ainsi que le ballast r . Cet état de chose explique pourquoi des concentrations biologiques égales de gonadotrophines n'engendrent pas des vagues polarographiques de même hauteur. Il nous a fait croire à tort, au début de ce raisonnement, que la gonadotrophine elle-même pourrait ne pas avoir de propriétés polarographiques. Dans nos conditions de mesure, on dose donc à la fois la gonadotrophine G_o pure, et un constituant G_x dont on ignore tout pour le moment. Pour être encore présent dans les produits étudiés malgré les fortes purifications qu'ils ont subies, G_x doit offrir une structure chimique très voisine de celle de la gonadotrophine placentaire. Comme G_x abaisse la surtension de l'hydrogène vis-à-vis du mercure, il peut être une protéine ou un acide aminé (cystine, cystéine, ou polypeptides dérivés).

Confirmation de nos résultats.

Quelle que soit l'activité gonadotrope par unité de poids, l'activité polarographique des produits étudiés se montre proportionnelle non à leur titre biologique, mais à leur poids brut : en reportant la hauteur du polarogramme en fonction de la concentration exprimée non plus en UI/2 cc, mais en $\gamma/2$ cc, on obtient une courbe identique pour les trois produits étudiés (fig. 23). Cette courbe montre éloquemment que le

polarographe permet le dosage non seulement de la gonadotrophine placentaire, mais de l'ensemble des protéines (Go + Gx) contenues dans la préparation.

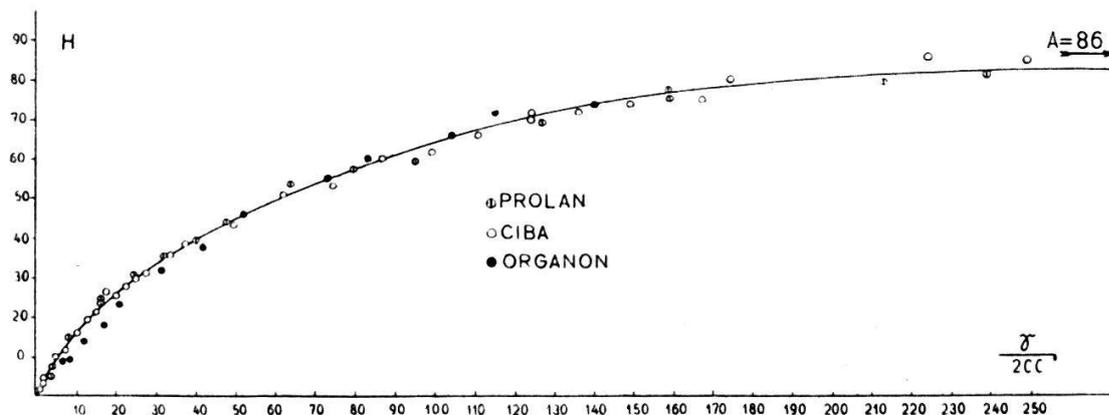


FIG. 23 — Hauteur de la vague des trois gonadotrophines étudiées, en fonction de la concentration exprimée en $\gamma/2cc$. Conditions standard de mesure.

Preuve expérimentale de l'hétérogénéité de l'HGC CIBA.

La méthode polarographique pourrait donc doser la gonadotrophine placentaire s'il était possible de l'obtenir sous une forme pure. C'est dans cette direction que nos recherches actuellement s'orientent, et, pour aboutir, nous tentons de purifier par électrophorèse l'extrait gonadotrope tiré par les méthodes usuelles des urines de femme enceinte. Au cours de ces essais, le PROLAN CIBA, utilisé pour mettre la méthode au point, s'est révélé, comme prévu, composé d'au moins deux fractions distinctes, ce que montre l'électrophorogramme de la figure 24. Il s'agit d'un papier filtre carré d'environ 25 cm de côté, disposé verticalement dans un appareil conçu par GRASSMANN et HANNIG (16). La solution à purifier arrive en un point de la région supérieure du papier. De là, le tampon qui imprègne la cellulose tend à l'entraîner de haut en bas; mais, en même temps, une différence de potentiel appliquée aux marges du papier sollicite horizontalement les particules chargées. La résultante de ces forces varie d'une protéine à l'autre et permet de séparer ces protéines.

Cette expérience a eu lieu sur un papier à chromatographie Schleicher-Schuell 2043 b à pH 8,6 à l'aide de tampon véronal, de force ionique $\mu = 0,1$, préparé selon les données de MICHAELIS (17). Tension appliquée aux marges du papier : 180 volts continus. Débit : 15 milliampères. Durée : 12 heures. Substance à purifier : 50 milligrammes de PROLAN dilués dans 5,0 cc de tampon véronal

pH 8,6, $\mu = 0,1$. Révélation du papier par la méthode du noir Amido 10 B de Bayerwerk (18). D'autres essais préalables, moins démonstratifs, réalisés dans d'autres conditions, montrent tout de même la présence de deux fractions dans le produit ci-dessus. L'hétérogénéité du PROLAN, l'unique produit dont on disposait encore en quantité suffisante pour ce genre d'expérience, a pu seule être expérimentalement démontrée par électrophorèse sur papier.

IV. CONCLUSIONS.

L'effet catalytique des produits gonadotropes d'origine placentaire est un phénomène polarographique reproductible si l'on fixe l'ensemble des facteurs susceptibles de l'influencer. Ces facteurs ont été étudiés, et déterminés de manière à obtenir une vague connue dans la littérature sous le nom de vague catalytique simple des protéines (« simple wave »).

La hauteur de la vague de ces produits donne une mesure non de leur activité biologique, mais de leur teneur totale en protéines. Celles-ci sont au nombre de deux. L'une est la gonadotrophine chorale ou placentaire proprement dite. L'autre est, probablement, une protéine que l'on n'a pas identifiée. Cette hétérogénéité protéique a trouvé une confirmation expérimentale par l'électrophorèse sur papier d'un des produits étudiés.

Le polarographe permettrait le dosage de la gonadotrophine placentaire si l'on pouvait obtenir cette hormone sous forme pure à partir des urines de femme enceinte. Les recherches se poursuivent dans ce sens en faisant appel au procédé d'électrophorèse sur papier des produits gonadotropes à purifier.

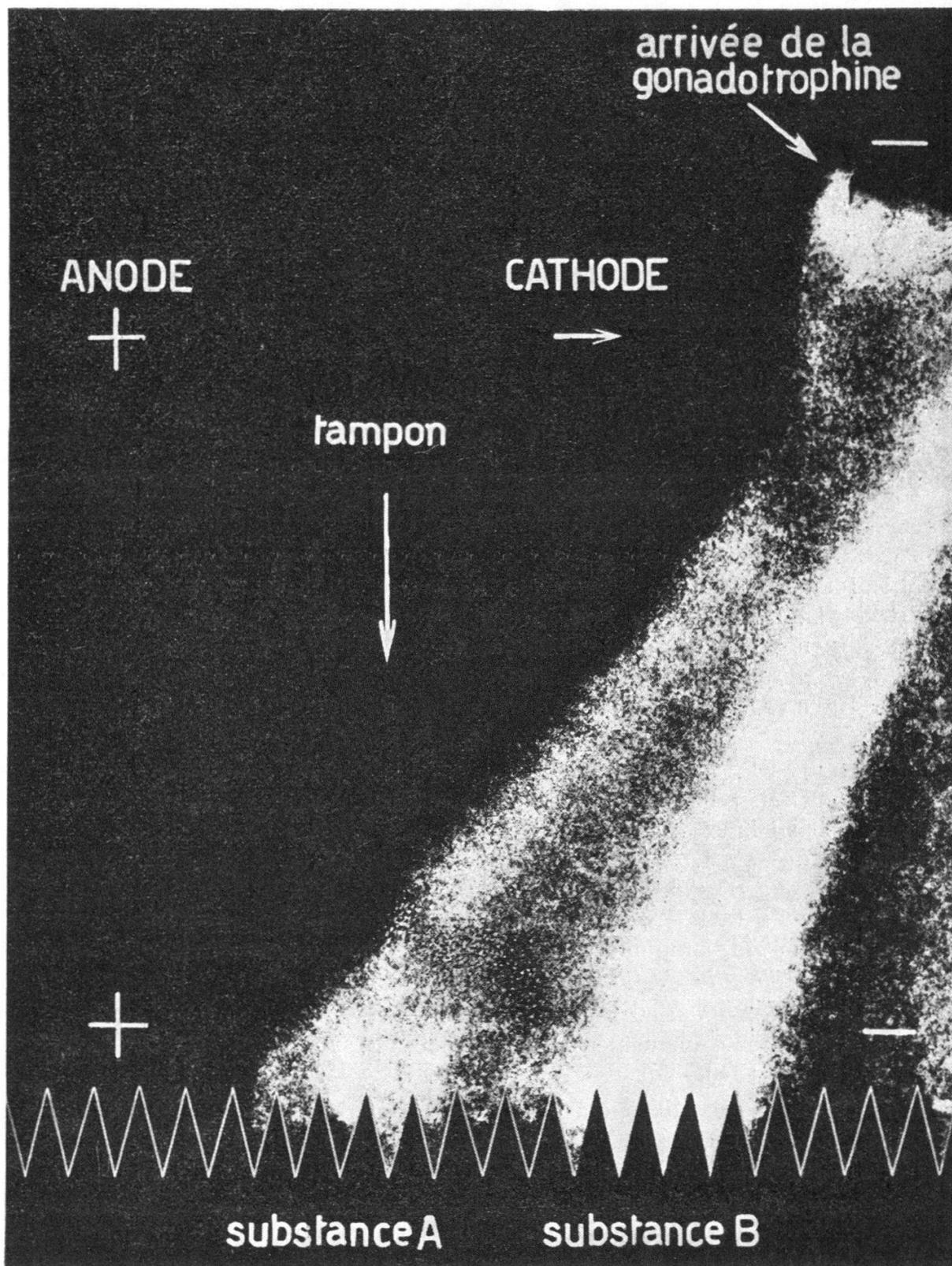


FIG. 24.

BIBLIOGRAPHIE

1. ASCHHEIM S. et ZONDEK B. — Darstellung des weiblichen Sexualhormons aus dem Harn, insbesondere dem Harn von Schwangeren. *Klin. Woch.* 7, 485, 1928.
2. FRIEDMANN H.-M. — Mechanism of ovulation in Rabbit. *The Amer. J. of Physiol.* 90, 617, 1929.
GALLI-MAININI C. — *J. Clin. Endocrinol.* 7, 653, 1947.
3. NEUKOMM S. — Dosage polarographique de la gonadotrophine chorale de la femme enceinte. *Experientia VII*, 349, 1951.
4. EUCKEN A. — Grundriss der physikalischen Chemie, Leipzig, 1944, 6^e édition, pp. 521 à 584.
BÖTTGER W. — Physikalische Methoden der analytischen Chemie. Leipzig, 1949, 2^e édition, pp. 121-173 et 315-338.
- v. STACKELBERG M. — Polarographische Arbeitsmethoden. W. de Gruyter, Berlin, 1950.
- VERDIER E.-T. — Méthode polarographique d'électroanalyse, Actualités scientifiques et industrielles, n° 958, Paris, 1943.
5. ILKOVIC D. — The evolution of hydrogen from neutral and alkaline solutions. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 4, 480-491, 1932.
HEYROVSKY J. — A theory of overpotential. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 44, 499-502, 1925.
HEYROVSKY J. — The hydrogen overpotential in light and heavy water. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 9, 273-301 et 345-359, 1937.
6. HERLES F. et VANCURA A. — (paru en tchèque : découverte de l'effet polarographique des protéines du sang. Résumé dans l'article ci-dessous.)
HEYROVSKY J. et BABICKA J. — The effect of albumins. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 2, 370-79, 1930.
BRDICKA R. — A new test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solutions of ammonium chloride. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 5, 112-128, 1933.
7. GURIN S., BACHMANN C. et WILSON D.-W. — The gonadotropic hormone of urine of pregnancy. *J. Biol. Chem.* 133, 467-477, 1940.
8. MAJER V. — Mikropolarographische Untersuchungen. *Mikrochemie* 18, 74-88, 1935.
MAJER V. — Current-voltage curves using small anodes. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 7, 215-227, 1935.
MAJER V. — Passivation of small mercury anodes, *ibidem*, p. 146-157.
9. JURKA E. — Investigation of the simultaneous occurrence of the two known protein effects produced in buffered cobalt solutions. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 11, 243-255 1939.

10. BRDICKA R. — The effect of buffer solutions on the reaction of proteins. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 8, 366-376, 1936.
 11. BRITTON et ROBINSON. — *J. chem. Soc. London* 133, 458, 1931.
BRITTON. — Hydrogen ions, 225, Londres, 1932.
 12. BRDICKA R. — Activation of hydrogen in sulfhydryl group of some thioacides in cobalt salt solutions. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 5, 148-164, 1933.
BRDICKA R. — The microdetermination of cystine and cysteine in the hydrolysates of proteins and the course of the protein decomposition. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 5, 238-252, 1933.
 13. BRDICKA R. — Etudes polarographiques des protéines du sérum et leur signification pour le diagnostic du cancer. *Comptes rendus Soc. biolog.* 78, 54-57, 1938.
BRDICKA R. — Recherches polarographiques sur les protéines. *Journal de Chimie-Physique* 35, 89-98, 1938.
 14. BRDICKA R. — Ueber Grenzströme der katalysierten Elektrodenvorgänge. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 11, 614-625, 1939.
 15. HERASYMENKO P. et SLENDYK I. — Wasserstoffüberspannung und Adsorption der Ionen. *Ztschr. für phys. Chemie* 149, 123-139, 1930.
HERASYMENKO P. et SLENDYK I. — Lowering of the hydrogen overpotential by some organic substances. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 6, 204-210, 1934.
 16. GRASSMANN W. et HANNIG K. — Trennung von Stoffgemischen auf Filtrierpapier durch Ablenkung im elektrischen Feld. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift* 292, 32-50, 1953.
 17. MICHAELIS L. — *J. Biol. Chem.* 87, 33, 1930.
 18. GRASSMANN W. et HANNIG K. — Ein quantitatives Verfahren zur Analyse der Serumproteine durch Papierelktrophorese. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift* 291, 1, 1952.
-

TABLE DES MATIERES

I.	INTRODUCTION	1
II.	CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES	
	d'apparition de la vague polarographique de la gonadotrophine	3
	Le polarographe	3
	Renouvellement de l'électrode à gouttes de mercure	6
	Choix d'un électrolyte indifférent	6
	Choix du pH et d'un système tampon	8
	Conditions expérimentales de mesure	10
	Relation entre effet polarographique et concentration gonadotrope	14
	Adsorption des micelles de gonadotrophine à la surface de la goutte de mercure	17
III.	ESSAIS DE DÉTERMINATION QUANTITATIVE	
	de la gonadotrophine d'origine placentaire	18
	Première hypothèse	20
	Définition de l'effet polarographique-unité	20
	Poids de l'effet biologique unité	20
	Relation entre π , C_u , P_u et H_u	22
	Le graphique π en fonction d' α	23
	Le graphique π/α en fonction de $1/\alpha$	24
	Puretés comparées des produits étudiés	25
	Seconde hypothèse	25
	Troisième hypothèse	26
	Confirmation de nos résultats	26
	Preuve expérimentale de l'hétérogénéité de l'HGC CIBA	27
IV.	CONCLUSIONS	28
	BIBLIOGRAPHIE	30