

**Zeitschrift:** Archives des sciences [1948-1980]  
**Herausgeber:** Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève  
**Band:** 14 (1961)  
**Heft:** 2

**Artikel:** Contribution à l'étude du métabolisme des androgènes chez le cobaye  
**Autor:** Charollais, E.J. / Jayle, M.F. / Ponse, K.  
**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-739571>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

**Download PDF:** 30.01.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME DES ANDROGÈNES CHEZ LE COBAYE

par

**E. J. Charollais, M. F. Jayle et K. Ponse**

---

## INTRODUCTION

En 1931-32, STEINACH et KUN (1931) d'une part, GUYÉNOT et PONSE (1932) d'autre part, découvrent la masculinisation de cobayes femelles provoquée par l'injection d'extraits hypophysaires bruts, à la fois gonadotropes, corticotropes et thyroïdotropes. Par la suite, GUYÉNOT et PONSE ont complété cette découverte qui fut également étudiée plus tardivement en Hollande puis en Amérique.

En 1951-52, K. PONSE (1952, 1954*a*, 1954*b*, 1955, 1958) démontre sur des rats que cette masculinisation est d'origine purement ovarienne, puisqu'elle se développe rapidement, avec le maximum d'intensité en l'absence d'hypophyse et de surrénales. Dans ces conditions, l'ovaire, de grande taille, après atresie folliculaire et hyperstimulation par le facteur LH de l'urine ou du sérum gravidique, devient une masse de cellules théco-interstitielles hyperplasiées.

Chez le cobaye, il s'agissait de démontrer que la femelle masculinisée, présente un excédent de métabolites d'androgènes ovariens, dans l'urine, au moyen du dosage des 17-cétostéroïdes neutres.

De 1953 à 1958, un groupe de chercheurs, sous la direction des professeurs M. F. JAYLE (Paris) et K. PONSE (Genève) se sont attaqués à ce problème \*. Le dosage et l'identification par chromatographie sur papier des 17-cétostéroïdes urinaires d'animaux opérés et traités par M<sup>mes</sup> ROSENBUSCH, LIBERT et PERRET m'ont été confiés. L'analyse histologique a été effectuée par M<sup>lle</sup> PONSE. Cette étude nous a conduits, nécessairement, à envisager le problème de l'élimination urinaire des 17-cétostéroïdes des cobayes normaux, et des témoins opérés non traités, ainsi qu'à une brève

\* Ce travail a pu être effectué grâce à la générosité du Fonds national suisse de la Recherche scientifique.

analyse du métabolisme de certains précurseurs des 17-cétostéroïdes urinaires chez cet animal.

L'utilisation d'une microméthode de dosage des 17-cétostéroïdes, d'une extraction butylique et d'une hydrolyse enzymatique de leurs conjugués urinaires, nous a permis de mener à bien cette tâche et de préciser les rôles respectifs de l'ovaire et de la surrénale lors de la masculinisation.

---

## I. MÉTHODES DE DOSAGE ET D'IDENTIFICATION DES 17-CÉTOSTÉROÏDES URINAIRES

### TECHNIQUES DE DOSAGE — MISE AU POINT

#### A. *Réaction de Zimmermann.*

Nous avons essentiellement utilisé la réaction de Zimmermann comme réaction colorée permettant de doser par spectrophotométrie dans le visible les 17-CS urinaires. Notre technique de base repose sur une modification de la méthode originale de KLENDSHOJ et al. (1953), associant l'emploi du monométhylglycol pour préparer le méta-dinitrobenzène et pour la dilution finale, et de la potasse en solution méthylique anhydre. Cette méthode a été décrite dans le détail (CHAROLLAIS, 1955), nous n'y reviendrons pas, si ce n'est pour souligner le fait que tous les solvants et réactifs doivent être extrêmement purs. Nous avons toujours utilisé avec succès la potasse et le méthanol *puriss. pro analysi* ainsi que le méta-dinitrobenzène Merck spécialement préparé pour le dosage des 17-CS. Quant au mono-méthylglycol, il contient toujours de faibles quantités de substances cétoniques donnant la réaction de Zimmermann. Il est nécessaire de le traiter de la façon suivante:

Dans un ballon rodé de 500 ml avec réfrigérant à reflux, dissoudre 5 g de 2,4 dinitro-phénylhydrazine dans 250 ml de mono-méthylglycol à purifier, ajouter 5 ml d'HCl conc. et faire bouillir à reflux pendant dix minutes. Après refroidissement, distiller sous vide en éliminant soigneusement les fractions de tête et de queue. Il reste ainsi environ 200 ml de mono-méthylglycol, distillant entre 25 et 30° suivant la pression et convenant parfaitement aux exigences de la réaction de Zimmermann.

B. *Résultats obtenus à partir de stéroïdes purs.*

Il est intéressant de voir comment vont se comporter les principaux 17-CS vis-à-vis de la réaction de Zimmermann-Klendshoj. Nous examinons tout d'abord les 11-desoxy-cétostéroïdes puis les 11-oxy-cétostéroïdes.

TABLEAU 1.

*Densité optique mesurée en fonction de la longueur d'onde pour différents 17-cétostéroïdes (20 µg de stéroïde, cuve de 1 cm).*

17-CS	λ maximum	D. O. maximum absolue	D. O. Allen	Extinction molécul. maximum*
DHA	500-505 mμ	0,153	0,0250	6640
A	510	0,153	0,0240	6710
E	505	0,159	0,0355	6960
éA	505	0,144	0,0260	6310
Δ <sup>4</sup> -androstène, 3,17-dione	505	0,215	0,0260	9280
11-OHE	510	0,193	0,0270	9110
11-OHA	510	0,143	0,0195	6800
11-COE	510-520	0,301	0,0555	14210
11-COA	510	0,439	0,0755	20700

$$* \text{ Extinction moléculaire maximum} = E_{\text{mol.}} = \frac{\text{D. O. max.}}{l \times c.}$$

$l$  = longueur de la cuve en cm,  $c$  = concentration en mole/litre.

Parmi les 11-desoxy, nous avons effectué les courbes d'absorption avec: la déhydroépiandrostérone (DHA), l'androstérone (A), l'étiocolanolone (E), l'épiandrostérone (éA) et la Δ<sup>4</sup>-androstène-3, 17-dione (tableau 1). Ces résultats permettent de constater, d'une part que le maximum d'absorption se situe à 505-510 mμ, d'autre part que les densités optiques absolues sont équivalentes pour les quatre premiers, à savoir déhydro-épiandrostérone, androstérone, étiocolanolone et épi-androstérone.

Cependant, il est à remarquer que l'étiocolanolone a une courbe d'absorption qui sans être plus élevée, est moins étalée, si bien que la valeur obtenue par l'équation correctrice d'Allen est plus élevée. Au contraire, la Δ<sup>4</sup>-androsténedione, qui est plus chromogène que les quatre autres, possède la même densité optique corrigée par suite d'un plus grand étalement de sa courbe.



Parmi les 11-oxy, nous avons étudié: la 11 $\beta$ -hydroxy-étiocholanolone (11-OHE), la 11 $\beta$ -hydroxy-androstérone (11-OHA), la 11-céto-étiocholanolone (11-COE) et la 11-céto-androstérone (11-COA) (tableau 1). Comme il fallait s'y attendre, les 17-CS possédant deux fois un groupe méthylène activé par une fonction cétonique sont plus chromogènes que ceux qui n'en possèdent qu'une. Il y a même une relation de proportionnalité. En conséquence, les 11-céto sont plus chromogènes que les 11-oxy correspondants. Cependant, la 11-hydroxy-étiocholanolone est plus chromogène que la 11-hydroxy-androstérone, cette dernière correspondant à un 11-desoxy (type androstérone). Il faut également noter que les stéroïdes possédant deux fonctions cétoniques en 11 et 17 ont un maximum d'absorption légèrement déplacé vers les plus grandes longueurs d'ondes (510-520 m $\mu$ ). Si maintenant nous comparons la courbe d'absorption d'un extrait d'urine de cobaye préparé selon les méthodes décrites plus loin, nous constatons une parfaite similitude avec la courbe d'absorption d'un 17-CS oxygéné en 11.

Nous avons ainsi une méthode sensible, qui permet d'estimer à partir de 5  $\mu$ g les 11-désoxy-17-CS présents dans les urines de cobayes, ou même 2 à 3  $\mu$ g de dicétostéroïdes (11, 17). Des centaines d'étalonnages nous ont montré la parfaite reproductibilité de la méthode.

TABLEAU 2.

*Densité optique à 505 m $\mu$  pour différents 3-cétostéroïdes.  
Maximum d'absorption à 510-515 m $\mu$  (20  $\mu$ g de stéroïde, cuve de 1 cm).*

Stéroïdes	D. O. absolue	D. O. Allen
Testostérone . . . . .	0,078	0,0035
$\Delta^4$ -androstène, 3-céto, 17 $\alpha$ -ol . . . . .	0,050	0,0035
Androstane, 3-céto, 17 $\beta$ -ol . . . . .	0,068	0,0020
Etiocholane 3-céto, 17 $\beta$ -ol . . . . .	0,033	0,0025

Nous venons de voir qu'une fonction cétonique en position 11 réagissait comme celle en 17. Il n'y a donc pas de spécificité pour l'une ou l'autre position. Qu'en est-il de la fonction cétonique en position 3 ? Il est curieux de constater qu'elle réagit peu ou même pas du tout. Nous avons déjà vu que la  $\Delta^4$ -androstène-dione (tableau 1) avait un pouvoir chromogène un peu plus élevé que les autres 11-désoxy-stéroïdes étudiés. Cependant, la coloration ne correspond pas à deux fonctions cétoniques, il n'y a pas de

proportionnalité. La testostérone, la  $\Delta^4$ -androstène-3-céto-17 $\alpha$ ol, l'androstane-3-céto-17 $\beta$ ol et l'étiocolane-3-céto-17 $\beta$ ol ne fournissent pratiquement aucune coloration avec le réactif de Zimmermann (tableau 2). On peut donc affirmer que le groupe méthylène activé par la fonction cétonique en 3 n'interfère pratiquement pas avec les fonctions de 11 et 17.

Nous n'avions malheureusement pas à notre disposition de stéroïdes possédant des fonctions cétoniques en d'autres positions et spécialement en 20. Il ne nous a donc pas été possible d'examiner en détail la spécificité de cette réaction.

### C. Critique de la méthode.

Résumons d'abord la méthode utilisée et comparons-la avec la technique originale de KLENDSHOJ.

Les extraits secs, contenant 0 à 50  $\mu$ g de 17-CS, sont additionnés de 0,4 ml de m-dinitrobenzène à 1 p. 100 dans le monométhylglycol, on agite bien afin de faciliter la dissolution, puis on ajoute 0,2 ml de potasse 3N dans le méthanol absolu (préparée et centrifugée immédiatement avant l'emploi). On développe la coloration à l'obscurité à 45° pendant exactement 45 minutes. Après refroidissement à la glace, le mélange coloré est dilué avec 4 ml de mono-méthylglycol. La lecture est effectuée dans des cuves de 1 cm à 505 m $\mu$ . La coloration est stable pendant 45 à 60 minutes si l'on a soin de conserver les tubes dans la glace fondante.

On voit donc que la différence fondamentale entre la méthode originale et notre modification réside dans la concentration de la potasse. En effet, nous n'utilisons que 0,6 millimole de potasse par échantillon à doser, alors que KLENDSHOJ en utilise 1,2 millimole dans les mêmes conditions. Cet excès de potasse diminue la stabilité de la coloration et fournit des « blancs » beaucoup trop élevés. De plus, l'emploi d'un thermostat à 45° pour développer la coloration, permet de travailler plus rapidement et dans des conditions beaucoup plus reproductibles.

Les constatations précédentes montrent qu'il est impossible de s'attendre à des résultats d'une haute précision, du fait que les extraits urinaires sont des mélanges complexes de stéroïdes dont les pouvoirs chromogènes sont différents. Il suffit qu'un stéroïde fortement chromogène ait une concentration urinaire légèrement accrue pour que le dosage soit fortement surestimé.

Comme nous le verrons plus loin, les urines de cobayes normaux contiennent principalement des 17-CS oxygénés en 11 et peu de 11-desoxy-

stéroïdes. Il est donc évident que tous les chiffres que nous obtiendrons seront plus élevés que le contenu réel en 17-CS de l'extrait. De plus, lors des traitements effectués sur ces animaux, une faible augmentation d'un 11,17-dicétostéroïde se traduira par une forte élévation du dosage global, inversement l'apparition d'étiocolanolone, d'épiandrosterone, de déhydroépiandrosterone ou d'androsterone, sera beaucoup plus discrète. Le dosage en lui-même n'est donc pas un critère suffisant, il n'est qu'un renseignement préliminaire. Il est indispensable de connaître la composition, aussi exacte que possible, du mélange, pour en tirer une conclusion valable.

*D. Essai d'application de la méthode au dosage des 17-CS conjugués.*

Afin de comparer le pouvoir chromogène des 17-CS libres et celui de leurs conjugués, nous avons effectué la réaction de Zimmermann précédemment décrite sur des échantillons de sulfates de 17-CS que nous avons préparés selon la méthode de SOBEL, SPOERRI et TALBOT (SOBEL et SPOERRI, 1941, 1942; TALBOT et al., 1943). Compte tenu de l'augmentation de poids moléculaire, on peut dire que la déhydroépiandrosterone, l'épiandrosterone et les sels de sodium des esters sulfuriques correspondants ont approximativement le même pouvoir chromogène (moyenne 97,4% pour le rapport DHA sulfate/DHA et 90,7% pour celui éA sulfate/éA). Quant à l'androsterone, différents essais nous ont montré une coloration plus faible pour le sulfate que pour le stéroïde libre (en moyenne 77,6% pour le rapport A sulfate/A), bien que l'analyse élémentaire ne révèle rien d'anormal.

Nous ne nous sommes pas attaqués à la synthèse de glucuronides, qui aurait dépassé le cadre de ce travail. En revanche, nous avons essayé de purifier des extraits d'urines de cobayes, afin d'obtenir des 17-CS glucuroconjugués et sulfoconjugués plus ou moins purs. Il apparaît que ces extraits sont en général beaucoup plus chromogènes (100 à 150%) qu'après hydrolyse enzymatique. Ceci n'est pas dû à la présence d'acide glucuronique qui ne donne aucune réaction de Zimmermann. Il s'agit certainement de chromogènes n'ayant rien à voir avec les stéroïdes.

Dans la figure 1, on peut comparer les courbes d'absorption d'un extrait des 17-CS conjugués d'un mâle normal et injecté de DHA ou d'androsterone, avec l'étiocolanolone, par exemple. On voit que dans l'urine du cobaye normal, il y a beaucoup de chromogènes qui ont pour effet de déplacer le minimum d'absorption de 420-430 m $\mu$  à 460 m $\mu$ . Ce déplacement n'apparaît plus lorsque nous supprimons artificiellement ces chromogènes en augmen-

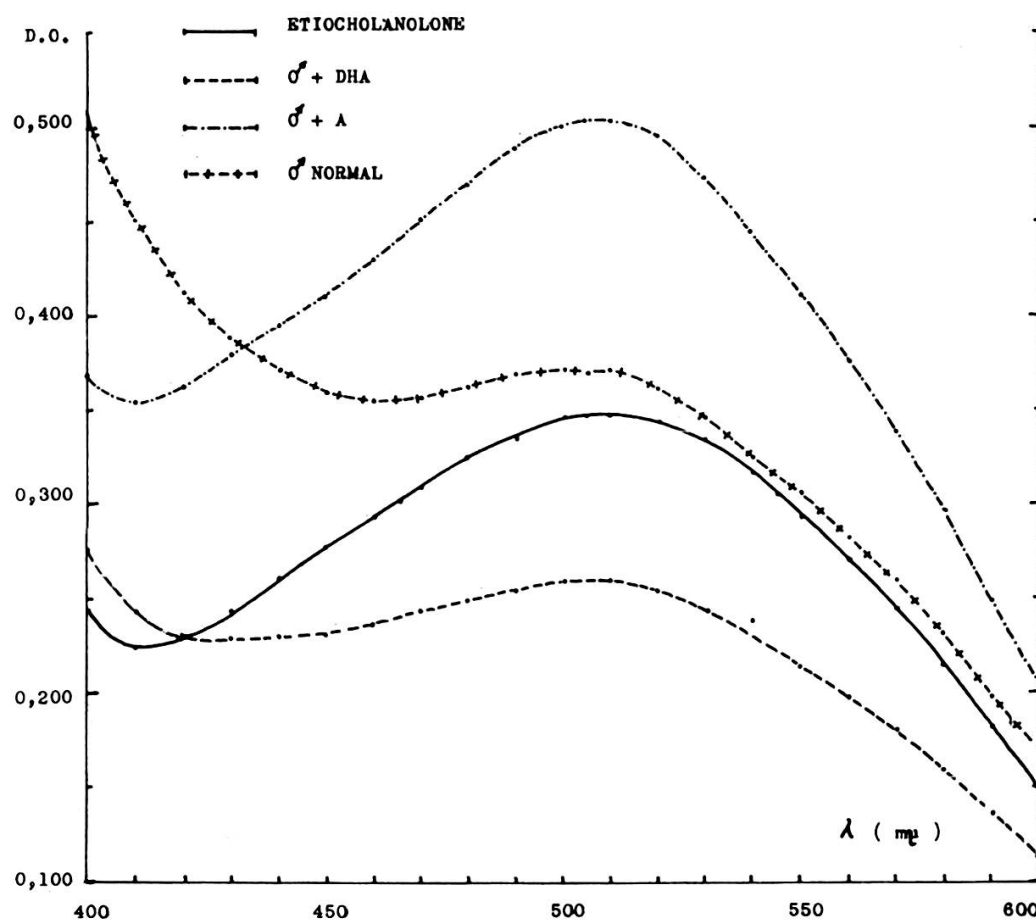


Fig. 1.

Courbes d'absorption comparées de différents extraits urinaires  
et de l'étiocholanolone.

tant fortement les 17-CS par injections de DHA ou d'androstérone pures. L'application de l'équation d'ALLEN (1950) élimine également en majeure partie ces artefacts.

## TECHNIQUES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION

### DES URINES DE COBAYES:

#### MISE AU POINT DE MÉTHODES ADAPTABLES AUX DIFFÉRENTS CAS A ÉTUDIER

##### A. Récolte des urines.

Il n'y a, dans les urines humaines, comme dans les urines de cobayes récoltées sur un antiseptique, que des traces de 17-CS libres. L'immense majorité des 17-CS est conjuguée; encore ne sait-on pas si ces traces ne sont pas dues à un début de

fermentation bactérienne des urines. Aussi est-il nécessaire de récolter les urines avec un maximum de précaution.

Les cobayes en expérience sont placés dans des cages à métabolisme au moins une semaine avant toute récolte d'urine, car ces animaux s'adaptent difficilement aux changements. Nous avons toujours noté un taux de 17-CS trop faible chez des animaux qui n'étaient pas encore habitués à leur cage et à leur nourriture. Les animaux reposent sur un treillis grossier laissant passer les matières fécales et les débris de nourriture qui sont retenus au-dessous par un treillis plus fin. Enfin, l'urine s'écoule dans un plateau incliné afin d'avoir une faible surface d'évaporation. Le plateau est désinfecté en le badigeonnant avec un mélange de 1 ml de Merfen 0,1% et 2 ml de n-butanol. Il faut autant que possible utiliser l'urine immédiatement. Si ce n'est pas possible, on la garde avec un peu de toluène au congélateur ( $-5^{\circ}$ ).

Pendant les expériences, les animaux sont nourris, suivant la saison, avec des betteraves ou de l'herbe fraîche (pissenlits) et du son de blé enrichi en vitamine C (2 g/kg de son). Entre les prises d'urine, les animaux reçoivent en plus de l'herbe fraîche en été, ou du foin en hiver. La récolte des urines a toujours été effectuée pendant exactement 24 heures; le volume brut et le volume final, après rinçage à l'eau du plateau et du treillis métallique, sont mesurés. Un contrôle régulier de la créatinine nous a montré la parfaite reproductibilité des prélèvements d'urine effectués dans ces conditions. La diurèse est très variable; elle oscille entre 20 et 80 ml par jour pour des cobayes de 300 à 600 g. La créatinine est très constante pour un même animal, elle est directement liée au poids du corps en raison de sa nature métabolique. On en trouve 10 à 15 mg/24 heures pour des cobayes de 300 à 600 g; elle peut atteindre 20 à 25 mg/24 heures pour des cobayes de 800 à 1000 g.

### B. *Hydrolyse des conjugués au moyen d'un acide minéral.*

Les 17-CS conjugués (glucuronides ou sulfates) sont facilement scindés en 17-CS libres et acide glucuronique ou sulfurique par les acides minéraux à chaud (acide sulfurique ou acide chlorhydrique). Cette méthode conduit à des artefacts (déshydratation, chloruration, etc.) et détruit en partie certains 17-CS, spécialement les 11-oxygénés. Cette méthode d'hydrolyse (par exemple pH 0,7 à l'ébullition à reflux pendant 10 minutes ou pH 1,0 pendant 30 minutes) suivie d'une extraction des 17-CS libres par un solvant organique (éther, benzène...) s'avère inutilisable pour les urines de cobayes, vu le manque de reproductibilité des résultats.

### C. *Hydrolyse enzymatique de l'urine brute.*

L'urine brute, ajustée à pH 5,0 au moyen d'acide acétique glacial, est additionnée de 0,05 ml de suc digestif d'*Helix pomatia* (HENRY et al., 1952a, 1952b; JARRIGE et HENRY, 1952; ALFSEN, 1957) par ml d'urine, soit en moyenne 5000 à 7000 unités par ml de glucuronidase et 10.000 à 15.000 unités par ml de sulfatase. Le suc digestif d'*Helix pomatia* titre en moyenne 100.000 à 150.000 unités Fishman de  $\beta$ -glucuronidase et 200.000 à 300.000 unités de sulfatase par ml de suc brut. On laisse incuber 36 à 40 heures à  $37^{\circ}$  et extrait à l'éther. Les résultats n'ont pas été satisfaisants, car l'urine de cobaye contient beaucoup trop d'inhibiteurs, l'hydrolyse est très incomplète, cette méthode est également inutilisable.

#### D. *Principe adopté.*

Utilisation de la méthode de fractionnement de JAYLE-BAULIEU, en l'adaptant aux urines de cobayes. Hydrolyse enzymatique.

La méthode de JAYLE-BAULIEU (JAYLE et al., 1952, 1953) combine deux principes :

1. L'hydrolyse des sulfates labiles, selon BITMAN-COHEN (1951) en tampon acétate à chaud.
2. L'extraction sélective des conjugués, à différents pH par le n-butanol à froid.

Chez l'homme, cette technique met en évidence trois fractions urinaires physiologiquement distinctes :

La fraction A, extractible au butanol en pH alcalin, contenant l'androstérone, l'étiocholanolone et environ 20% de la totalité des 17-CS oxygénés en 11.

La fraction B, renfermant presque exclusivement la déhydroépiandrostérone présente dans l'urine sous forme de sulfate thermolabile en milieu faiblement acide.

La fraction C extractible au butanol en pH acide, constituée par 80% du total des 17-CS oxygénés en 11.

Nous allons voir qu'il en est tout autrement chez le cobaye, cependant nous garderons la nomenclature adoptée par JAYLE, tout en précisant bien que la composition des fractions A, B et C est totalement différente.

BITMAN et COHEN (1951) ont montré que la déhydroépiandrostérone éliminée dans l'urine humaine sous forme de sulfate est hydrolysée à pH 5,5 en tampon acétate molaire par ébullition à reflux pendant 4 à 5 heures. Nous avons adopté cette technique et opérons de la façon suivante :

##### a) *Fraction B.*

Les urines, prélevées quantitativement pendant exactement 24 heures, sont mesurées après rinçage des plateaux et treillis avec de l'eau (70 à 100 ml en moyenne). On filtre sous vide sur un filtre rapide. Suivant le volume on prélève 50 ou 75 ml de façon à utiliser la presque totalité des 24 heures. Cette prise est ajustée à pH 5,5 au moyen d'acide acétique glacial, ce qui permet la dissolution de tous les constituants généralement insolubles dans l'urine normale (carbonates, phosphates...) qui est très alcaline (pH 8 à 9,7). On y ajoute un demi-volume de tampon molaire d'acétate de sodium/acide acétique à pH 5,5 et on porte à l'ébullition à reflux pendant 4 heures. Le pH augmente légèrement (6,0 à 6,9). Après refroidissement, les stéroïdes libérés de leur conjugaison sont extraits deux fois à l'éther. Les extraits étherés réunis sont lavés à la soude puis à l'eau afin d'éliminer les



substances acides et phénoliques (œstrogènes). Après évaporation de l'éther au bain-marie, on obtient la fraction B neutre prête à être dosée.

Voici les quantités utilisées:

Pour 50 ml d'urine + 25 ml de tampon acétate:

première extraction à l'éther avec 125 ml (1,7 volume);

deuxième extraction à l'éther avec 60 ml (0,8 volume).

Extraits étherés réunis (185 ml) lavés deux fois avec chaque fois 35 ml de soude N, puis deux fois avec chaque fois 35 ml d'eau distillée.

L'extraction et les lavages se font dans des colonnes verticales (fig. 2) munies d'un robinet à la partie inférieure et à la partie supérieure d'un entonnoir à tubulure capillaire. On introduit l'éther dans la colonne, puis dans l'entonnoir l'urine qui s'écoule sous forme d'un filet continu et se pulvérise en fines gouttelettes dans l'éther. Une fois l'urine décantée dans la colonne, on la repasse par l'entonnoir et ainsi de suite. On fait en tout quatre à cinq passages. Toutes nos extractions ont été effectuées selon ce système.

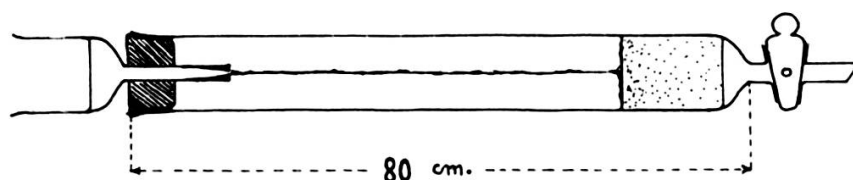


Fig. 2.

Colonne utilisée pour l'extraction des 17-céto-stéroïdes.

#### b) *Fraction A.*

L'urine (+ tampon) exempte de sa fraction B est additionnée de carbonate de sodium en poudre, jusqu'à concentration de 6,7%, de façon à obtenir un pH stable, très voisin de 11. Si on ne veut pas modifier le coefficient de partage lors des extractions ultérieures, il est nécessaire d'éliminer l'éther résiduel de l'extraction précédente sous un léger vide. On extrait deux fois dans les colonnes verticales au n-butanol. Les extraits butyliques réunis sont lavés avec une solution de carbonate de sodium, puis à l'eau. Enfin, après avoir laissé décanter une nuit, le butanol est évaporé à sec, sous vide, au moyen de l'évaporateur rotatif de Craig, à une température inférieure à 50°. Le résidu séché complètement sous un courant d'air constitue la fraction A conjuguée qui sera hydrolysée par les enzymes du suc digestif d'*Helix pomatia*.

Voici les quantités utilisées:

Pour 50 ml d'urine + 25 ml de tampon acétate (exempts de la fraction B), + 5 g de carbonate de sodium:

première extraction avec 75 ml de n-butanol (1 volume);

deuxième extraction avec 37,5 ml de n-butanol (0,5 volume).

Extraits butyliques réunis (112,5 ml) lavés une fois avec 45 ml (0,4 volume) de carbonate de sodium 6,7% puis une fois avec 34 ml (0,3 volume) d'eau distillée.

c) *Fraction C.*

L'urine contient encore des 17-CS conjugués constituant la fraction C que l'on peut extraire de deux manières:

- 1° Soit sous forme libre, par ébullition à reflux pendant 15 à 30 minutes du mélange amené à pH 0,7 ou 1,0 au moyen d'HCl concentré, puis extraction étherée, lavages à la soude et à l'eau selon les mêmes modalités que pour la fraction B;
- 2° soit sous forme conjuguée par une double extraction au n-butanol du mélange amené à pH 1,0 (HCl) et lavages à l'eau de l'extrait butylique. On hydrolyse l'extrait évaporé à sec aux enzymes d'escargots, comme pour la fraction A.

Ces deux méthodes ont été utilisées. La première donne de mauvais résultats. Il y a destruction d'une certaine quantité de 17-CS sensibles aux acides à chaud, transformation de certains pigments qui ensuite passent dans l'éther en donnant de fortes colorations, transformation des restes d'alcool butylique (extraction précédente) en dérivés peu volatiles difficiles à éliminer.

La seconde méthode est bien meilleure, cependant vu les pigments urinaires du cobaye, les extraits contiennent souvent des chromogènes parasites.

Voici les modalités:

Pour 90 ml de résidu urinaire (50 ml d'urine + 25 ml de tampon acétate + environ 15 ml HCl concentré ad pH 1,0):

- première extraction avec 45 ml de n-butanol (0,5 volume);
- deuxième extraction avec 45 ml de n-butanol (0,5 volume).

Extraits butyliques réunis (90 ml) lavés deux fois avec chaque fois 45 ml (0,5 volume) d'eau distillée.

Les extraits butyliques des fractions A et C contiennent des conjugués qu'il faut scinder par hydrolyse enzymatique et purifier avant le dosage.

Les extraits A sont légèrement alcalins, les extraits C acides. On reprend donc les premiers par quelques gouttes d'acide acétique M/10, les seconds par quelques gouttes de soude N, puis on ajoute à chaque extrait 10 ml de tampon acétate 0.02 M pH 5,0. Le pH est vérifié puis ajusté s'il y a lieu à 0,1 unité près. L'hydrolyse se fait dans de petits erlenmeyers de 100 ml en ajoutant 0,5 ml de suc digestif d'*Helix pomatia* brut à chaque extrait, soit une concentration approximative de 5000 à 7500 unités par ml de glucuronidase et 10.000 à 15.000 unités par ml de sulfatase. Après 40 heures à 37°, on extrait à l'éther et lave les extraits à la soude et à l'eau. L'extrait étheré évaporé à sec au bain-marie fournit les fractions A et C, prêtes à être dosées.

Voici le mode opératoire:

A 10 ml hydrolysé, on ajoute 10 ml d'eau distillée:

- première extraction avec 60 ml d'éther (3 volumes);
- deuxième extraction avec 30 ml d'éther (1,5 volume).

Extraits étherés réunis (90 ml), lavés deux fois avec chaque fois 15 ml de soude N, puis deux fois avec chaque fois 15 ml d'eau distillée.

Les extractions se font dans les colonnes verticales, précédemment décrites dont les dimensions sont adaptées au volume à extraire (diamètre 2 à 3 cm, hauteur 80 cm).



Tous les dosages sont effectués selon la microméthode décrite plus haut sur des prises de 10 à 20  $\mu\text{g}$  de 17-CS, correspondant à 10 à 15 ml d'urine pour les fractions B et C et à 5 ml d'urine pour A.

E. *Autre méthode d'extraction pour le dosage des conjugués.*

a) *Fraction AB conjuguée.*

Nous avons vu que l'on pouvait doser les 17-CS conjugués de la même façon que les libres. En nous basant sur cette constatation, nous avons essayé de purifier suffisamment les extraits afin de pouvoir effectuer les dosages directement sur les conjugués, sans passer par l'hydrolyse enzymatique.

Principe: les urines sont d'abord centrifugées 30 minutes à 1500 tours/minute afin d'éliminer les substances insolubles qui favorisent les émulsions lors des extractions butyliques. Le résidu de centrifugation est mis en suspension dans un peu d'eau, centrifugé 15 minutes, puis les deux surnageants sont réunis et additionnés de 4 g de carbonate de sodium sec afin de fixer le pH à 11. On extrait deux fois au n-butanol dans les colonnes verticales, lave l'extrait avec une solution de carbonate de sodium de même concentration que l'urine extraite (8% poids/volume), puis à l'eau. L'extrait évaporé à sec au Craig, à une température inférieure à 50°, est repris par 50 ml d'une solution de carbonate à 8%, puis réextrait au n-butanol comme précédemment. Les dosages peuvent être effectués sur ce dernier extrait sec, aussi bien pour les 17-CS que pour l'acide glucuronique conjugué

Voici les quantités utilisées pour les deux extractions:

Pour 50 ml d'urine centrifugée, amenée à pH 11 (4 g de carbonate de sodium):  
première extraction avec 50 ml de n-butanol (1 volume);  
deuxième extraction avec 25 ml de n-butanol (0,5 volume).

Extraits butyliques réunis (75 ml), lavés une fois avec 30 ml (0,4 volume) de carbonate de sodium 8% et une fois avec 22,5 ml d'eau (0,3 volume). Les dosages sont effectués sur l'équivalent de 5 ml d'urine pour les 17-CS et de 2,5 ml pour l'acide glucuronique conjugué pour des animaux normaux.

Lorsqu'on veut effectuer une chromatographie sur papier, on fait une hydrolyse enzymatique sur une prise aliquote et on opère selon la technique d'hydrolyse précédemment décrite. Il serait peut-être avantageux de mettre au point une chromatographie des conjugués, de façon à simplifier la méthode et à rendre possible l'étude directe du mode de conjugaison des 17-CS du cobaye.

b) *Fraction C.*

L'extraction de la fraction AB conjuguée laisse une fraction C résiduelle analogue à celle obtenue par l'extraction séparée des fractions A et B. On utilise les procédés d'extraction et d'hydrolyse décrits plus haut, lorsqu'on veut doser cette fraction.

Les différentes méthodes que nous venons de décrire sont des techniques de base. On peut ainsi combiner les différentes possibilités et s'adapter à chaque cas particulier.

#### F. *Discussion.*

##### a) *Fractionnement des urines.*

On peut dire que le défaut fondamental de la technique de fractionnement en fractions A, B et C est que, chez l'homme, la fraction A contient plus du tiers des 17-CS oxygénés en 11. Lorsqu'on effectue deux extractions successives sur colonnes au n-butanol (cf. fraction A ou AB), on extrait la presque totalité des 17-CS oxygénés en 11, si bien que la fraction C n'a plus aucun intérêt et cela d'autant plus que les urines de cobayes sont extrêmement pigmentées.

On verra également que le cobaye n'élimine pas (dans tous les cas étudiés) de déhydroépiandrostérone, ainsi la fraction B telle qu'elle a été définie plus haut, devient sans intérêt.

C'est pourquoi, bien que notre premier objectif ait été d'utiliser la méthode de fractionnement de JAYLE, en fractions A, B et C, nous avons dû d'abord renoncer à la fraction B qui ne contenait pas de déhydroépiandrostérone, puis à la fraction C qui ne contenait pratiquement plus de 17-CS oxygénés en 11, lorsque l'extraction au n-butanol de l'urine à pH 11 était effectuée en deux fois (première fois avec un volume, deuxième fois avec un demi-volume de n-butanol).

En définitive, nous n'avons étudié qu'une seule fraction nommée A ou AB, suivant qu'elle avait été préparée après élimination de la fraction B (ce qui purifiait quelque peu les extraits) ou qu'elle avait été obtenue à partir de l'urine brute (paragraphe E de ce chapitre).

En pratique, on peut envisager indifféremment les fractions A ou AB qui sont de toute première importance et reflètent fidèlement l'activité androgène de l'animal.

##### b) *Hydrolyse chlorhydrique et hydrolyse enzymatique.*

Bien que l'hydrolyse par les acides minéraux soit couramment utilisée en clinique et qu'elle fournisse des résultats certains chez l'homme, nous avons vu que chez le cobaye il était impossible de l'utiliser, car elle ne fournissait pas des résultats reproductibles. Par contre, l'hydrolyse enzymatique au moyen des sulfatase et glucuronidase d'*Helix pomatia* convient

parfaitement. Elle permet, d'une part, une excellente reproductibilité des résultats quantitatifs, d'autre part, elle évite la formation d'artefacts et rend plus aisée l'interprétation des chromatogrammes.

#### CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES EXTRAITS URINAIRES

Nous venons de voir que l'interprétation des résultats des dosages colorimétriques des 17-CS urinaires est très délicate, car il faut tenir compte du fait que l'on a un mélange relativement complexe. L'interprétation devient plus aisée dès que l'on sait qualitativement quels sont les 17-CS présents.

##### *A. Technique adoptée.*

Nous avons essentiellement utilisé la méthode de ZAFFARONI et SAVARD (SAVARD, 1953, 1954; ZAFFARONI, 1953; BAULIEU et al., 1957), technique simple et bien adaptée aux moyens dont nous disposons. Nous n'utilisons que la chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1, avec comme phase stationnaire, le propanediol 1,2 et comme phase mobile la ligroïne (point d'ébullition 80-110°), le toluène et le méthylcyclohexane.

##### *Imprégnation des papiers.*

L'imprégnation des papiers avec la phase stationnaire est certainement le point qui réclame le plus d'attention si l'on veut obtenir à la fois précision et reproductibilité des résultats.

Le propanediol 1,2 pur, par sa polarité, rend les stéroïdes peu mobiles; la vitesse de migration est extrêmement lente; aussi est-il nécessaire d'utiliser un diluant volatil de façon qu'il ne reste que peu de propanediol 1,2 sur la feuille. En pratique, on dilue le propanediol avec un volume égal de méthanol, on trempe les feuilles aussi régulièrement que possible dans ce mélange, et on les conserve entre deux feuilles de papier buvard. Le méthanol s'évapore lors des manipulations ultérieures.

##### *Température.*

Un second facteur à envisager est la température. En elle-même (entre 18 et 28°), elle ne joue aucun rôle (si ce n'est dans la vitesse de migration), mais l'amplitude de ses variations peut avoir une influence néfaste, d'une

part sur la descente de la phase mobile, d'autre part sur la résolution des différents stéroïdes. Aussi, afin d'obtenir des résultats semi-quantitatifs et reproductibles, il est nécessaire de travailler dans une pièce à température constante,  $22^{\circ} \pm 1$  par exemple.

Enfin il est nécessaire de mentionner que, malgré une bonne imprégnation du papier par la phase stationnaire et une température constante, on observe souvent des écarts sensibles dans la vitesse de migration des stéroïdes sans qu'on puisse l'expliquer d'une façon satisfaisante.

### *Matériel.*

Nous utilisons le matériel classique de la chromatographie sur papier, à savoir:

De grandes cuves en verre (bacs d'accumulateurs) rodés à la partie supérieure et fermés par une plaque de verre. On assure l'étanchéité au moyen de propanediol 1,2 pur suffisamment visqueux et peu volatil. Il offre l'avantage de ne pas introduire de substances étrangères dans la cuve. Les papiers sont fixés entre deux plaques de verre ayant les dimensions des augettes (chaque augette peut ainsi supporter deux séries de papiers, une de chaque côté). Le tout est posé sur une armature de verre à l'intérieur de la cuve.

La cuve est préparée au minimum 24 heures avant d'être utilisée, en y introduisant les deux liquides constituant les deux phases: propanediol 1,2 et ligroïne, par exemple, afin que l'atmosphère soit équilibrée et saturée des vapeurs des deux solvants. On prépare également la phase mobile en la saturant de la phase stationnaire à la température de la chambre de travail. Il ne reste qu'à disposer les spots sur les papiers en prenant la précaution de ne pas avoir des taches de plus de 5 mm de diamètre. Comme le papier est humide et que les taches s'étendent rapidement, il faut mettre des stéroïdes purs ou les extraits en solution dans un solvant volatil (méthanol ou chlorure de méthylène) et sécher rapidement au moyen d'un faible courant d'air. On dépose quantitativement soit au moyen d'une micropipette graduée (0,1 ml au 1/1000), soit avec un tube étiré à une extrémité en rinçant plusieurs fois avec du solvant propre.

Il est nécessaire de déposer sur chaque feuille de papier des témoins en quantité connue pour permettre un contrôle de la migration et une estimation semi-quantitative des taches. Les feuilles sont alors placées le plus rapidement possible dans la cuve, équilibrée au moins une heure, puis on introduit au moyen de trous percés dans le couvercle de la cuve

au-dessus des augettes, la phase mobile (ligroïne). La durée moyenne est d'environ 20 heures à 22° pour la ligroïne, 4 à 5 heures pour le toluène, 100 heures pour le méthylcyclohexane. Ces temps sont calculés afin d'avoir l'androsterone au bas de la feuille (30 à 35 cm de la ligne de départ).

Une fois la séparation effectuée, les papiers sont retirés de la cuve, séchés complètement à la température de la pièce pendant une nuit ou quelques heures à 45°, puis révélés. Les taches sont mises en évidence en immergeant la feuille de papier d'abord dans une solution de potasse environ 3N dans l'éthanol (5,8 g. de potasse dissous dans 5 ml d'eau, volume final 50 ml avec éthanol 95%). On sèche soigneusement les bandes entre des feuilles de papier buvard, puis on les immerge de nouveau dans une solution de m-dinitro-benzène à 2% dans l'éthanol. On sèche de nouveau soigneusement. Les taches apparaissent immédiatement pour les 11-céto-17-CS, en quelques minutes dans une étuve à 45° pour les autres 17-CS. Le papier doit rester blanc, les taches apparaissent en violet, bleu ou rose.

#### B. *Séroïdes mis en évidence — RT moyens obtenus.*

Remarquons, tout d'abord, que le toluène sépare très mal les stéroïdes oxygénés en 11. Les 11-hydroxy et 11-céto correspondants ne forment qu'une seule tache. Ce système n'est donc pas utilisable pour les urines de cobayes qui contiennent surtout des 17-CS oxygénés en 11. Le système méthyl-cyclohexane-propanediol n'est utilisé que dans quelques cas particuliers où l'on veut confirmer la présence de déhydroépiandrosterone et d'épiandrosterone dans un même extrait. Cependant, le système ligroïne-propanediol 1,2 sépare déjà convenablement ces deux stéroïdes. Pratiquement, tous nos résultats ont été obtenus au moyen de ce dernier système.

Dans le tableau 5, nous avons réuni les principales caractéristiques des 17-CS oxygénés en 11, des quatre principaux 11-désoxy-17-CS et de quelques 3-cétostéroïdes.

La migration des différents 17-CS se fait suivant certaines lois basées essentiellement sur la polarité des groupes fixés sur la molécule. SAVARD (SAVARD, 1953; LEDERER et LEDERER, 1957), le premier, a formulé ces lois empiriques que nous avons confirmées. Elles se résument ainsi:

1. Les céto-stéroïdes en C<sub>21</sub> (fonction oxygénée en C<sub>20</sub>) migrent plus rapidement que les cétostéroïdes en C<sub>19</sub> (fonction oxygénée en C<sub>17</sub>) correspondants. Ceci permet de séparer les 17-CS des 20-CS.

TABLEAU 3.

*Chromatographie sur papier. Système ligroïne-propane, 1, 2-diol.*

Stéroïdes	Abréviations	RA	Couleur Zimmermann	Sensibilité ( $\mu\text{g}$ )
Etiocholane, 3 $\alpha$ , 11 $\beta$ -diol, 17-one . . . . .	11-OHE *	0,027 $\pm$ 0,016	violet	2-3
Androstane, 3 $\alpha$ , 11 $\beta$ -diol, 17-one . . . . .	11-OHA *	0,039 $\pm$ 0,015	bleu-violet	2-3
Etiocholane, 3 $\alpha$ -ol, 11, 17-dione . . . . .	11-COE *	0,097 $\pm$ 0,036	rose	1-2
Androstane, 3 $\alpha$ -ol, 11, 17-dione . . . . .	11-COA *	0,17 $\pm$ 0,04	rose	1-2
Testostérone . . . . .	T	0,22	bleu-ciel	2-3
Epi-testostérone (17 $\alpha$ ) . .	éT	0,32	bleu-ciel	2-3
Déhydroépiandrostérone .	DHA *	0,48 $\pm$ 0,05	violet	5
Etiocholane, 3 $\alpha$ -ol, 17-one	E	0,61 $\pm$ 0,05	violet	5
Androstane, 3 $\beta$ -ol, 17-one	éA	0,61 $\pm$ 0,05	violet	5
Androstane, 17 $\beta$ -ol, 3-one		0,65	bleu	5
Etiocholane, 17 $\beta$ -ol, 3-one		0,72	bleu	5
Androstérone . . . . .	A *	1,00	violet	5

\* Moyennes de 10 à 20 mesures pour des migrations de l'androstérone comprises entre 15 et 37 cm à des températures variant de 15 à 25°.

Le ton de la coloration variant avec la quantité de stéroïde, les couleurs correspondent à environ 5  $\mu\text{g}$  de 11-oxy-17-CS, et à environ 20  $\mu\text{g}$  de 11-désoxy-17-CS.

Exemple:

\* R<sub>A</sub>:  $\Delta^4$ -androstène 3, 17 dione: 1,7  
progesterone: 2,3.

2. Les dérivés de la série androstane (série 5 $\alpha$ ) migrent plus rapidement que les dérivés correspondants de la série étiocholanolone (série 5 $\beta$ ).

Ceci semble également vérifié pour les cétostéroïdes en C<sub>21</sub> étudiés.

Exemple; (cf. Tableau 5)

11-OH-E: 0,027 et 11-OH-A: 0,039  
11-CO-E: 0,097 et 11-CO-A: 0,17  
E : 0,61 et A : 1,00

Exemple:

\* R<sub>A</sub>: Pregnane 3 $\alpha$  ol, 20-one: 1,30  
Allo-pregnane 3 $\alpha$  ol, 20-one: 1,40.

On observe cependant souvent la même vitesse de migration pour les deux séries.

\* Emprunté à SAVARD (1953).

Exemple:

\*  $R_A$ : Etiocholanolone 3,17-dione et androstane 3,17-dione: 2,5  
 Pregnane 3,20-dione et allopregnane 3,20-dione: 3,0.

3. Les 11- $\beta$ -hydroxy migrent plus lentement que les 11-céto correspondants:

Exemple (cf. tableau 5):

$R_A$ : 11-OH-E: 0,027 et 11-CO-E: 0,097  
 11-OH-A: 0,039 et 11-CO-A: 0,17.

4. Les changements de position d'une seule fonction hydroxyle dans toute la molécule suivant le système de configuration  $\alpha$ - $\beta$ , suffit à modifier considérablement la vitesse de migration. L'épimère 3 $\alpha$  (polaire) migre plus vite que l'épimère 3 $\beta$  (équatorial) correspondant. Cette loi est peut-être générale pour toutes les positions  $\alpha$  et  $\beta$ .

Exemple (cf. tableau 5):

$R_A$ : Androstérone (3 $\alpha$ ): 1,00 et épiandrostérone (3 $\beta$ ): 0,61  
 Testostérone (17 $\beta$ ): 0,22 et épitestostérone (17 $\alpha$ ): 0,32

\*  $R_{11-CO E}$ : Androstane 3 $\alpha$ , 11 $\beta$ -diol, 17-one: 0,45  
 Androstane 3 $\beta$ , 11 $\beta$ -diol, 17-one: 0,30.

En résumé, la séquence de mobilité pour des stéroïdes possédant un oxygène dans une position déterminée (particulièrement en 3) est la suivante:

Cétone saturée > cétone  $\alpha$ ,  $\beta$  non saturée > — OH en configuration polaire ( $\alpha$ ) > — OH en configuration équatoriale ( $\beta$ ).

Au point de vue séparation, notons qu'il est impossible de séparer l'étiocholanolone de l'épiandrostérone, aussi bien avec le système ligroïne/propanediol qu'avec le méthylcyclohexane/propanediol. Il en est de même pour l'androstane 17 $\beta$ -ol-3-one et l'étiocholane 17 $\beta$ -ol-3-one. Tous les autres stéroïdes cités dans le tableau 5 se séparent parfaitement sur un unique chromatogramme (ligroïne-propanediol 1,2). Les couleurs obtenues au moyen de la réaction de Zimmermann aident aussi beaucoup à distinguer les différentes taches.

\* Emprunté à BAULIEU et al. (1957).



## SUMMARY

Various factors which affect the development of the Zimmermann coloration in the determination of 17-ketosteroids in urine have been studied experimentally. A method very similar to that of KLENDSHOJ et al. has been used. The molecular extinctions have been determined for various ketosteroids.

The extraction of the 17-ketosteroids from urine has been achieved by butanol extraction of the conjugates as described by JAYLE et al. followed by enzymatic hydrolysis by means of enzymes contained in the digestive juice of *Helix pomatia*.

The various 17-ketosteroids have been identified by paper chromatography according to the method of SAVARD. Various Rf values have been confirmed.

## BIBLIOGRAPHIE

## AUTEURS CITÉS

- ALFSEN, A.: *C. R. Acad. Sciences*, 244 251, 1957.  
ALLEN, W. M.: *J. Clin. Endocrinol.*, 10, 71, 1950.  
BAULIEU, E.-E., S. H. WEINMANN, M. F. JAYLE: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 39, 1372, 1957.  
BITMAN, J., S. L. COHEN: *J. Biol. Chem.*, 191, 351, 1951.  
CHAROLLAIS, E. J.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 37, 299, 1955.  
GUYÉNOT, E., K. PONSE, J. WIETRZYKOWSKA: *C. R. Acad. Sciences*, 194, 1051, 1932.  
HENRY, R., M. THÉVENET: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 34, 886, 1952a.  
—, M. THEVENET, P. JARRIGE: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 34, 897, 1952b.  
JARRIGE, P., R. HENRY: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 34, 872, 1952.  
JAYLE, M.F., E.-E. BAULIEU: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 34, 1200, 1952.  
—, E.-E. BAULIEU, L. GONZALES-FLORES: *Ann. Endoc.*, 14, 642, 1953.  
KLENDSHOJ, N. C., M. FELDSTEIN, A. SPRAGUE: *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 13, 922, 1953.  
LEDERER, E., M. LEDERER: *Chromatography*, 2nd ed., 278-288, 1957.  
PONSE, K.: Meeting of the endocrine Society (Chicago), 1952.  
— *Colloque sur la fonction lutéale*. Masson, éd., Paris, 57-62, 1954b.  
— *Troisième réun. des endocrinologistes de langue franç.* Masson, Paris, 89-138, 1955.  
— *Ann. Endoc.*, 19, 809, 1958.  
SAVARD, K.: *J. Biol. Chem.*, 202, 457, 1953.  
— *Recent Progress in Horm. Res.*, 2, 185, 1954.  
SOBEL, A. E., P. E. SPOERRI: *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 1259, 1941.  
—, P. E. SPOERRI: *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 361, 1942.  
STEINACH, E., H. KUN: *Arch. Ges. Physiol.* (Pflügers), 227, 266, 1931.  
TALBOT, N. B., J. K. RYAN, J. WOLFE: *J. Biol. Chem.*, 138, 593, 1943.  
ZAFFARONI, A.: *Recent Progress in Horm. Res.*, 8, 51, 1953.



## II. ÉLIMINATION DES 17-CÉTOSTÉROÏDES CHEZ LES COBAYES MALES ET FEMELLES DANS LES CONDITIONS NORMALES

---

### ÉTUDE QUALITATIVE DES PRINCIPAUX 17-CS PRÉSENTS DANS LES URINES DE COBAYES MÂLES NORMAUX

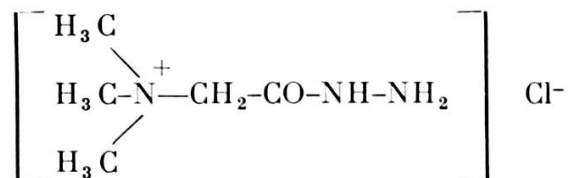
#### A. *Préparation des extraits bruts.*

Six cobayes mâles adultes, de 600 à 700 g ont été placés dans une cage à métabolisme pendant trois nuits consécutives sans nourriture. Les animaux sont nourris normalement pendant le jour. On récolte ainsi 480 ml d'urine traitée suivant les méthodes de fractionnement décrites dans l'article précédent. Le schéma qui suit en précise les modalités.

#### B. *Purification au réactif T de Girard.*

Les fractions A, B et C brutes, ainsi que les résidus bruts sont soumis à une purification au moyen du réactif T de Girard (GIRARD, SANDULESCO, 1936; DOBRINER et al., 1948; BAULIEU et al., 1957.)

Le réactif T de Girard (chlorhydrate de triméthylaminoacétohydrazide)



est utilisé en solution dans l'éthanol absolu à raison de 800 mg de réactif pour 10 ml d'alcool et 1,25 ml d'acide acétique glacial. On dissout le mélange en tiédissant (40°) et on ajoute 2 ml pour chaque fraction brute (3 ml pour la fraction C brute formant une gomme et contenant un peu d'humidité). On laisse séjourner une nuit à l'étuve à 37° afin de transformer les dérivés cétoniques en hydrazones correspondantes. Après ce temps, on ajoute à chaque fraction 10 ml d'eau glacée

et amène rapidement le milieu aux environs de pH 6,5 (tableau 1) au moyen de soude 10%. La solution est extraite trois fois avec chaque fois un volume d'éther afin d'en éliminer toutes les substances non cétoniques peu solubles dans la phase

TABLEAU 1.

*Purification par le réactif de Girard des fractions A, B, C  
et « Résidu A et C ».*

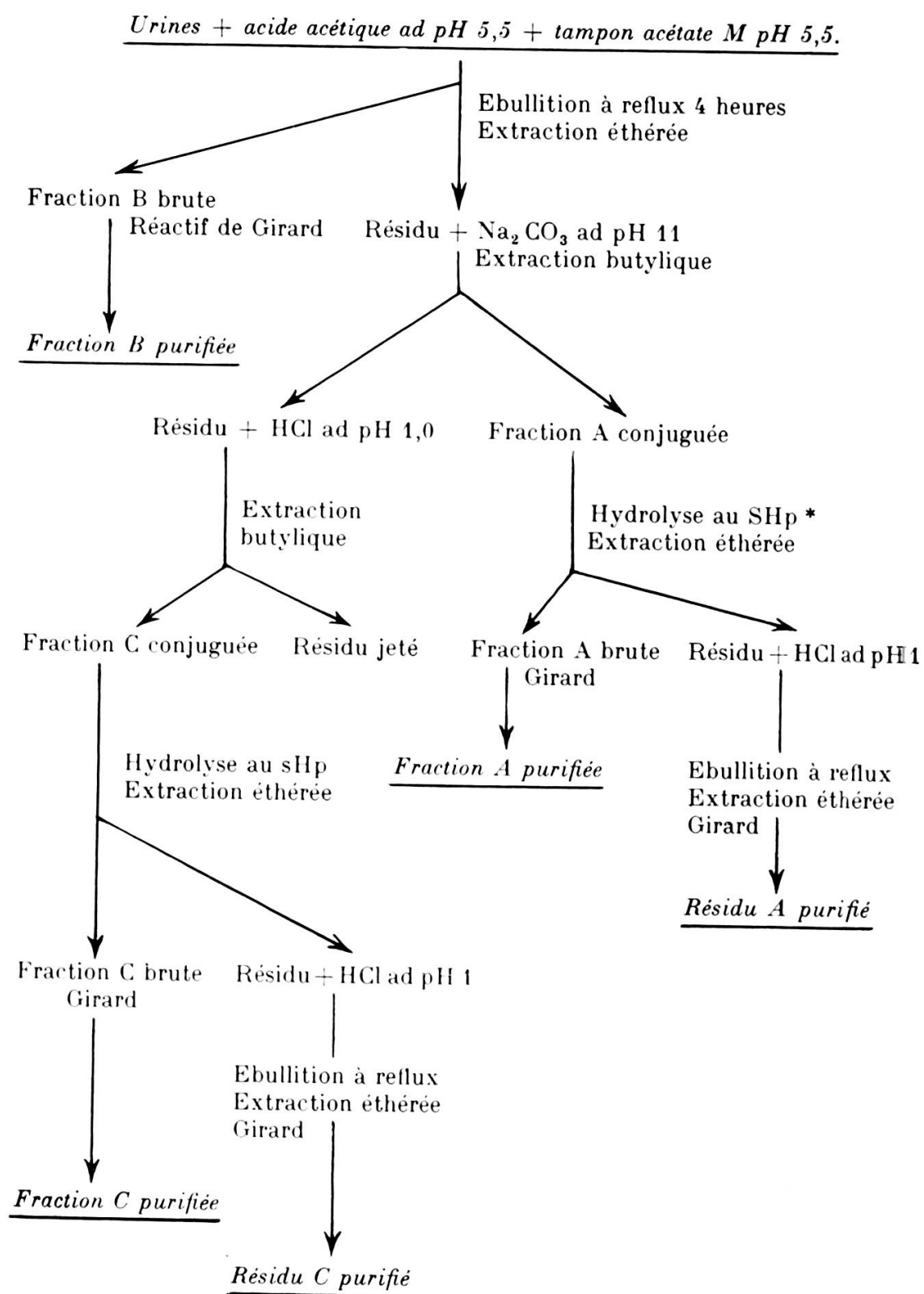
Fractions	pH à l'extraction éthérée	pH d'hydrolyse temp. 20-23°
A	6,5	0,7
B	6,8	0,6
C	6,5	0,6
Résidu A	6,1	0,6
Résidu C	6,3	0,7

aqueuse. Les extraits éthers sont jetés, la phase aqueuse amenée aux environs de pH 1,0 (tableau 1) par addition d'HCl concentré. On laisse ainsi la solution 16 à 24 heures à température ordinaire dans une ampoule à décanter en présence d'un peu d'éther (1 volume) afin d'hydrolyser le dérivé de Girard et d'extraire les 17-CS libérés au fur et à mesure de l'hydrolyse. On extrait encore deux fois par un volume d'éther. Les extraits éthers (3 volumes) sont lavés comme de coutume deux fois avec 5 ml de soude N, deux fois avec 5 ml d'eau. Après décantation et évaporation à sec, on obtient les fractions A, B et C purifiées ainsi que les résidus A et C purifiés.

Nous n'avons pas utilisé la précipitation à la digitonine pour séparer les 3 $\alpha$  et les 3 $\beta$ -hydroxystéroïdes dans chaque fraction, car elle ne marche pas toujours et ne peut être considérée comme démonstrative qu'avec une grande expérience. Aussi avons-nous séparé les différents 17-CS par chromatographie sur papier, ce qui nous a permis (sauf dans un cas) d'identifier ces 17-CS avec certitude.

### C. Chromatographie sur papier.

Nous utilisons le système ligroïne-propanediol 1,2 à 20° pendant 22 heures sur papier Whatman n° 1, conformément aux techniques décrites dans l'article précédent. Cependant, au lieu de déposer un seul « spot », on place la totalité de chaque fraction sur toute la largeur de la bande. Pour les



fractions B et C, les bandes avaient 6 cm de large, pour A 9 cm. Les fractions « résidus A et C » ont été déposées en un seul « spot ». Les éluats de chaque fraction ont été récupérés dans de petits cristallisoirs, évaporés à sec puis rechromatographiés en arrêtant la phase mobile au bas du papier, afin de contrôler l'absence ou la présence de 17-CS plus rapides que l'androstérone. Pour déterminer la position de chaque stéroïde sur les chromatogrammes déposés en bandes larges, on découpe de chaque côté une bandelette de 2 à 3 mm de large que l'on révèle au réactif de Zimmermann. Une fois les positions bien définies, on découpe des bandes transversales correspondant à l'emplacement des 17-CS, on découpe les papiers en petits morceaux et on les extrait longuement dans un appareil à extraction continue (type Soxhlet) avec 10 à 30 ml de méthanol suivant la quantité de papier. On traite de la même façon les zones de papier ne contenant pas de 17-CS, en vue d'un contrôle. Dans ce dernier cas, la totalité de l'extrait est alors déposée sur un seul « spot » à côté des 17-CS de référence.

#### D. *Identification des 17-cétostéroïdes. Résultats.*

Nous avons obtenu (figure 1):

Pour la fraction A purifiée: 5 fractions A1, A2, A3, A4, A5;

Pour la fraction B purifiée: 4 fractions B1, B2, B3, B4;

Pour la fraction C purifiée: 5 fractions C1, C2, C3, C4, C5.

Chaque fraction a été identifiée par rapport au témoin de référence placé en même temps dans la même cuve, ainsi qu'en chromatographiant un mélange d'une prise aliquote de la fraction identifiée avec le stéroïde pur correspondant afin de vérifier qu'il n'y a bien qu'une seule tache.

La nuance de la coloration obtenue avec le réactif de Zimmermann est aussi très utile. De plus, certaines fractions se sont présentées une fois évaporées à sec sous forme cristalline. Ces résultats, ainsi que les quantités approximatives de chaque 17-CS sont consignés dans le tableau 2.

Ce tableau permet de tirer les conclusions suivantes:

1. Les fractions A et C ont bien la même composition, il s'agit d'un équilibre de partage entre le n-butanol et le milieu urinaire à pH-11. Dans la pratique, l'extraction au moyen des colonnes verticales est meilleure, la fraction A renferme 80 à 90% de la totalité des 17-CS conjugués.

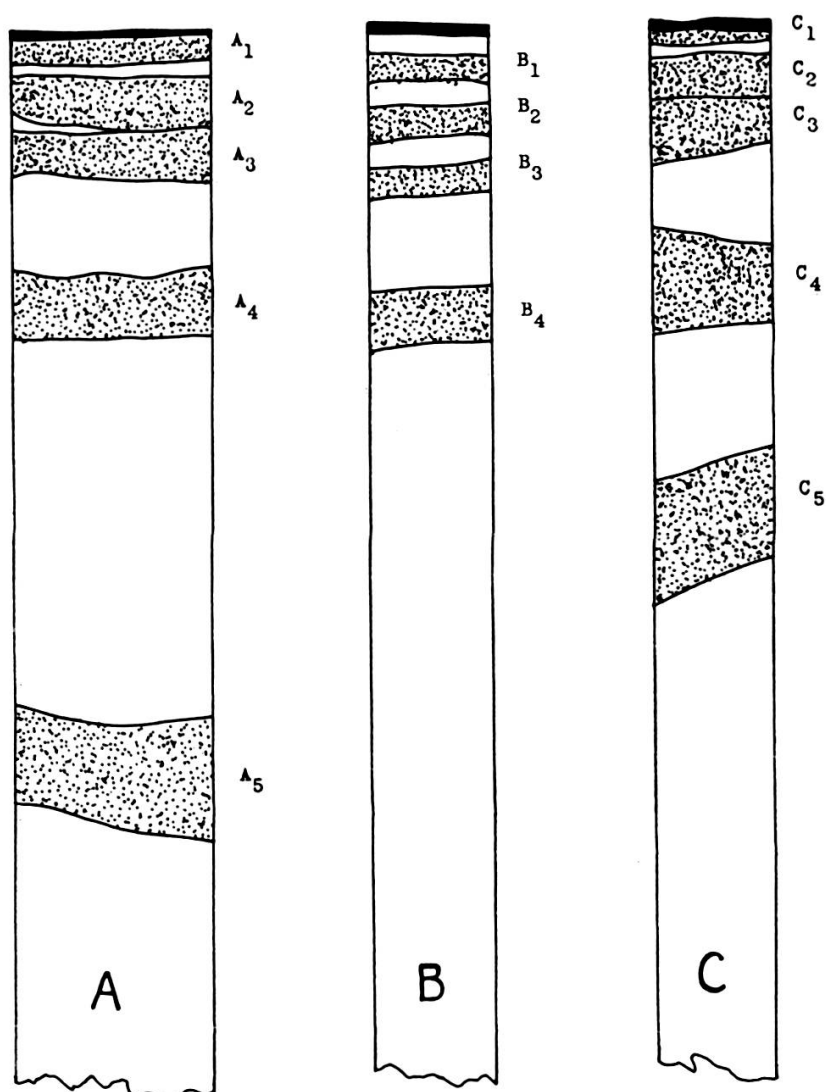


Fig. 1.

Chromatogrammes des principaux 17-céto-stéroïdes présents dans les fractions A, B et C des urines de cobayes.

2. La  $11\beta$ -hydroxy-androstérone se trouve exclusivement dans la fraction B, ce qui tend à montrer une plus grande labilité dans son mode de conjugaison.

Dans ces conditions d'hydrolyse douce (pH 5,5, ébullition à reflux pendant quatre heures), la  $11\beta$ -hydroxy-étiocholanolone n'est pas libérée de sa forme conjuguée, tandis que le cinquième de la  $11$ -céto-étiocholanolone et le tiers de la  $11$ -céto-androstérone sont hydrolysés.

TABLEAU 2.

Frac-tions	Coloration au réactif de Zimmermann	Forme cristalline	Steréoïde identifié	Esti-mation (µg)
A <sub>1</sub>	violet	gomme	11-OHE	500 *
A <sub>2</sub>	rose	»	11-COE	1000
A <sub>3</sub>	rose	petits cristaux plats rectangulaires	11-COA	500
A <sub>4</sub>	jaune-brun	petits cristaux plats rectangulaires	probablement pas un 17-CS	?
A <sub>5</sub>	rose-violet	cristaux trapus et aiguilles	E ou éA	250
B <sub>1</sub>	violet	gomme	11-OHA	500
B <sub>2</sub>	rose	cristaux trapus et aiguilles	11-COE	500
B <sub>3</sub>	rose	faisceaux d'aiguilles	11-COA	500
B <sub>4</sub>	rose	»	?	?
C <sub>1</sub>	violet	gomme	11-OHE	500
C <sub>2</sub>	rose	»	11-COE	1000
C <sub>3</sub>	bleu-violet	»	11-COA	500
C <sub>4</sub>	jaune-brun	Longues aiguilles prismatiques	Id. à A <sub>4</sub>	?
C <sub>5</sub>	rose-violet	aiguilles fines	E ou éA	250

\* Ces chiffres correspondent à 480 ml d'urine.

### 3. La composition totale de l'urine de cobaye mâle est la suivante:

11-céto-étiocholanolone . . . . .	5 parties
11-céto-androstérone . . . . .	3 »
11β-hydroxy-étiocholanolone . . . . .	2 »
11β-hydroxy-androstérone . . . . .	1 »
Etiocholanolone ou épiandrostérone . . . . .	1 »

Pour un même 17-CS, il y a vraisemblablement un équilibre entre la forme 11β-hydroxy et 11-céto, équilibre nettement en faveur de la forme cétonique (2,5 fois plus de forme cétonique pour le dérivé de l'étiocholanolone, 3 fois plus pour celui de l'androstérone). Il faut cependant signaler que ces proportions sont sujettes à d'assez fortes variations, surtout lorsqu'on travaille sur les urines de 24 heures d'un seul animal.

4. Les fractions A5 et C5 peuvent être constituées aussi bien par de l'étiocholanolone que par de l'épiandrosterone, les deux ayant le même Rf. Afin de trancher la question, nous avons effectué une précipitation à la digitonine, l'étiocholanolone étant un  $3\alpha$ -hydroxy-, l'épiandrosterone un  $3\beta$ . Nous avons utilisé la méthode de DOBRINER et CALLOW (DOBRINER et al., 1948; CALLOW, 1950). Malheureusement, nous n'avons pas pu obtenir de résultat net.

En ce qui concerne les éluats des fractions A, B et C, c'est-à-dire les 17-CS migrant plus vite que l'androstérone, on trouve pour la fraction A une tache importante de 30 à 40  $\mu$ g (correspondant à 480 ml d'urine), de Rf = 0,44 (Rf de l'androstérone = 0,11 — 0,12), non identifiée. Rien pour la fraction A. Pour la fraction C, la même tache de Rf = 0,42 beaucoup plus faible (10  $\mu$ g) et une autre de Rf = 0,30 à l'état de trace. Ces 17-CS n'ont pu être identifiés car ils étaient en trop faible quantité.

Les fractions « résidus A et C » montrent que l'hydrolyse enzymatique est pratiquement complète. En effet, on trouve dans ces deux fractions:

Pour « résidu A » environ 100  $\mu$ g de 17-CS oxygénés en 11, 50  $\mu$ g de 17-CS occupant la position de l'étiocholanolone et environ 20  $\mu$ g d'un 17-CS inconnu (Rf = 0,39) déjà trouvé dans les éluats des fractions A et C.

Pour « résidu C », 20 à 30  $\mu$ g de 17-CS-11-oxygénés, environ 30  $\mu$ g de 17-CS occupant la position de l'étiocholanolone et environ 10  $\mu$ g du même 17-CS inconnu (Rf = 0,40).

Toute cette étude a porté sur l'urine de cobaye mâle, qui peut être récoltée à n'importe quelle période, sans qu'on puisse supposer une modification de composition quelconque. Chez la femelle, les variations cycliques rendaient cette étude plus difficile, il était discutable de travailler sur des mélanges d'urine. De nombreuses urines de 24 heures ont été chromatographiées selon le même procédé que celui décrit ci-dessus, sur des prises de 40 à 80  $\mu$ g de 17-CS dosés.

*On observe une identité complète en ce qui concerne les 11-oxy-17-CS entre les urines de mâles et celles de femelles.* La seule différence importante réside dans la zone étiocholanolone/épiandrosterone. On observe toujours une tache à partir des urines de mâles, tandis que les urines de femelles ne contiennent pas toujours ce stéroïde et dans la majorité des cas, il est en quantité extrêmement faible. Nous verrons plus loin l'importance de ce fait concernant la biogenèse possible de l'étiocholanolone ou de l'épiandrosterone.

Notons également que des résultats tout à fait comparables ont été

obtenus par PERON et DORFMAN (1956). Cependant, comme nous utilisons essentiellement l'hydrolyse enzymatique, nous ne retrouvons pas d'artefacts  $\Delta 9$  (11) comme ces auteurs. Plus récemment, STAIB et al. (1959) apportent une confirmation à nos résultats ainsi que des précisions concernant le mode de conjugaison des 17-CS chez le cobaye.

#### CYCLE ŒSTRAL DU COBAYE. ELIMINATION CYCLIQUE DES 17-CS

L'évolution cyclique des androgènes a été mise en évidence chez certaines femmes atteintes d'hirsutisme idiopathique, ainsi que chez le rat femelle normale (KOETS, 1949). Chez ces femmes, chaque ovulation est accompagnée d'une augmentation de l'élimination des 17-CS urinaires. C'est un phénomène semblable que nous avons observé chez le cobaye femelle dans des conditions physiologiques.

##### A. *Résultats quantitatifs.*

Nous avons publié une étude détaillée (CHAROLLAIS et al., 1957) des cycles de quatre cobayes femelles normales. Ces cycles ont été contrôlés au moyen des frottis vaginaux, et dans deux cas, après ces observations nous avons procédé à l'ovariectomie. Les ovaires, coupés en série et colorés se sont révélés parfaitement normaux. Nous rappellerons seulement que chaque œstre est accompagné d'un accroissement caractéristique de l'élimination des 17-CS (fraction A) urinaires. Cette montée est brusque et généralement au bout de 48 heures, le taux moyen normal se trouve rétabli.

Dans le tableau 3, nous avons réuni les valeurs partielles obtenues pour huit femelles normales étudiées au cours d'autres expériences. Ces résultats viennent renforcer les précédents. Ils montrent de plus, que chez des femelles plus âgées (femelle 88: environ 1 kg), le taux d'élimination quotidien de la fraction A est beaucoup plus élevé que chez des femelles de 500 à 550 g, qui n'ont pas encore leur taille définitive.

##### B. *Résultats qualitatifs. Chromatographie sur papier.*

Nous avons étudié de nombreuses femelles à différents moments du cycle, nous n'en présentons que deux dont les diagrammes sont caractéristiques (tableau 3). L'étude des chromatogrammes nous conduit aux constatations suivantes:



TABLEAU 3.

*Elimination des 17-CS du cobaye au début du cycle œstral.*

♀ n°	Durée après l'ouverture vaginale	Fractions µg/24 h.				Chromatographie µg/24 h.				
		A	B	AB	C	11-OHE	11-OHA	11-COE	11-COA	E ou éA
328	48 h.	685	149	—	73					
	72 h.	342	104	—	63					
329	48 h.	602	179	—	167					
	72 h.	313	112	—	174					
379	48 h.	433	160	—	164					
	4 j.	318	75	—	122					
378	48 h.	339	118	—	102					
	72 h.	288	164	—	123					
88	12 à 24 h.	736	138	—	177					
	24 à 48 h.	941	160	—	252					
	48 à 72 h.	899	135	—	264					
	Taux moyen normal	535	—	—	—					
P 13	24 h.	—	—	486	115					
	48 h.	—	—	555	43					
	Taux moyen normal	—	—	170	73					
P 45	24 h.	242	—	—	—	90	0	65	45	40
	48 h.	119	—	—	—	45	0	45	20	0
	Taux moyen normal	133	—	—	—	40	0	60	20	0
P 87	24 h.	370	—	—	—	160	110	50	30	0
	48 h.	222	—	—	—	110	90	40	20	0
	Taux moyen normal	240	—	—	—	110	60	50	20	0
P 129 -S	24 h.	—	—	285	—	125	20	20	40	traces
	48 h.	—	—	111	—	70	15	15	35	0
	3 <sup>e</sup> -4 <sup>e</sup> jours	—	—	143	—	50	0	15	65	0
P 121 -2S reliquat	24 h.	—	—	—	—	5	5	10	5	traces
	48 h.	—	—	—	—	5	5	5	5	»
	72 h.	—	—	—	—	5	5	5	5	«

1. Alors qu'on observe des variations quantitatives en fonction du cycle œstral, la chromatographie sur papier ne révèle pas de variations qualitatives. Les mêmes stéroïdes sont éliminés à peu près dans les mêmes proportions au moment de l'œstre ou en plein diœstre. Seules les quantités absolues varient.

2. Les fractions A ou AB contiennent essentiellement les quatre 11-oxy-17-CS dans les proportions normales, et quelquefois des traces d'étiocolanolone ou épiandrostérone à tous les stades du cycle.

3. On n'observe jamais d'androstérone.

*C. Œstre provoqué chez des femelles castrées ou hypophysectomisées par injection d'œstrone.*

La présence quasi exclusive de 11-oxy-17-CS dans les urines de femelles au moment de l'œstre fait penser immédiatement à une décharge d'origine surrénalienne. Il semble bien que ce soit le cas, car lorsqu'on injecte de l'œstrone à des femelles castrées, on reproduit exactement le même phénomène que celui observé physiologiquement.

Deux femelles castrées (436 et 437) ont été traitées par une injection unique de 20  $\mu$ g d'œstrone (solution huileuse, intramusculaire).

Le tableau 4 montre que 24 heures après l'injection, le taux est nettement plus élevé (+ 79  $\mu$ g chez la femelle 436; + 238 et + 207  $\mu$ g chez la femelle 437 soumise au même traitement à environ dix jours d'intervalle). Après 72 heures, le taux redevient normal. Cette action n'affecte que la fraction A. La chromatographie sur papier des fractions A montre également une composition normale en 11-oxy-17-CS ainsi que de très faibles quantités d'étiocolanolone/épiandrostérone (cf. article suivant: femelles castrées). Il s'agit donc d'une action cortigène des œstrogènes.

Si maintenant, dans les mêmes conditions, nous traitons des femelles hypophysectomisées (femelles 443 et 466) par une même dose d'œstrone (20  $\mu$ g intramusculaire), on n'observe aucune montée des 17-CS urinaires (tableau 4). L'action cortigène des œstrogènes est donc indirecte, c'est-à-dire passe par la voie hypophysaire. L'hypophyse déverse donc de l'ACTH sous l'influence des œstrogènes, la décharge surrénalienne est, en définitive, d'origine hypophysaire. Ces expériences cadrent exactement avec celle de ZONDEK et coll. (1952) relatives aux corticoïdes du cobaye.

On observe, en même temps, un phénomène concernant l'élimination urinaire. L'injection d'œstrone à une femelle castrée bloque systématiquement l'élimination de l'eau pendant environ quarante-huit heures. Ces animaux recevant par leur nourriture le même apport d'eau, en éliminent environ le tiers de la quantité normale. Au contraire, en l'absence d'hypophyse, le métabolisme de l'eau, déjà perturbé, ne subit plus de modifications consécutives à l'injection d'œstrone.

*D. Interprétation et discussion.*

1. Au cours du cycle œstral du cobaye, on assiste à une très forte montée de la fraction A. Des résultats, fournis par la chromatographie sur papier, nous montrent qu'il s'agit essentiellement de 17-CS oxygénés en 11 (11-oxy-androstérone, 11-oxy-étiocholanolone, 11-céto-androstérone, 11-céto-étiocholanolone). La composition de la fraction A ne semble pas varier au cours du cycle. Dans tous les cas étudiés, il n'y a pas d'androstérone.

2. La maximum d'élimination de la fraction A est réalisé dans l'intervalle compris entre vingt-quatre et quarante-huit heures après le début de l'ouverture vaginale, ce qui correspond dans tous les cas où nous avons pu le vérifier au moyen de frottis vaginaux, au moment du plein rut (cellules épithéliales kératinisées éosinophiles et disparition des leucocytes).

3. Si les métabolites dosés dans la fraction A des 17-CS neutres sont une bonne représentation de l'activité androgène de l'animal, nous sommes à même de penser qu'il s'agit bien d'une décharge androgène au moment de l'œstre. Ces androgènes proviennent de la surrénale et peut-être aussi de l'ovaire. La sécrétion de la surrénale l'emporte de beaucoup sur celle de l'ovaire. Quelques faits semblent le montrer:

- a) La présence quasi exclusive de 17-CS oxygénés en 11 renforce l'hypothèse d'une origine avant tout surrénalienne de ces 17-CS chez le cobaye. L'hydroxylation en 11 est en effet une propriété spécifique des systèmes enzymatiques du cortex surrénal.
- b) La castration de cobayes femelles n'entraîne aucun changement immédiat de l'élimination des 17-CS neutres (fraction A).
- c) Une seule injection de 20 µg d'œstrone à une femelle castrée provoque une augmentation de la fraction A dans les vingt-quatre heures qui suivent. Action cortigène bien connue des œstrogènes à dose extra-physiologique, dose qui cependant n'est pas encore suffisante pour entraîner la dégénérescence de surrénales.
- d) D'autre part, ZONDEK (1952) observe une décharge des corticoïdes réducteurs et formaldéhydrogènes au moment du rut ou après injection d'œstrone, de stilbœstrol, ou d'ACTH à des cobayes femelles castrées. Il y a donc bien une activité surrénalienne en relation avec la production d'œstrogènes par l'ovaire.

TABLEAU 4.

*Œstre provoqué chez la femelle castrée ou hypophysectomisée par 20 µg d'œstrone.*

Animal	Durée avant ou après l'injection	Quantité d'urine (24 h.)	17-CS. Fractions en µg/24 heures	
			A	B
♂ 436 +	24 h. avant	144 ml.	279	41
	24 h. après	26 ml.	358	25
	48 h. après	40 ml.	431	29
♂ 437 1 <sup>re</sup> série	24 h. avant	93 ml.	298	33
	24 h. après	30 ml.	536	36
	48 h. après	25 ml.	419	30
♂ 437 2 <sup>e</sup> série	24 h. avant	55 ml.	304	24
	24 h. après	27 ml.	511	23
	48 h. après	22 ml.	338	26
	72 h. après	69 ml.	302	27
♀-H 443	24 h. avant	55 ml.	47	16
	24 h. après	50 ml.	49	16
	48 h. après	58 ml.	45	10
	72 h. après	48 ml.	23	10
♀-H 466	24 h. avant	34 ml.	46	8
	24 h. après	30 ml.	61	16
	48 h. après	54 ml.	38	17
	72 h. après	41 ml.	38	10

- e) Une seule injection de 20 µg d'œstrone à des femelles hypophysectomisées ne provoque aucune élévation des 17-CS urinaires (fraction A). La présence de l'hypophyse est donc indispensable, elle assure l'ACTH nécessaire à la décharge surrénalienne de l'œstre.

#### ETUDE DE GESTATIONS.

##### RÔLE COMBINÉ DES OVAIRES, PLACENTA, SURRÉNALES.

##### A. Animaux utilisés. Résultats quantitatifs.

Cette étude, encore incomplète, a été effectuée sur trois femelles adultes pesant de 800 g à 1 kg, âgées de un à deux ans. Deux d'entre elles étaient multipares, l'autre primipare. Rappelons brièvement que chez le cobaye, l'accouplement et

la fécondation se confondent, puisqu'il n'y a d'ouverture vaginale qu'au moment de l'œstre. Le début de la gestation est donc facile à déterminer à deux ou trois jours près. Nous avons de plus effectué des frottis vaginaux afin de nous assurer, par la présence de spermatozoïdes, qu'il y avait bien eu accouplement. C'est à partir du moment où l'on observe des spermatozoïdes que nous avons, arbitrairement d'ailleurs, fixé le début de la gestation. Comme nous n'avons pas voulu sacrifier les petits, en les séparant de la mère, nous n'avons pas étudié ce qui se passe au point de vue métabolites urinaires après la mise-bas.

Le test utilisé comme contrôle de la bonne marche de la gestation est la courbe de poids. Elle ne permet cependant pas de dire grand chose avant la quatrième à cinquième semaine. La naissance à terme (67 jours) de petits normaux est un critère suffisant pour affirmer que le développement des embryons s'est effectué normalement, que les rapports hormonaux ont été corrects.

Voici encore quelques précisions sur ces trois femelles:

Les femelles 140 et P30 étaient multipares, la femelle 88 primipare. Elles pesaient de 810 à 1010 g au début et 1060 g à 1260 g (augmentation de 200 à 280 g à la fin d'une gestation de 65 à 67 jours (65 jours pour la femelle P30)). Elles ont donné naissance chacune à quatre petits pesant de 75 à 105 grammes.

Du point de vue quantitatif (figure 2), on voit que seule la fraction A (ou AB également dosée pour la femelle P30) présente des variations significatives. Les fractions B et C fournissent des résultats sans intérêt. Le fait essentiel est l'augmentation du taux des 17-CS urinaires en fin de gestation. C'est ainsi que chez la femelle 140, la fraction A passe de 435  $\mu\text{g}/24$  heures à 1776  $\mu\text{g}/24$  heures (augmentation de 4,1 fois), chez la femelle 88 de 535 à 1221  $\mu\text{g}/24$  heures (augmentation de 2,3 fois), enfin chez la femelle P30, le taux passe de 314 à 732  $\mu\text{g}/24$  heures (augmentation de 2,3 fois). Ceci est donc un phénomène constant qu'on peut admettre comme définitif. Moins constante est la courbe générale d'élimination en fonction de la durée de gestation. Examinons chaque animal de façon à trouver les points communs.

*Femelle 140.* — L'élimination des 17-CS (fraction A) se maintient à peu près constante pendant les premières quatre semaines, puis augmente brusquement. Il y a un plateau entre la sixième et la huitième semaine (probablement sans signification), puis la montée continue pour atteindre plus de 1700  $\mu\text{g}/24$  heures quatre jours avant la mise-bas.

*Femelle 88.* — Après avoir observé un rut, avec sa montée caractéristique des 17-CS, quelques heures avant la fécondation, l'élimination subit des fluctuations pendant les six premières semaines, puis la montée se dessine sans interruption pour atteindre plus de 1200  $\mu\text{g}/24$  heures cinq jours avant la mise-bas.

*Femelle P30.* — Ici encore, on observe des variations dans l'élimination des 17-CS pendant les cinq premières semaines avant qu'une montée nette se dessine. Le taux dépasse 700  $\mu\text{g}/24$  heures une semaine avant la mise-bas.

On peut également souligner les points suivants:

Les trois femelles n'ont pas le même âge, ce qui entraîne certainement des variations individuelles très marquées. De plus, deux femelles sont multipares et l'autre primipare. Ceci n'est toutefois pas suffisant pour expliquer toutes les différences observées d'une façon satisfaisante.

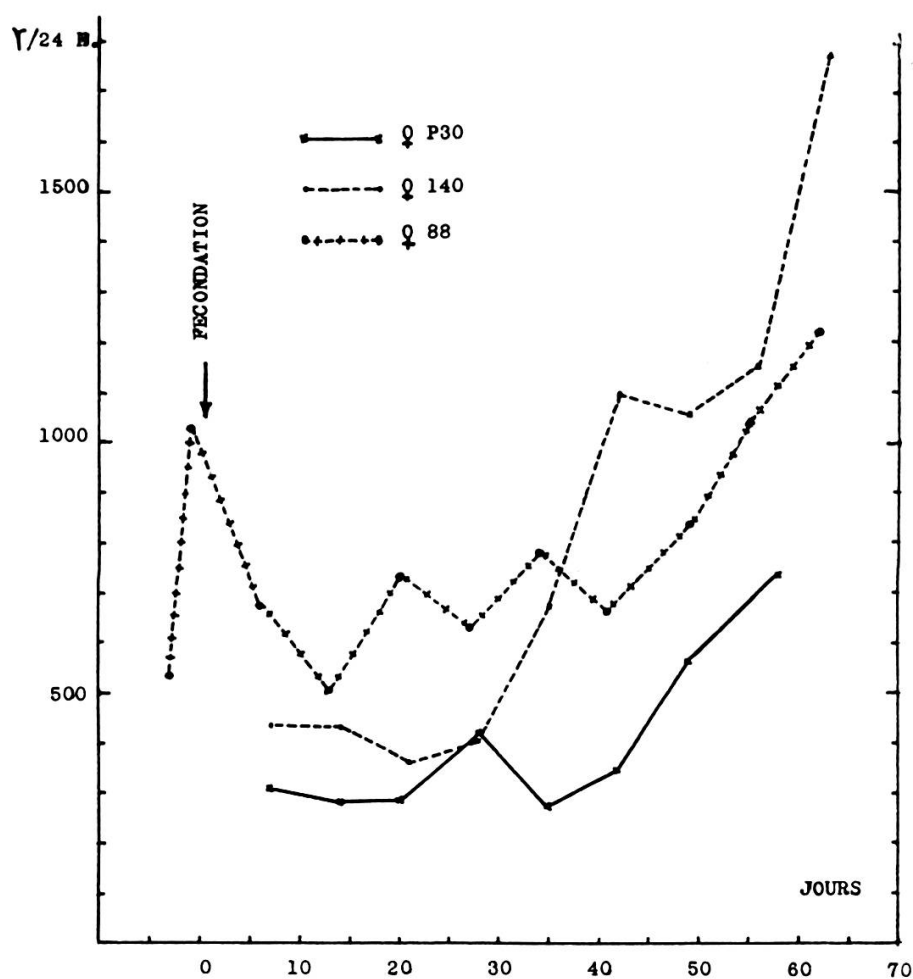


Fig. 2.

Elimination des 17-céto-stéroïdes au cours de la gestation.

#### B. Résultats qualitatifs. Chromatographie sur papier.

Il est important de savoir si la montée observée en fin de gestation était due à un ou plusieurs 17-CS absents chez la femelle normale, ou s'il ne s'agissait que d'une augmentation de ceux qui sont déjà présents.

Malheureusement, les techniques de chromatographie sur papier n'étaient pas encore au point lorsque nous avons étudié les deux premières femelles. Seuls les 17-CS de la femelle P30 ont pu être analysés régulièrement par chromatographie sur papier.

Chaque urine de vingt-quatre heures a été étudiée selon les techniques permettant d'extraire les fractions A et AB analysées par chromatographie sur papier (tableau 5). En voici les résultats essentiels:

TABLEAU 5.

*Elimination des différents 17-CS au cours de la gestation.*

Femelle P30.

Dates: (semaines)	1 <sup>re</sup>		2 <sup>o</sup>		3 <sup>e</sup>		4 <sup>e</sup>		5 <sup>e</sup>		6 <sup>e</sup>		7 <sup>e</sup>		8 <sup>e</sup>	
Fractions: $\mu\text{g}/24 \text{ h.}$	A	AB	A	AB	A	AB	A	AB	A	AB	A	AB	A	AB	A	AB
<b>Steroïdes</b>																
11-OHE . . .	140	120	140	170	150	120	190	160	130	110	170	170	250	195	425	200
11-OHA . . .	25	60	25	60	50	30	0	80	0	55	0	tr.	0	0	0	0
11-COE . . .	50	120	50	120	50	90	130	80	90	85	170	tr.	170	130	170	160
11-COA . . .	25	30	25	60	25	30	30	40	20	30	tr.	170	40	35	40	25
E ou éA . . .	tr.	45	tr.	0	35	45	45	60	30	70	0	0	85	65	85	50
Somme . . .	240	375	240	410	310	315	395	420	270	350	340	340	545	425	720	435
Quantité dosée par Zimmermann	314	384	283	476	285	394	427	471	271	386	348	399	564	512	732	471

1. Les étiocholanolones oxygénés en 11, ainsi que l'étiocholanolone ou épianrostérone semblent les seuls 17-CS affectés au cours de la gestation.

2. La montée générale observée quantitativement est le reflet d'une augmentation de la 11 $\beta$ -hydroxy-étiocholanolone et de la 11-céto-étiocholanolone. En effet, la première passe d'environ 150  $\mu\text{g}/24$  heures à 425  $\mu\text{g}/24$  heures, tandis que la seconde d'environ 50 à 170  $\mu\text{g}/24$  heures.

3. La prédominance des étiocholanes sur les androstanes s'affirme au cours de la gestation.

4. Enfin, il semble que l'étiocholanolone ou épianrostérone soit éliminée en quantité plus importante en fin de gestation.

Tout ceci ne concerne qu'un seul cas, et l'on ne saurait généraliser ces données.

### C. *Interprétation et discussion.*

On peut insister sur quatre points importants concernant l'élimination des 17-CS au cours de la gestation chez le cobaye.

1. Les 17-CS urinaires présentent une augmentation caractéristique qui se manifeste entre la cinquième et la septième semaine de gestation. Ce phénomène ne semble pas se produire à un moment très défini de la gesta-



tion. C'est pourquoi il est difficile de le rattacher d'une façon même approximative au placenta, aux surrénales ou aux ovaires.

2. Cette augmentation des 17-CS urinaires n'est pas due à un 17-CS absent dans l'urine de la femelle normale, mais à une plus forte élimination des 17-CS déjà présents dans l'urine normale.

3. Rien jusqu'à présent ne permet de tirer une conclusion quant à la provenance de ces 17-CS. Trois organes sont en jeu: l'ovaire de gestation qui n'est plus un ovaire normal, la surrénale qui subit également des modifications, enfin le placenta, siège d'un métabolisme très actif, spécialement du point de vue stéroïde et gonadotrope. Des expériences de castration de femelles gestantes permettraient peut-être d'apporter quelques précisions dans ce domaine, car on sait d'ores et déjà qu'il est possible de castrer un cobaye femelle dès le trente et unième jour de gestation sans pour autant l'interrompre. On peut donc penser que les 17-CS en excès dès la cinquième semaine de gestation proviennent avant tout soit du placenta, soit des surrénales.

4. La perturbation observée dans l'allure générale du diagramme d'élimination des 11-oxy-17-CS (chromatographie) en fin de gestation présente quelques analogies avec les observations faites sur des animaux traités par des stéroïdes du type cortisone, c'est-à-dire des hormones essentiellement surrénaliennes.

Ce travail est encore beaucoup trop rudimentaire pour qu'on puisse en dire davantage. Seule l'expérimentation permettra d'avancer dans la connaissance de la biosynthèse et du catabolisme des stéroïdes du type hormones mâles chez la femelle gestante.



## SUMMARY

The main 17-ketosteroids present in guinea pig urine have been identified and assayed.

In male urine the composition is as follows:

11-ketoetiocholanolone . . . . .	5 parts
11-ketoandrosterone . . . . .	3 »
11-oxyetiocholanolone . . . . .	2 »
11-oxyandrosterone . . . . .	1 »
Etiocholanolone or epiandrosterone . . . . .	1 »

In the female, the elimination of urinary 17-ketosteroids shows cyclic variations with a maximum during estrus, but without modification in the composition. There is strong evidence in favor of the essentially adrenal origin of the 17-ketosteroids found in the normal female.

As of the 5<sup>th</sup> or 7<sup>th</sup> week, gestation is accompanied by an increase in 17-ketosteroids.

## BIBLIOGRAPHIE

## AUTEURS CITÉS

- BAULIEU, E.-E., S. H. WEINMANN, M.-F. JAYLE: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, 1371, 1957.
- CALLOW, R. K. in Emmens: *Hormone Assay*. Acad. Press Inc., N.Y., 376, 1950.
- CHAROLLAIS, E.-J., K. PONSE, M.-F. JAYLE: *Ann. Endoc.*, **18**, 109, 1957.
- DOBRINER, K., S. LIBERMAN, C. P. RHOADS: *J. Biol. Chem.*, **172**, 241, 1948.
- GIRARD, A., G. SANDULESCO: *Helv. Chim. A.*, **19**, 1095, 1936.
- KOETS, P.: *J. Clin. Endoc.*, **9**, 795, 1949.
- PERON, F. G., R. I. DORFMAN: *J. Biol. Chem.*, **223**, 877, 1956.
- STAIB, W., W. TELLER, W. SCHMIDT: *Experientia*, **XV**, 188, 1959.
- ZONDEK, B., S. BURSTEIN: *Endocrinology*, **50**, 419, 1952.

### III. MÉTABOLISME DES ANDROGÈNES CHEZ LE COBAYE NORMAL ET TRAITÉ PAR LES GONADOTROPINES CHORIONIQUES

---

BRÈVE ÉTUDE DU MÉTABOLISME PARTIEL SUR MÂLES NORMAUX  
ET SURRENALECTOMISÉS  
ÉTUDES QUANTITATIVE ET QUALITATIVE

#### A. *Méthodes.*

Dans le but d'essayer d'établir les liens qui existent entre les 17-CS trouvés dans les urines et leurs précurseurs, nous avons procédé, par analogie avec ce qui se passe chez l'homme, à l'administration de certains stéroïdes qui sont éventuellement des précurseurs immédiats des 17-CS urinaires ou qui peuvent se trouver dans l'organisme du cobaye normal. Disons immédiatement qu'il s'agit de processus extra-physiologiques, puisque les doses administrées sont très élevées. Dans ces conditions, le sexe de l'animal importe peu. Aussi avons-nous utilisé des mâles pour des raisons de commodité (absence d'élimination cyclique des 17-CS). L'étude au moyen d'animaux surrénalectomisés est encore plus démonstrative, car n'ayant pratiquement plus de 17-CS urinaires, la totalité de ceux qui apparaîtront dans l'urine proviendra de l'injection effectuée.

Nous avons procédé de la façon suivante:

Les urines de cobayes mâles normaux ou surrénalectomisés sont prélevées durant les 24 heures qui précèdent l'injection d'une dose unique de 20 mg du stéroïde étudié, par voie intramusculaire.

On récupère l'urine pendant deux fois 24 heures après l'injection. Après 48 heures, le taux est redevenu normal. Les 17-CS excrétés sont dosés et étudiés qualitativement par chromatographie sur papier. Les chromatographies sont effectuées selon la technique précédemment décrite. Les taches les plus importantes sont identifiées avec certitude en chromatographiant l'un à côté de l'autre l'extrait urinaire et ce même extrait additionné d'un peu du 17-CS présumé

(5 à 20  $\mu$ g suivant les cas). On double ainsi l'importance d'une tache et s'assure de l'identité avec les 17-CS présents.

De plus, les solutions qui s'écoulent des papiers sont récupérées dans de petits cristallisoirs, évaporées à sec puis rechromatographiées en arrêtant le solvant au bas du papier. On constate ainsi qu'il n'y a pas, dans les différents cas étudiés, de 17-CS migrant plus vite que l'androsterone. Nous avons également dosé l'acide glucuronique conjugué afin d'avoir une idée sur le mode de conjugaison des 17-CS éliminés à la suite de ces injections.

Quelques semaines après ce traitement, le même animal peut être utilisé pour d'autres injections du même type.

Notons enfin que les stéroïdes ont été injectés en solution dans l'huile de sésame ou d'olive stérile ou dans le propylène-glycol pour la cortisone (2 à 3 ml de solvant pour 20 mg de stéroïde).

### B. Résultats.

#### a) Testostérone (tableau 1).

Quantitativement, après injection intramusculaire de 20 mg de testostérone à des cobayes adultes normaux ou surrénalectomisés, on observe une augmentation

TABLEAU 1.  
*Injection de Testostérone (20 mg). Résultats quantitatifs.*

	Fractions ( $\mu g/24$ h.)				Micro-équivalents ac. glucuronique conjugué
	A	B	AB	C	
<i>Mâle 101</i>					
2 jours avant injection	430 $\pm$ 20	130 $\pm$ 4		415 $\pm$ 54	
1 jour avant injection	478 $\pm$ 45	130 $\pm$ 6		422 $\pm$ 94	
24 heures après injection	1213 $\pm$ 126	245 $\pm$ 0		369 $\pm$ 35	
48 heures après injection	375 $\pm$ 12	144 $\pm$ 23		290 $\pm$ 38	
<i>Mâle 106</i>					
5 jours avant injection	272	137	—	—	1,44
1 jour avant injection	354	58	—	238	2,07
24 heures après injection	1070	380	—	324	3,88
48 heures après injection	396	50	—	—	1,81
<i>Mâle 14-2S</i>					
1 jour avant injection	—	—	0	—	—
24 heures après injection	—	—	630	—	2,52

*Résultats qualitatifs. Chromatographie sur papier, fraction A ( $\mu\text{g}/24\text{ h.}$ ).*

	Avant injection	24 h. après *	48 h. après
<i>Mâle 106</i>			
11-OHE . . . . .	66	437	132
11-OHA . . . . .	0	0	0
11-COE . . . . .	78	101	44
11-COA . . . . .	33	0	44
X ( $R_a = 0,12-0,18$ ) .	66	269	0
DHA . . . . .	0	0	0
E ou éA . . . . .	78	404	88
<i>Mâle 14-2S</i>			
11-OHE . . . . .	5	119	30
11-OHA . . . . .	0	0	0
11-COE . . . . .	0	0	0
11-COA . . . . .	0	0	0
X ( $R_a = 0,12-0,18$ ) .	0	75	10
DHA . . . . .	0	0	0
E ou éA . . . . .	10	496	60

\* Moyennes de 3 ou 4 chromatogrammes.

exclusive de la fraction A ou AB, les fractions B et C subissent des variations peu importantes. Sur trois animaux (mâles 101, 106 et 14-2S) ainsi étudiés, l'augmentation observée est de 2,7 à 3,4 fois le taux normal; en valeur absolue, elle atteint 630 à 757  $\mu\text{g}$ , vingt-quatre heures après l'injection. L'augmentation de l'acide glucuronique conjugué est d'environ 1,7 à 2,1 microéquivalents.

Dans le cas du mâle 106, l'augmentation des 17-CS, métabolites de la testostérone est de 757  $\mu\text{g}$ , soit 2,6 microéquivalents exprimés en 17-CS ayant le poids moléculaire de l'androstérone (290,4). L'acide glucuronique conjugué représente une augmentation de 2,1 microéquivalents soit 80,7% de glucuroconjugaison. De même, pour le mâle 14 surrénalectomisé, où le taux moyen d'acide glucuronique conjugué est d'environ 0,80 microéquivalents, on calcule que le taux de glucuroconjugaison est de 80,9%.

Si on examine maintenant les 17-CS urinaires éliminés du point de vue qualitatif, on constate que l'augmentation porte avant tout sur la 11-oxyétiocholanolone, ainsi que sur la zone étiocholanolone-épiandrostérone. On n'observe pas de formation de déhydroépiandrostérone, ni d'androstérone. L'hydrogénation de la double liaison en position 4-5 conduit essentiellement à la série de l'étiocholane chez le cobaye.

On observe de plus un stéroïde non identifié donnant une coloration bleue au réactif de Zimmermann, dont le  $R_f$  par rapport à l'androstérone est de 0,12 à 0,18. Il ne s'agit ni de la testostérone, ni de l'épitestostérone, ni des deux dérivés andro-

stane et étiocholane résultant de la réduction de la double liaison en 4-5. (3-céto, 17- $\beta$ -hydroxyétiocholane et 3-céto, 17- $\beta$ -hydroxyandrostane).

b) *Androstérone* (tableau 2).

Les injections d'androstérone ont été effectuées sur deux mâles adultes normaux et un mâle surrénalectomisé. On note avant tout une augmentation considérable de la fraction A ou AB, alors que les autres fractions ne sont pas touchées. Chez les deux mâles normaux, l'augmentation relative est de 4,5 et 8,2 fois le taux normal (discordance des résultats). En valeur absolue, l'élévation des 17-CS est de 965  $\mu$ g et 3296  $\mu$ g au cours des vingt-quatre heures qui suivent l'injection. Chez le mâle surrénalectomisé, l'augmentation est intermédiaire, soit 1815  $\mu$ g.

L'acide glucuronique conjugué présente une montée de 4,5 et 4,56 micro-équivalents chez le mâle normal et le mâle surrénalectomisé, ce qui représente 39,8% de glucuroconjugaison chez le premier et 73% chez le second.

Au point de vue qualitatif, on observe tout d'abord que l'androstérone administrée ne se retrouve intacte que pour une faible part: 585  $\mu$ g chez le mâle 12, 335  $\mu$ g chez le mâle 18 surrénalectomisé. Les principaux métabolites sont les 11-oxyétiocholanolone et androstérone, et l'étiocholanolone ou épiandrostérone.

TABLEAU 2.

*Injection d'Androstérone (20 mg). Résultats quantitatifs.*

	Fractions ( $\mu g/24$ h.)				Micro-équivalents ac. glucuronique conjugué
	A	B	AB	C	
<i>Mâle 100</i>					
3 jours avant injection	260 $\pm$ 22	180 $\pm$ 7	—	88	—
2 jours avant injection	237 $\pm$ 12	92 $\pm$ 4	—	55	—
1 jour avant injection	322	94 $\pm$ 2	—	—	—
24 heures après injection	1238 $\pm$ 198	144 $\pm$ 0	—	49	—
48 heures après injection	335 $\pm$ 19	96 $\pm$ 0	—	44	—
72 heures après injection	312 $\pm$ 21	83 $\pm$ 2	—	72	—
<i>Mâle 12</i>					
1 jour avant injection	440	—	462	—	2,22
24 heures après injection	3595	166	3900	—	6,7
48 heures après injection	539	—	624	—	1,96
<i>Mâle 18-2S</i>					
1 jour avant injection	0	0	0	—	—
24 heures après injection	—	—	1815	—	5,36

*Résultats qualitatifs. Chromatographie sur papier, fraction AB ( $\mu\text{g}/24\text{ h.}$ ).*

	Avant injection	24 h. après *	48 h. après
<i>Mâle 12</i>			
11-OHE . . . . .	165	585	160
11-OHA . . . . .	55	200	20
11-COE . . . . .	55	50	20
11-COA . . . . .	30	0	0
DHA . . . . .	0	0	0
E ou éA . . . . .	55	2475	210
A . . . . .	0	585	10
<i>Mâle 18-2S</i>			
11-OHE . . . . .	traces	235	15
11-OHA . . . . .	0	60	0
11-COE . . . . .	traces	0	traces
11-COA . . . . .	0	0	0
DHA . . . . .	0	0	0
E ou éA . . . . .	10	1350	110
A . . . . .	0	335	40

\* Moyenne de 2 chromatogrammes.

L'androstérone injectée subit une épimérisation soit du groupe OH en position 3, soit de l'H en position 5. Cette dernière modification est en tout cas certaine puisqu'on arrive par hydroxylation à la 11- $\beta$ -hydroxy-étiocholanolone. Aussi bien dans la série des 11-oxy que dans celle des 11-désoxy, il semble y avoir un rapport de 3 à 4 entre la série de l'étiocholane et celle de l'androstane, rapport en faveur des étiocholanes.

c) *Déhydroépiandrostérone* (tableau 3).

La déhydroépiandrostérone a été administrée à trois mâles adultes normaux (mâles 103, 12 et 13). On observe une montée importante des fractions A et B. En ce qui concerne la fraction A, l'augmentation atteint 3,4 à 5,4 fois le taux normal. L'augmentation relative de la fraction B est moins intéressante, car elle peut être considérable si le taux normal de la fraction B est faible, ce qui arrive assez fréquemment (dégradation de certains 17-CS par chauffage prolongé). Elle peut atteindre 53 fois le taux initial chez le mâle 12, mais seulement 5,2 et 6,8 fois chez les deux autres. L'augmentation absolue est plus significative. On peut dire qu'elle affecte également les fractions A et B:

Mâle 103: augmentation de A: 1393  $\mu\text{g}$ , de B: 1149  $\mu\text{g}$ ;  
 Mâle 12: augmentation de A: 1743  $\mu\text{g}$ , de B: 1717  $\mu\text{g}$ ;  
 Mâle 13: augmentation de A: 920  $\mu\text{g}$ , de B: 507  $\mu\text{g}$ .

Le pourcentage de glucuroconjugaison est faible. Il atteint 35,5% chez le mâle 12, 59,2% chez le mâle 13. Il est vraisemblable que cette glucuroconjugaison d'environ 50% traduit un autre mode de conjugaison de la déhydroépiandrostérone non transformée par le cobaye (fraction B en partie). Il est possible qu'il s'agisse de sulfoconjugaison comme chez l'homme.

Au point de vue qualitatif, si l'on fait une moyenne entre les deux animaux observés (mâles 12 et 13), on constate que l'élimination porte avant tout sur la déhydroépiandrostérone non transformée et l'étiocholanolone/épiandrostérone. On peut dire qu'en moyenne il y a 50% de chaque. Il y a donc essentiellement hydrogénation de la double liaison, avec ou sans épimérisation en position 3. On note également une augmentation de la 11- $\beta$ -hydroxyétiocholanolone qui atteint trois à quatre fois le taux normal. Ici encore, les processus de 11- $\beta$ -hydroxylation se révèlent être très importants.

d) *Epiandrostérone* (tableau 4).

20 mg d'épiandrostérone ont été injectés à un mâle adulte (mâle 12). Au cours des vingt-quatre heures qui suivent, on observe une augmentation importante de la fraction A ou AB (11 à 12 fois le taux normal). En valeur absolue, l'éleva-

TABLEAU 3.

*Injection de Déhydro-épiandrostérone (20 mg). Résultats quantitatifs.*

	Fractions ( $\mu\text{g}/24 \text{ h}$ )				Micro-équivalents ac. glucu- ronique conjugué
	A	B	AB	C	
<i>Mâle 103</i>					
2 jours avant injection	582 $\pm$ 6	188 $\pm$ 3	—	324 $\pm$ 8	—
1 jour avant injection	569 $\pm$ 31	362 $\pm$ 48	—	288 $\pm$ 25	—
24 heures après injection	1968 $\pm$ 28	1424 $\pm$ 7	—	634 $\pm$ 10	—
48 heures après injection	770 $\pm$ 11	203 $\pm$ 7	—	727 $\pm$ 44	—
<i>Mâle 12</i>					
avant injection . . . .	397	(33)	420	—	2,08
24 heures après injection	2140	1750	3640	—	5,96
<i>Mâle 13</i>					
1 jour avant injection	268	(88)	356	—	1,1
24 heures après injection	1188	595	1790	—	4,0
48 heures après injection	560	(53)	613	—	2,78

Les chiffres ( ) indiquent des valeurs calculées.



*Résultats qualitatifs. Chromatographie sur papier, fraction AB ( $\mu\text{g}/24 \text{ h.}$ ).*

	Avant injection	24 h. après *	48 h. après
<i>Mâle 12</i>			
11-OHE . . . . .	165	620	—
11-OHA . . . . .	55	60	—
11-COE . . . . .	55	60	—
11-COA . . . . .	30	60	—
DHA . . . . .	0	1540	—
E ou éA . . . . .	55	930	—
A . . . . .	0	0	—
<i>Mâle 13</i>			
11-OHE . . . . .	90	220	110
11-OHA . . . . .	0	100	0
11-COE . . . . .	60	100	55
11-COA . . . . .	30	25	traces
DHA . . . . .	0	430	0
E ou éA . . . . .	90	1005	430
A . . . . .	0	0	0

\* Moyenne de 2 mesures.

tion de la fraction A est de 3786  $\mu\text{g}$ , celle de la fraction AB 3904  $\mu\text{g}$ . En considérant l'augmentation de l'acide glucuronique conjugué, on peut dire que 26,8% des métabolites de l'épiandrostérone sont glucuroconjugués. Ici encore, comme pour la déhydroépiandrostérone, nous sommes amenés à envisager un autre type de conjugaison des métabolites de l'épiandrostérone. Il s'agit peut-être de sulfo-conjugaison comme chez l'homme (JAYLE et al., 1956).

TABLEAU 4.

*Injection d'épiandrostérone (20 mg). Mâle 12. Résultats quantitatifs.*

	Fractions ( $\mu\text{g}/24 \text{ h.}$ )			Micro-équivalents ac. glucu- ronique conjugué
	A	B	AB	
1 jour avant injection .	354	(52)	406	1,95
24 heures après injection	4140	125	4310	5,54
48 heures après injection	485	(21)	506	1,23

Les chiffres ( ) indiquent des valeurs calculées.

Résultats qualitatifs. Chromatographie sur papier, fraction AB ( $\mu\text{g}/24 \text{ h.}$ ).

	Avant injection	24 h. après *	48 h. après *
11-OHE . . . . .	170	275	85
11-OHA . . . . .	50	0	10
11-COE . . . . .	100	110	40
11-COA . . . . .	20	0	20
DHA . . . . .	0	0	0
E ou éA . . . . .	120	3000	340
A . . . . .	0	275	25

\* Moyenne de 2 chromatogrammes.

Qualitativement, on peut dire que l'augmentation porte avant tout sur les 17-CS de la zone étiocolanolone/épiandrostérone et sur l'androstérone. Il s'agit selon toute vraisemblance d'épiandrostérone non transformée (un peu moins de 3000  $\mu\text{g}$ ) et d'un faible pourcentage transformé en androstérone par épimérisation en position 3. Notons enfin que la 11- $\beta$ -hydroxyandrostérone subit une légère augmentation.

e) *Cortisone* (tableau 5).

Deux mâles adultes (mâles 102 et 13) ont reçu chacun 20 mg de cortisone. Après vingt-quatre heures, on observe une élévation importante des 17-CS urinaires de la fraction A ou AB, tandis que la fraction B ne varie guère et la fraction C faiblement. Ici encore, la fraction A ou AB est la seule intéressante. Chez ces deux animaux, l'augmentation relative est de 3,4 à 3,9 fois le taux normal. En valeur absolue, l'excédent est de 782  $\mu\text{g}$  pour le mâle 102 (fraction A) et de 1097  $\mu\text{g}$  chez le mâle 13 (fraction AB).

Afin d'estimer le pourcentage apparent de glucuroconjugaison, nous avons exprimé l'excédent des 17-CS en microéquivalents de 11- $\beta$ -hydroxyétiocolanolone (poids moléculaire = 306,4), ce qui correspond bien à la réalité, car nous le verrons plus loin, la plupart des 17-CS éliminés dans ce cas sont les 11-oxy-17-CS. La glucuroconjugaison est faible (23,4%), d'autant plus que ce pourcentage est un maximum, étant donné que l'extrait dosé contient également des métabolites glucuroconjugués moins dégradés de la cortisone, conservant leur chaîne latérale en position 17 (C20 et C21). En ce qui concerne le mode de conjugaison des 11-oxy-17-CS, nous ne savons que peu de chose. On peut cependant affirmer qu'ils ne sont pas sous forme libre car l'extraction étherée de l'urine ne fournit que des traces de 11-oxy-17-CS.

Qualitativement, les 17-CS métabolites de la cortisone sont essentiellement oxygénés en 11. Les stéroïdes de la série de l'étiocolane dominant (11- $\beta$ -hydroxy et 11-céto-étiocolanolone). En plus faible quantité, nous trouvons les androstanes représentés par la 11- $\beta$ -hydroxy et 11-cétoandrostérone. Les processus de 11- $\beta$ -hydroxylation semblent irréversibles car l'animal n'élimine ni étiocolanolone ni androstérone.

TABLEAU 5.

*Injection de Cortisone (20 mg). Résultats quantitatifs.*

	Fractions ( $\mu\text{g}/24 \text{ h}$ )				Micro-équivalents ac. glucu- ronique conjugué
	A	B	AB	C	
<i>Mâle 102</i>					
2 jours avant injection	351 $\pm$ 13	76	—	105 $\pm$ 5	—
1 jour avant injection	312 $\pm$ 9	100 $\pm$ 1	—	130 $\pm$ 18	—
24 heures après injection	1113 $\pm$ 3	178 $\pm$ 11	—	260 $\pm$ 9	—
48 heures après injection	273 $\pm$ 1	60 $\pm$ 7	—	78 $\pm$ 1	—
<i>Mâle 13</i>					
1 jour avant injection	—	—	378	—	1,79
24 heures après injection	—	—	1475	—	2,63
48 heures après injection	—	—	640	—	2,58

*Résultats qualitatifs. Chromatographie sur papier, fraction AB ( $\mu\text{g}/24 \text{ h}$ .)*

	Avant injection	24 h. après	48 h. après
<i>Mâle 13</i>			
11-OHE . . . . .	100	600	200
11-OHA . . . . .	20	100	20
11-COE . . . . .	100	500	200
11-COA . . . . .	50	200	100
DHA . . . . .	0	0	0
E ou éA . . . . .	100	100	150
A . . . . .	0	0	0

C. *Interprétation et discussion* (fig. 1).

Ces résultats partiels permettent de tirer quelques conclusions concernant le métabolisme des androgènes chez le cobaye. Il semble très différent de celui que l'on observe chez l'homme. En effet, chez ce dernier on connaît dans le détail les transformations que subit la testostérone pour aboutir à l'androstérone et à l'étiocholanolone. On connaît, dans une certaine mesure, la biogenèse de la déhydroépiandrostérone et de l'épiandrostérone (DORF-

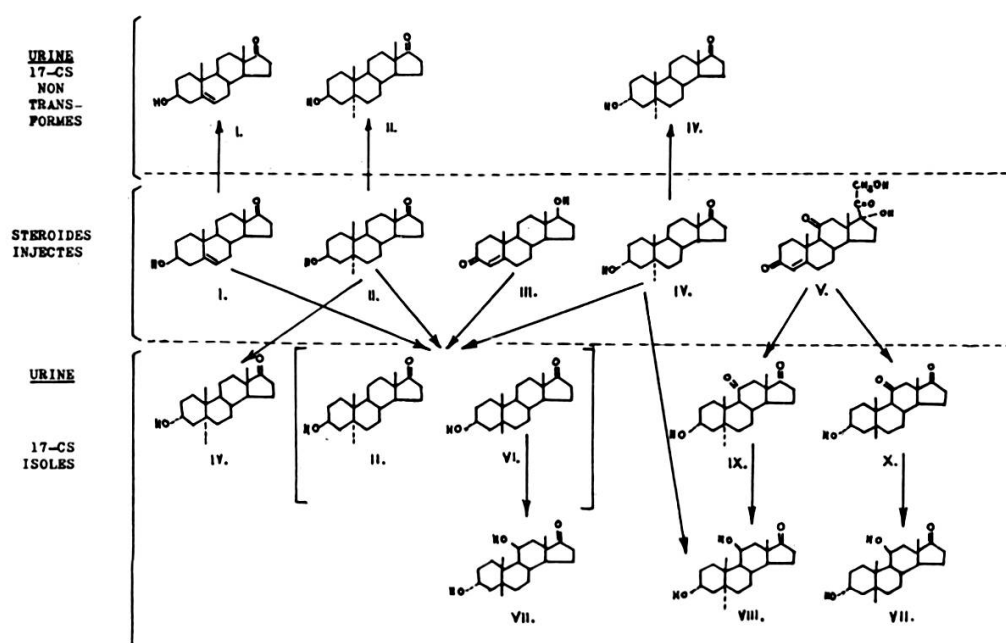


Fig. 1.

Métabolisme partiel de quelques stéroïdes chez le cobaye.

- I. Déhydro-épiandrostérone.
- II. Epiandrostérone (3  $\beta$ -hydroxy, androstane, 17-one).
- III. Testostérone.
- IV. Androstérone (3  $\alpha$ -hydroxy, androstane, 17-one).
- V. Cortisone.
- VI. Etiocolanolone (3  $\alpha$ -hydroxy, étiocholane, 17-one).
- VII. 11  $\beta$ -hydroxy, étiocholanolone (3  $\alpha$ , 11  $\beta$ -dihydroxy, étiocholane, 17-one).
- VIII. 11  $\beta$ -hydroxy, androstérone (3  $\alpha$ , 11  $\beta$ -dihydroxy, androstane, 17-one).
- IX. 11-céto, androstérone (3  $\alpha$ -hydroxy, androstane, 11, 17-dione).
- X. 11-céto, étiocholanolone (3  $\alpha$ -hydroxy, étiocholane, 11, 17-dione).

MAN, SHIPLEY, 1956). Chez le cobaye, on ne trouve comme métabolites de la testostérone (III) que l'étiocolanolone (VI) ou l'épiandrostérone (II), alors qu'une fraction importante est constituée par la 11- $\beta$  hydroxyétiocolanolone (VII). Dans l'organisme du cobaye mâle où la testostérone est élaborée en très faible quantité, il est vraisemblable que la majeure partie est éliminée dans l'urine sous forme de 11- $\beta$  hydroxyétiocolanolone, le reste sous forme d'étiocolanolone. Le fait que la testostérone donne lieu à l'excrétion de 17-CS oxygénés en 11 indique avec une haute probabilité que le foie du cobaye possède une ou plusieurs  $\beta$ -hydroxylases. On peut en déduire que chez cet animal *une partie des 17-CS oxygénés en 11 provient des testicules.*

Une partie de l'androstérone (IV) administrée est éliminée telle quelle, une autre fraction, sous forme hydroxylée en 11 (11- $\beta$  hydroxyandrostérone VIII), tandis que le reste est épimérisé en position 5 pour conduire à l'étiocholanolone (VI) qui elle-même peut être hydroxylée en position 11. La déhydroépiandrostérone (I), métabolite important chez l'homme, n'est même pas présente dans l'urine du cobaye normal. Lorsqu'on lui en administre, elle est éliminée en partie (environ 50%) sous sa forme primitive, en partie sous forme hydrogénée (étiocholanolone VI ou épiandrostérone II). L'étiocholanolone ainsi obtenue est également hydroxylée en position 11. La déhydroépiandrostérone non transformée est éliminée dans l'urine sous forme d'un conjugué labile qui se retrouve dans la fraction B.

Par analogie avec ce qui se passe chez l'homme, et d'après les travaux de Bitman et Cohen (1951), il est très probable qu'il s'agisse de sulfate de déhydroépiandrostérone. L'épiandrostérone (II) subit les mêmes transformations que les trois stéroïdes précédents (testostérone, androstérone, déhydroépiandrostérone) mais en plus, on observe une épimérisation en position 3, conduisant à l'androstérone (IV). Enfin, quoique un peu à part, le métabolisme de la cortisone (V) est intéressant car il conduit à la formation d'une importante quantité de 17-CS oxygénés en 11. Par perte des carbones 20 et 21, réduction de la double liaison et de la fonction cétonique, dans le cycle A, on obtient les deux isomères: 11-céto-étiocholanolone (X) et 11-céto-androstérone (IX). Enfin, la réduction des fonctions cétoniques en 11, nous conduit à la formation des 11- $\beta$  hydroxy-étiocholanolone (VII) et 11- $\beta$  hydroxy-androstérone (VIII). La cortisone, hormone corticale, suffit donc à assurer la production des quatre 11-oxy-17-CS toujours présents dans l'urine du cobaye normal et absents chez l'animal surrénalectomisé.

On peut conclure que les 11-oxy-17-CS ont, selon toute vraisemblance, une origine double: cortico-surrénalienne et testiculaire. L'étiocholanolone ou l'épiandrostérone prend naissance au niveau des gonades mâles et femelles comme le montrent les expériences de surrénalectomie.

#### SURRÉNALECTOMIE: MÂLES ET FEMELLES

##### RÔLE DU TESTICULE ET DE L'OVAIRE

##### INFLUENCE PRÉPONDÉRANTE DE LA SURRÉNALE

La surrénalectomie bilatérale des cobayes mâles et femelles permet de préciser le rôle du testicule et de l'ovaire en tant que producteurs de sté-

roïdes androgènes. De même, en comparant les animaux normaux (avant surrénalectomie ou ayant encore une surrénale) avec les animaux surrénalectomisés totalement, nous pouvons déduire le rôle de la surrénale. Ce dernier est prépondérant, mais nous ne pouvons pas dissocier complètement le rôle de la surrénale de celui des gonades. Examinons ce qui se passe chez les animaux des deux sexes.

*Technique de surrénalectomie.*

La technique de surrénalectomie utilisée est celle décrite par O. LIBERT (CHAROLLAIS et al., 1957a). Nous la résumons ici brièvement :

Les animaux sont opérés en deux fois. On effectue d'abord la surrénalectomie droite, puis trois à quatre semaines après, la surrénalectomie gauche selon la même technique. L'animal, rasé sur le flanc, désinfecté soigneusement au Bradosol (Ciba), est anesthésié à l'éther. On pratique une ouverture dorso-ventrale de 4 à 5 cm sur la dernière côte flottante. On dissèque cette dernière, la met à nu et la sectionne le plus près possible de la musculature dorsale tout en respectant le péritoine qui maintient la masse intestinale en place.

On incise le péritoine puis introduit de petits paquets de coton entourés de gaze, imprégnés de Bradosol de façon à repousser postérieurement les intestins, antérieurement le foie. Le champ est alors bien dégagé, la surrénale est juste au fond de l'ouverture. On doit alors travailler sur le rein ou la surrénale uniquement avec des « allumettes » garnies de coton, humecté de Bradosol. On dilacère d'abord la graisse et le conjonctif avec une pince fine. Une fois la surrénale mise à nu, on la dégage lentement et délicatement de la veine cave avec un petit crochet tranchant dans sa portion interne, jusqu'à ce qu'elle ne soit plus retenue que par la veine surrénalienne. Il suffit ensuite de sectionner rapidement la veine surrénarienne. Après une hémorragie de quelques minutes, on peut recoudre la musculature au catgut, puis la peau au moyen d'agrafes. La cicatrisation s'effectue très rapidement. Il est indispensable de travailler à deux pour effectuer une surrénalectomie rapide et précise.

*A. Mâles. — Rôle du testicule et de la surrénale.*

*1. Mâles surrénalectomisés sans traitement substitutif ou avec traitement incomplet.*

L'ablation de la première surrénale chez le mâle n'affecte nullement le comportement et la croissance de l'animal ou la composition de ses 17-CS urinaires. Cependant, on note immédiatement après la première opération un léger fléchissement dans l'élimination journalière des 17-CS urinaires, fléchissement rapidement compensé par la surrénale restante. Trois à quatre semaines après la première opération, le taux des 17-CS semble être tout à fait normal (il faudrait opérer statistiquement pour démontrer une différence ou une identité, car les mesures n'ont été faites que rarement sur les mêmes animaux entiers et avec une seule surrénale).

Par contre, après la seconde surrénalectomie, pour autant que l'animal n'ait pas de reliquat ni de surrénale accessoire, l'élimination des 17-CS urinaires tombe à zéro. Un dosage global, au moyen de la réaction de Zimmermann précédemment décrite (CHAROLLAIS, 1955), révèle quelques dizaines de  $\mu\text{g}$  qui ne sont dûs qu'à des chromogènes interférents, car une étude chromatographique montre nettement l'absence complète de 17-CS urinaires. Rien dans la zone des 11-oxy-17-CS, rien dans celle des 11-desoxy-17-CS (tableau 6). C'est pour cette raison que nous avons renoncé à doser les 17-CS des cobayes après surrénalectomie bilatérale, et avons effectué la chromatographie sur papier sur l'extrait total des 24 heures. Nous n'avons pu suivre ces animaux que pendant 9 jours au maximum, car sans traitement autre que les injections d'eau physiologique et de glucose et une nourriture riche en vitamine C et en chlorure de sodium, les animaux meurent rapidement.

TABLEAU 6.

*Cobayes mâles surrénalectomisés sans traitement.*

Cobaye	♂ 1				♂ 9		♂ 10			♂ 11		
Date	10 VIII	18 VIII	21 VIII	23 VIII	4 VI	12 VI	29 V	26 VI	28 VI	28 V	28 VI	3 VII
Fraction A $\mu\text{g}/24$ h.												
Totale . .	186	44	32	33	122	20	107	—	—	138	150	—
11-OHE . .	15	0	0	0	50	0	45	0	0	35	—	0
11-OHA . .	9	0	0	0	20	0	20	0	0	25	—	0
11-COE . .	15	0	0	0	20	0	35	0	0	35	—	0
11-COA . .	0	0	0	0	10	0	10	0	0	10	—	0
E ou éA . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0

Les dates de la seconde surrénalectomie sont les suivantes:

♂ 1: 14.VIII; ♂ 9: 7.VI; ♂ 10: 24.VI; ♂ 11: 1.VII.

Les résultats antérieurs correspondent à ceux d'un animal avec une ou deux surrénales.

Le traitement de choix des cobayes surrénalectomisés bilatéralement semble être l'aldostérone. Nous l'avons administrée à raison de 10  $\mu\text{g}/24$  heures, en solution dans l'eau physiologique, par voie sous-cutanée.



On peut immédiatement voir que ce traitement est insuffisant car les animaux maigrissent de façon régulière et finissent au bout de trois à quatre semaines par mourir, atteints d'asthénie, de paralysie de l'arrière-train et d'ulcérations gastriques dans la région pylorique, pouvant aller jusqu'à la perforation. Les cobayes soumis à ce traitement présentent exactement le même diagramme que les animaux non traités; il n'y a plus de traces de 17-CS dans les urines (tableau 7, mâle 8).

TABLEAU 7.

*Cobaye surrénalectomisé traité à l'aldostérone (10  $\mu$ g/24 h.). Mâle 8.*

Date	1.VI	6.VI	8.VI	15.VI	22.VI	29.VI	6.VII
Fraction AB $\mu$ g/24 h.							
Totale . . . .	264	26	19	—	—	—	—
11-OHE . . .	125	0	0	0	0	traces	0
11-OHA . . .	60	traces	0	0	0	0	0
11-COE . . .	0	0	0	0	0	0	0
11-COA . . .	0	0	0	0	0	0	0
E ou éA . . .	0	0	0	0	0	0	0

Peut-on conclure que la totalité des 17-CS urinaires provient de la surrénale et que le testicule ne joue aucun rôle ? Non, car il y a interdépendance entre ces deux organes, et faute d'hormones corticostéroïdes (l'aldostérone n'est pas suffisante), le testicule dégénère. Macroscopiquement, il devient mou et petit, souvent même il quitte le scrotum et prend une position abdominale. L'histologie révèle une dégénérescence discrète de la lignée germinale. Ainsi les testicules ne jouent plus leur rôle normal et on ne peut pas connaître leur participation dans la genèse des androgènes estimés au moyen des 17-CS urinaires. Il faut un traitement substitutif convenable, qui conserve aux testicules leur physiologie normale. On note également chez les addisonniens une diminution de l'activité androgène du testicule.

## 2. Mâles surrénalectomisés avec traitement substitutif efficace.

Le traitement substitutif qui nous a permis de faire survivre facilement nos animaux est le suivant :

Injection sous-cutanée journalière d'un mélange de 10  $\mu\text{g}$  d'aldostérone (ou acétate d'aldostérone) de 30  $\mu\text{g}$  d'acétate de cortisone (suspension cristalline dans 2 cc d'eau physiologique) et de 2 cc de glucose à 10%. Les animaux reçoivent une nourriture riche en vitamine C et chlorure de sodium, sous forme de son de blé auquel on ajoute 2 g/Kg de vitamine C et 2% de chlorure de sodium. Le temps de survie peut ainsi dépasser 6 à 7 semaines sans perte de poids appréciable.

Ce traitement nous a permis de démontrer la fonction androgène du testicule en identifiant les 17-CS urinaires présents par chromatographie sur papier (tableau 8).

TABLEAU 8.

*Cobayes mâles surrénalectomisés traités à la cortisone (30  $\mu\text{g}/24\text{ h.}$ )  
et aldostérone (10  $\mu\text{g}/24\text{ h.}$ ).*

*Mâle 14.*

Date	9.X	16.X	23.X	29.X	5.XI	12.XI	19.XI	26.XI
Fraction AB $\mu\text{g}/24\text{ h.}$								
Totale (conjugués)	287	—	—	—	—	—	—	—
11-OHE . .	105	0	0	0	0	5	5	traces
11-OHA . .	25	0	0	0	0	0	0	0
11-COE . .	25	0	traces	traces	traces	0	0	0
11-COA . .	0	0	0	0	0	0	0	0
Bleu * . .	—	—	+	+	+	—	—	—
E ou éA . .	55	75	10	20	10	10	50	10

Seconde surrénalectomie le 10.X.

\* Tache bleue au Zimmermann  $\text{RA} = 0,20 \pm 0,04$ .

On note d'une part une très faible quantité de 11-oxy-17-CS, spécialement de 11- $\beta$ -hydroxy-étiocholanolone et de 11-céto-étiocholanolone, d'autre part une élimination de 10 à 75  $\mu\text{g}/24$  heures (moyenne 20  $\mu\text{g}$ ) d'étiocholane-3 $\alpha$  ol, 17-one ou peut-être d'androstane-3 $\beta$  ol, 17-one ou d'un mélange des deux. Ces deux stéroïdes migrent en même temps et la séparation à la digitonine n'ayant pas été effectuée sur de si faibles quantités, nous ne sommes pas à même de trancher la question.

*Mâle 18.*

Date	30.X	5.XI	12.XI	19.XI	26.XI	5.XII	10.XII	17.XII
Fraction AB $\mu\text{g}/24 \text{ h.}$								
Totale . .	85	—	—	—	—	—	—	—
11-OHE . .	15	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces
11-OHA . .	0	0	0	0	0	0	0	0
11-COE . .	0	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces
11-COA . .	15	0	0	0	0	0	0	0
Bleu * . .	—	—	+	—	—	+	+	—
E ou éA . .	30	10	10	10	10	20	10	15

Seconde surrénalectomie le 30.X.

\* Tache bleue au Zimmermann  $R_A = 0,20 \pm 0,04$ .

## Conclusions:

- La surrénalectomie bilatérale du cobaye mâle suivie d'un traitement approprié permet d'une part une longue survie et d'autre part la mise en évidence de la fonction testiculaire qui se traduit par l'élimination dans les urines d'étiocolanolone (ou épiandrosterone ou mélange des deux) à raison de 20  $\mu\text{g}/\text{jour}$  en moyenne. On note aussi la présence de très faibles quantités de 11 $\beta$ -hydroxy- et de 11-céto-étiocolanolone.
- Dans tous les cas observés, nous n'avons jamais trouvé d'androsterone, ni de stéroïdes migrant plus rapidement. En effet, les effluants recueillis puis rechromatographiés en arrêtant le front du solvant à l'extrémité inférieure du papier, ne contiennent pas de 17-CS.
- Les injections de testostérone à des cobayes montrent que cette hormone mâle se métabolise essentiellement en étiocolanolone et 11 $\beta$ -hydroxyétiocolanolone. Ceci permet de conclure que l'élimination des 17-CS urinaires des cobayes surrénalectomisés traduit une synthèse de testostérone par le testicule physiologiquement normal.

Les processus de transformation de la testostérone semblent moins complexes que chez l'homme, car on n'aboutit ni à l'androsterone ni à la déhydroépiandrosterone. Cependant, la 11- $\beta$ -hydroxylation joue chez le cobaye un rôle très important.

TABLEAU 9.

*Cobaye mâle surrénalectomisé, avec reliquat surrénalien (mâle 4).*

Date	11.VIII	22.VIII	28.VIII	5.IX
Fraction A $\mu\text{g}/24 \text{ h.}$ .				
Totale . . . . .	108	56	41	58
11-OHE . . . . .	15	0	10	15
11-OHA . . . . .	0	0	0	0
11-COE . . . . .	10	0	0	0
11-COA . . . . .	10	0	0	0
E ou éA . . . . .	0	0	0	0

Seconde surrénalectomie le 16.VIII.

*4. Influence d'un reliquat surrénalien.*

La présence d'un reliquat surrénalien ou d'une surrénale accessoire se traduit toujours par la persistance d'une faible élimination de 17-CS oxygénés en 11 dans les urines (tableau 9, mâle 4). Le principal stéroïde éliminé ainsi est la 11- $\beta$ -hydroxy-étiocholanolone. Elle atteint 10 à 15  $\mu\text{g}/24$  heures, ce qui représente un taux assez faible, mais non nul, comme ce devrait être le cas pour un animal surrénalectomisé non traité. A part cela, on se rend vite compte de la présence d'un reliquat ou d'une surrénale accessoire par l'allure générale de l'animal qui reste vif et augmente légèrement de poids. Il peut survivre plusieurs mois mais meurt lorsque le reliquat surrénalien hyperactif finit par se nécroser et disparaître. A l'autopsie, on ne retrouve pratiquement plus trace d'un reliquat dont l'existence était certaine. Cette observation montre le rôle prépondérant de la surrénale chez le cobaye. Elle assure la biogenèse de la quasi-totalité des 17-CS éliminés dans l'urine ainsi que l'intégrité de la fonction testiculaire.

*B. Femelles surrénalectomisées. — Rôle de l'ovaire et de la surrénale.**1. Conséquences de la surrénalectomie. Rôle de l'ovaire.*

Il semble que la surrénalectomie bilatérale chez le cobaye femelle affecte peu l'ovaire. En principe, il sera donc facile de mettre en évidence le rôle de l'ovaire sur un animal maintenu en survie par un simple traitement au

glucose, eau physiologique et aldostérone (10  $\mu$ g/24 heures) associé à une nourriture riche en vitamine C et en chlorure de sodium (tableau 10).

TABLEAU 10.

*Cobaye surrénalectomisé traité à l'aldostérone (10  $\mu$ g/24 h.). Femelle P 89.*

Date	23.V	6.VI	18.VI	25.VI	2.VII	7.VII	16.VII	23.VII
Fraction A $\mu$ g/24 h.								
Totale . .	248	191	—	—	—	—	—	—
11-OHE . .	—	130	0	0	0	0	0	0
11-OHA . .	—	0	0	0	0	0	0	0
11-COE . .	—	25	0	0	0	0	0	0
11-COA . .	—	25	0	0	0	0	0	0
E ou éA . .	—	0	0	0	0	0	0	0

Seconde surrénalectomie le 14.VI.

Il ressort de ce tableau que l'élimination des 17-CS urinaires chez la femelle surrénalectomisée sans reliquat tombe à zéro. Il n'y a pas de 17-CS occupant la position de l'étiocholanolone (*Huis in't Veld*, 1960).

TABLEAU 11.

*Cobaye femelle surrénalectomisée traitée à la cortisone (2 mg/24 h.).*

*Femelle P. 64.*

Date	2.III	9.III	13.III	20.III	23.III	2.IV
Fraction A $\mu$ g/24 h.						
Totale . . . . .	91	72	259	274	451	314
11-OHE . . . . .	45	95	135	—	300	160
11-OHA . . . . .	20	0	0	—	20	15
11-COE . . . . .	45	45	90	—	90	90
11-COA . . . . .	20	25	45	—	45	30
E ou éA . . . . .	0	0	0	—	0	0

Seconde surrénalectomie le 11.III. Injections de cortisone dès cette date.

Un second moyen utilisé en vue de la survie des animaux surrénalectomisés est le traitement à la cortisone. Même à fortes doses (20 mg/24 heures), il est insuffisant et ne permet pas d'enrayer la chute de poids. Toutefois, la survie est plus longue qu'avec l'aldostérone seule. Malheureusement, la cortisone se métabolise en 17-CS oxygénés en 11 et la distinction entre les métabolites d'origines endogène et exogène est impossible (tableau 11). Notons cependant qu'il n'y a toujours pas de tache occupant sur les chromatogrammes la position de l'étiocholanolone.

## 2. *Traitement de survie. Résultats.*

Le traitement de survie mis au point pour les mâles surrénalectomisés convient parfaitement aux femelles. Le tableau 12 montre les résultats obtenus sur deux femelles qui ont malheureusement présenté, l'une (P121) un reliquat, l'autre (P138) une surrénale accessoire dont le fonctionnement ne s'est manifesté que tardivement. La femelle P138 peut être considérée comme surrénalectomisée complète pendant les deux premières semaines. L'élimination quotidienne des 17-CS se limite à des traces de 11- $\beta$ -hydroxy-étiocholanolone. Après ce temps, le diagramme qualitatif se rapproche beaucoup de celui d'une femelle normale. On note de très faibles quantités d'étiocholanolone (ou épiandrosterone) dans les urines.

TABLEAU 12.

*Cobaye femelle surrénalectomisée avec reliquat, traitée à l'aldostérone (10  $\mu$ g/24 h.) et cortisone (30  $\mu$ g/24 h.). Femelle P 121.*

Date	6.XI	16.XI	23.XI	30.XI	1.XII	2.XII	7.XII	17.XII
Fraction AB $\mu$ g/24 h.								
Totale . .	290	—	—	—	—	—	—	—
11-OHE . .	140	5	10	5	10	5	40	85
11-OHA . .	70	5	10	5	10	5	10	35
11-COE . .	70	5	5	15	10	5	10	20
11-COA . .	5	5	5	5	10	5	5	20
E ou éA . .	0	?	0	?	?	0	0	?

Seconde surrénalectomie le 9.XI.

*Cobaye femelle surrénalectomisée avec fonctionnement tardif d'une surrénale accessoire.*

*Traitement à l'aldostérone (10  $\mu$ g/24 h.) et à la cortisone (30  $\mu$ g/24 h.).*

*Femelle P 138.*

Date	31.I	10.II	17.II	21.II
Fraction AB $\mu$ g/24 h.				
Totale (conjugués)	242	—	—	—
11-OHE . . . . .	35	traces	traces	5
11-OHA . . . . .	45	0	0	5
11-COE . . . . .	35	0	0	5
11-COA . . . . .	traces	0	0	0
E ou éA . . . . .	traces	0	0	5

Seconde surrénalectomie le 3.II.

L'autre femelle (P121) présente une élimination réduite des 17-CS oxygénés en 11. Il y a peut-être également des traces d'étiocholanolone (ou épiandrosterone). Pour ces deux femelles, l'élimination des 17-CS s'accroît en fonction du temps. Les résultats obtenus avec d'autres femelles surrénalectomisées traitées par la suite aux gonadotropes sont également en accord avec ceux des deux animaux ci-dessus.

### 3. *Conclusions.*

Ces résultats ne sont pas faciles à interpréter. On peut cependant conclure que l'ovaire de la femelle surrénalectomisée ne sécrète pas d'androgènes métabolisés en 17-CS. Il est très vraisemblable et en accord avec les résultats obtenus lors de l'étude des cycles de cobayes femelles que la totalité des 17-CS éliminés par la femelle normale soit d'origine surrénalienne. Ceci n'exclut nullement la potentialité androgène de l'ovaire qui se manifeste lors des traitements gonadotropes.

## HYPOPHYSECTOMIE — RÔLE DE L'HYPOPHYSE

Ce travail a été effectué essentiellement sur des cobayes femelles dont la plupart ont été ensuite traitées par des gonadotropes afin de provoquer une masculinisation d'origine ovarienne.



La technique opératoire utilisée est celle décrite par D. ROSENBUSCH et K. PONSE (1957). D'après les mêmes auteurs, on peut définir les effets de l'hypophysectomie en fonction du temps de la façon suivante:

Après un à trois jours d'hypophysectomie, on ne note aucun effet morphologique décelable sur les ovaires, le tractus génital, les surrénales et les thyroïdes. Cependant, l'index nucléaire du tissu théco-interstitiel ovarien (GUYÉNOT, 1946) réagit déjà 24 heures après l'hypophysectomie. Il peut atteindre 42 et plus, alors que le nombre moyen est d'environ 36.

Quatre à dix jours après l'hypophysectomie, le tissu thécal des follicules atrésiés réagit encore davantage, l'index monte jusqu'à 60. La baisse de poids des surrénales et des thyroïdes semble s'amorcer.

Trois à sept semaines après hypophysectomie, on note tous les symptômes d'atrophie classique du système endocrinien: ovaires petits (5 à 9%) avec de nombreuses atrésies, de petits follicules et un index élevé (60 à 62). Le vagin et les cornes utérines sont aplasiés et atrophiés, les surrénales ont nettement régressé (35 à 57 mg %; 65% pour les normales), elles sont presque complètement délipidées.

Nous retiendrons deux points essentiels pour la suite:

- 1° L'ovaire est l'organe le plus sensible à l'hypophysectomie, il réagit déjà 24 heures après l'opération;
- 2° La surrénale réagit beaucoup plus lentement. La régression amorcée dès les premiers jours ne se poursuit pas jusqu'à une mise au repos complète même après sept semaines d'hypophysectomie, elle garde encore une partie de son activité, c'est ce qui contribue à maintenir l'animal en vie, sans traitement spécial.

Vu les difficultés d'obtenir une hypophysectomie totale certaine, nous limiterons nos observations à deux catégories d'animaux. D'une part l'action de l'hypophysectomie simple et de longue durée (26 à 51 jours) sur l'élimination des 17-CS urinaires, d'autre part l'action immédiate (4 à 10 jours après l'opération) sur ces mêmes métabolites.

#### A. Action à longue durée.

Trois femelles normales adultes (femelle 362: 410 g; femelle 379: 475 g; femelle 470: 525 g) ont été hypophysectomisées. Les 17-CS urinaires ont été dosés régulièrement. L'autopsie a été pratiquée le vingt-huitième jour pour les deux

première femelles et le cinquante et unième pour la dernière. Les résultats sont consignés dans le tableau 13. On peut en tirer les conclusions suivantes:

1. Tout d'abord, si l'on compare l'élimination des 17-CS d'une femelle hypophysectomisée (femelle 379, par exemple, figure 2), en fonction du temps avec l'élimination d'une femelle normale, on observe la disparition de la montée des 17-CS au moment de l'oestre. Ceci est en accord avec l'absence de rut physiologique chez la femelle hypophysectomisée.

TABLEAU 13.

*Hypophysectomie. Action de longue durée.*

♀ n°	Nombre de jours avant ou après hypophysectomie	Fractions ( $\mu\text{g}/24 \text{ h.}$ )			Poids
		A	B	AB	
362	2 jours avant . . . . .	174	91	—	410 g
	7 jours après . . . . .	110	53	—	380 g
	12 jours après . . . . .	132	59	—	410 g
	19 jours après . . . . .	108	97	—	445 g
	26 jours après . . . . .	115	77	—	445 g
379	5 jours avant (rut) . .	433	160	—	535 g
	2 jours avant . . . . .	318	75	—	
	7 jours après . . . . .	162	87	—	500 g
	12 jours après . . . . .	126	72	—	505 g
	19 jours après . . . . .	95	90	—	550 g
	26 jours après . . . . .	101	70	—	530 g
470	5 jours avant . . . . .	—	—	254	540 g
	6 jours après . . . . .	—	—	131	540 g
	13 jours après . . . . .	—	—	109	530 g
	20 jours après . . . . .	—	—	167	535 g
	27 jours après . . . . .	—	—	63	535 g
	34 jours après . . . . .	—	—	89	525 g
	41 jours après . . . . .	—	—	76	545 g

2. La chute des 17-CS est d'abord rapide au cours des quatre à dix premiers jours après l'opération, puis elle devient plus lente et atteint assez

rapidement un plateau. Ceci correspond à la régression des surrénales d'abord assez rapide, puis plus lente et incomplète.

3. Le taux des 17-CS, même cinquante et un jours après hypophysectomie, n'est jamais nul. Il y a toujours une élimination résiduelle de 17-CS d'environ 100  $\mu\text{g}/24$  heures qui correspond à une activité persistante de la surrénale.

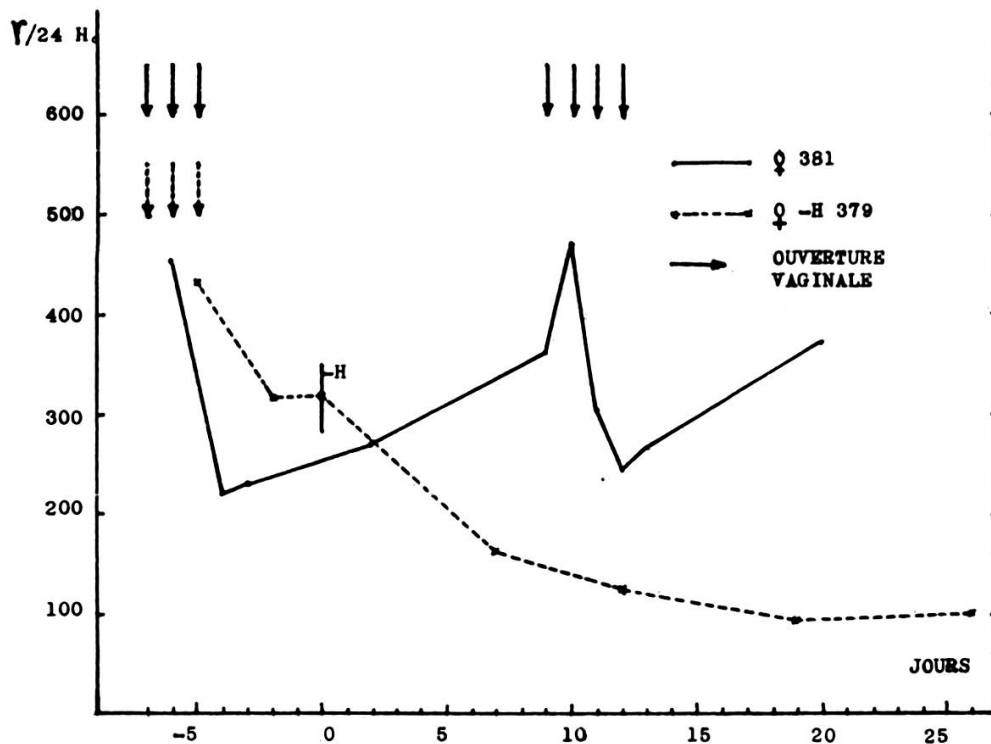


Fig. 2.

Comparaison entre l'élimination des 17-CS d'une femelle normale au cours du cycle œstral et celle d'une femelle hypophysectomisée.

4. Signalons enfin que l'étude par chromatographie sur papier des 17-CS éliminés chez une femelle hypophysectomisée (femelle 470) ne révèle pas de différence de composition avec ceux de l'urine d'une femelle normale. On observe la présence des quatre 11-oxy-17-CS classiques, ainsi que des traces d'étiocolanolone/épiandrosterone. Tout se passe donc comme si la surrénale de la femelle hypophysectomisée fonctionnait correctement mais à un extrême ralenti.

#### B. Action immédiate.

Les dosages effectués sur dix femelles avant et après quatre à dix jours d'hypophysectomie (figure 3) ne font que préciser les observations recueillies

plus haut. On note une chute caractéristique des 17-CS correspondant à la régression des surrénales (délipidation). Ce test est très sensible puisqu'il apparaît avant que la chute pondérale des surrénales soit amorcée.

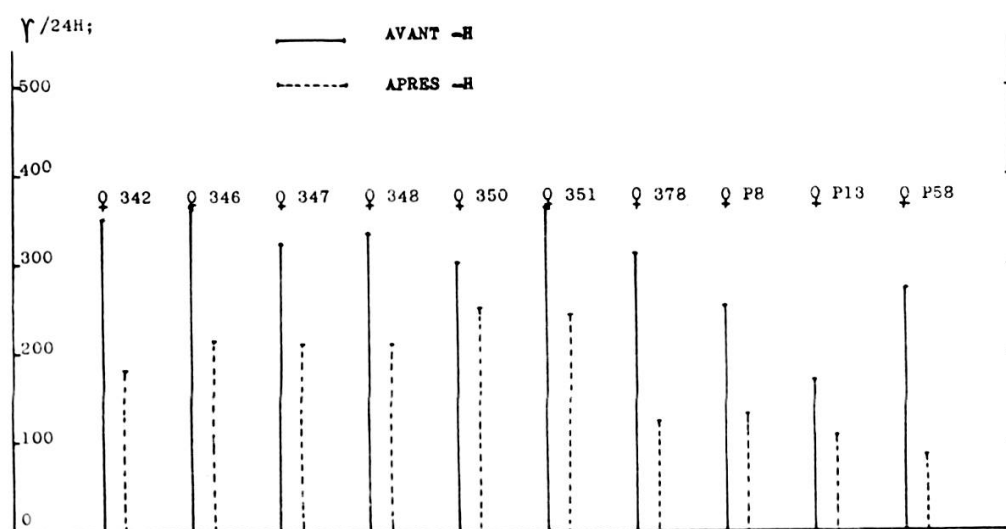


Fig. 3.

Influence de l'hypophysectomie sur l'élimination des 17-CS chez le cobaye femelle.

### C. Influence des reliquats hypophysaires.

Il n'est pas possible, même après quatre à cinq semaines d'hypophysectomie, de déceler un petit reliquat hypophysaire au moyen du dosage des 17-CS. En effet, si quelques cellules de pars antérieur hypophysaire peuvent exercer une action nette sur le système endocrinien (index nucléaire ovarien, par exemple), cette action ne se reflète pas dans l'élimination des 17-CS. Par contre, si l'on traite l'animal par les gonadotropes, on observe des perturbations importantes dans l'élimination des 17-CS urinaires.

En résumé, on peut dire que l'hypophyse exerce une action nette, rapide mais incomplète sur l'élimination des 17-CS urinaires. L'organe essentiel est la surrénale qui ne régresse que très incomplètement après hypophysectomie. C'est pourquoi, d'une part, on observe toujours une élimination résiduelle des 17-CS après hypophysectomie, d'autre part après cette opération les animaux peuvent survivre pendant très longtemps, la surrénale leur fournissant encore les hormones surrénaliennes indispensables à la vie. L'étude d'animaux hypophysectomisés pose donc de nombreux problèmes d'interprétation car les réactions observées sont celles d'un animal possédant tout son système endocrinien plus ou moins au repos. La

surrénalectomie, par contre, a l'avantage de ne pas perturber, ou de façon minimale, le reste du système endocrinien, à condition bien entendu d'adopter un traitement substitutif approprié.

ACTION DES GONADOTROPINES CHORIALES  
(ANTUITRINE S \* ET PHYSEX \*\*) SUR LES COBAYES FEMELLES.  
MASCULINISATION — OVAIRES VIRILISANTS

Au cours de ce travail, nous avons abordé le problème de la masculinisation de cobayes femelles normales, hypophysectomisées et surrénalectomisées sous l'influence des gonadotropines choriales (ROSENBUSCH-WEIHS, 1960). Ceci nous a permis de montrer le rôle essentiel de l'ovaire, qui devient virilisant sous l'action de ces hormones. Ces différents aspects de la fonction androgène de l'ovaire ont été analysés en détail dans une récente mise au point (PONSE, 1955a). Nous apportons ici des précisions complémentaires concernant le rôle joué par l'ovaire et la surrénale. Nous avons spécialement insisté sur le dosage des métabolites urinaires des androgènes et essayé de préciser les rôles respectifs de l'ovaire et de la surrénale.

A. Femelles normales.

a) *Action de l'Antuitrine S* (PONSE et al., 1955b):  $20 \times 150$  unités internationales (U.I.).

1. *Animaux utilisés.* — Trois femelles adultes normales ont été traitées par l'Antuitrine S. La femelle 327 de 18 semaines pesait au début de l'expérience 525 g, à la fin 615 g. Sa sœur, la femelle 328, respectivement 555 et 590 g. La femelle 329, de 17 semaines, 510 et 585 g. Leurs cycles œstriens étaient stabilisés à 15, 16 et 20 jours. Elles ont reçu chacune 20 injections de 150 U.I., par voie sous-cutanée, à raison d'une injection par jour, soit une dose d'environ 0,3 U.I. par gramme de poids du corps.

2. *Réactions morphologiques et histologiques.* — La masculinisation est notée par le développement du clitoris. Tout d'abord apparaissent les éminences blanches entre la septième et la neuvième injection (suivant les animaux). Le clitoris se dévagine et les crochets et les odontoïdes denticulés du gland apparaissent après 11 à 12 injections. Les crochets d'abord arrondis, deviennent pointus, se développent et atteignent à l'autopsie 1,1 à 1,8 mm. La masculinisation est accompagnée d'un développement des mamelons, qui à partir de la quatorzième-seizième injection deviennent turgescents et s'allongent (la femelle 329 a peu réagi à ce point de vue). De plus, les femelles 328 et 329 présentent une ouverture vaginale

\* Gonadotropine chorale Parke-Davis.

\*\* Gonadotropine chorale Leo.

depuis la quinzième injection jusqu'à l'autopsie, la femelle 327 seulement après 19 injections.

A l'autopsie, les réactions morphologiques sont observées en détail, tout le système endocrinien est prélevé, fixé, pesé et étudié histologiquement.

On note alors que les ovaires sont très gros: respectivement 199, 116 et 93 mg pour les femelles 327, 329 et 328. L'index nucléaire défini par Guyénot (1946) est assez faible: 14,7 à 19,5 (index normal: environ 35), ce qui dénote un état crinogène encore net.

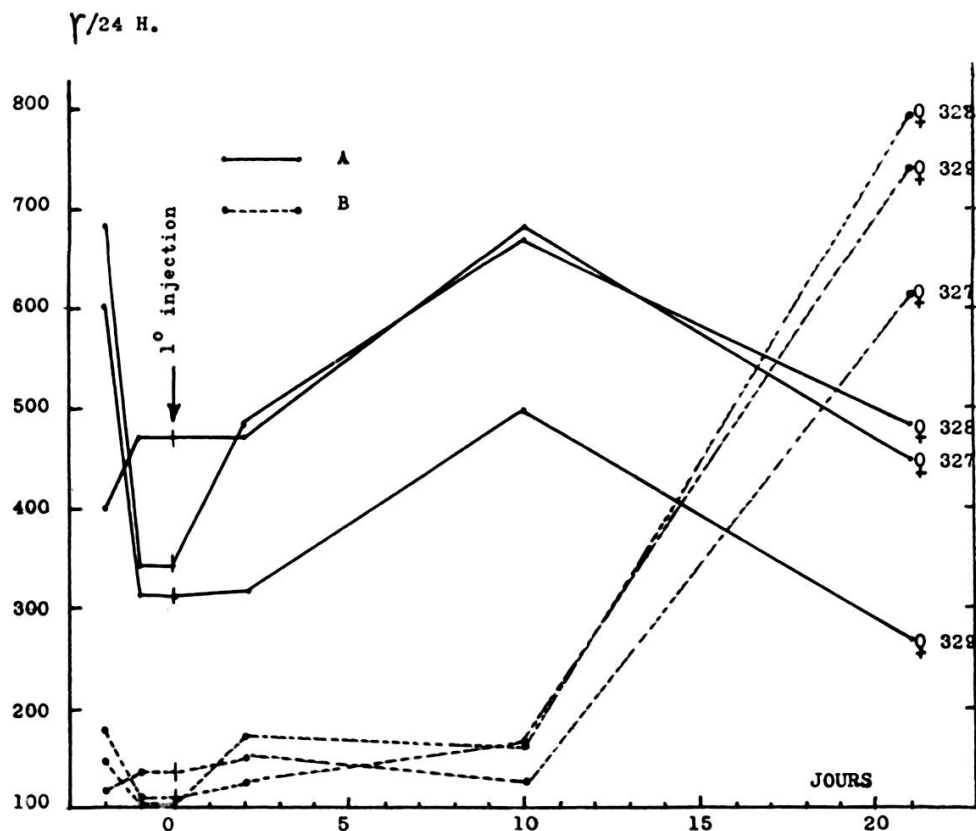


Fig. 4.

Elimination des 17-CS de cobayes femelles traitées par l'Antuitrine S.

On observe également de gros méroxanthosomes et de nombreux follicules de grande taille, prélutéiniques. Ce qui révèle la synergie des facteurs FSH (folliculo-stimulant) et LH (lutéinisant) injectés. LH affaibli ne peut plus antagoniser FSH mis en évidence par SIMPSON (1951) dans l'urine gravidique.

Le vagin présente une mucification exagérée, avec leucocytose. Il y a même une kératinisation, comparable à un état de plein rut chez la femelle 328. Les cornes utérines sont grosses, arrondies, avec début d'hyperplasie glandulo-kystique.

En résumé, on peut dire qu'avec 3000 U.I. ( $20 \times 150$  U.I.) d'Antuitrine S on obtient une bonne masculinisation, accompagnée d'une féminisation terminale (mamelons, vagin, cornes utérines). L'ovaire n'est pas formé de

tissu crinogène pur. Les surrénales sont en place, il n'est pas possible de définir avec certitude d'où provient la masculinisation. Nous verrons cependant plus loin qu'elle est bien d'origine ovarienne.

3. *Métabolites des androgènes*. 17-CS (figure 4). — Les femelles 328 et 329 ont eu un rut juste avant le traitement au moment des premiers dosages. On note donc, comme nous l'avons vu (CHAROLLAIS et al., 1957b), une montée caractéristique de la fraction A des 17-CS: 685  $\mu$ g (femelle 328) et 602  $\mu$ g (femelle 329), au lieu de 400 à 470  $\mu$ g pour la femelle 327 au repos. A ce moment, les fractions B sont faibles: 105  $\mu$ g/24 heures. Après l'œstre on assiste à la chute caractéristique des 17-CS au-dessous du taux moyen de repos. Puis l'action de l'Antuitrine S se manifeste par une montée de la fraction A, atteignant un maximum au moment où la masculinisation se déclenche (on peut l'affirmer grâce aux nombreux résultats que nous verrons plus loin). C'est ainsi qu'après 7 à 10 injections, l'élimination urinaire est de 670 à 680  $\mu$ g pour les femelles 327 et 328, seulement de 500  $\mu$ g pour la femelle 329. Plus tard, ce taux redevient normal, ce qui est probablement dû à une accoutumance et à une formation d'anticorps par l'organisme du cobaye en expérience, vis-à-vis du facteur LH de l'antuitrine S ou d'un vecteur de cette hormone.

La fraction B possède un tracé curieux, que nous n'avons jamais observé après un traitement au Physex. Après s'être maintenue à un taux faible (normal), la fraction B monte brusquement pendant la seconde moitié du traitement pour atteindre respectivement 614, 795 et 740  $\mu$ g pour les femelles 327, 328 et 329. Malheureusement, nous n'étions pas à même d'analyser chromatographiquement cette fraction qui sans doute eut été intéressante.

#### b) *Action du Physex*: 20 $\times$ 150 U.I.

Deux femelles normales ont été traitées par cette dose de Physex, qui se révèle trop élevée pour obtenir l'état crinogène pur (SIMPSON, 1951). La femelle 345 de 17 semaines a présenté un cycle de 19 jours avant le traitement. Elle pesait 480 g au début et 530 en fin d'expérience. La dose reçue est d'environ 0,3 U.I par gramme de poids du corps.

La femelle 255, de 14 semaines (beaucoup plus jeune), pesait 330 g au début et 440 en fin de traitement. Elle a reçu 22 injections de 150 U.I.

Les réactions morphologiques et histologiques sont les suivantes: chez la femelle 345, les éminences blanches du clitoris apparaissent dès la sixième injection, elles se détachent après la neuvième, se développent et donnent de petits crochets au moment de l'autopsie. Chez la femelle 255, la masculinisation est nette, dès la dixième-onzième injection, les crochets atteignent 1,7 à 1,8 mm au moment de l'autopsie.

Le vagin de la femelle 345 s'ouvre assez précocement (dès la onzième injection, il s'agit peut-être d'un début d'œstre normal, non inhibé). L'histologie montre une structure stratifiée, kératinisée, avec infiltration de leucocytes (correspondant à un métœstre prolongé). Il reste fermé chez la femelle 255. Sa structure se caractérise par un hypermucification, sans stratification ni leucocytes.

L'état des ovaires est très différent. Morphologiquement déjà, la femelle 345 a de petits ovaires (20,1%), tandis que ceux de la femelle 255 sont gros (52,5%). Les index sont très différents (femelle 345: 20, femelle 255: 12,1). Histologiquement, la femelle 345 a des ovaires avec un assez grand nombre de follicules nor-



maux en pleine croissance, quelques follicules prélutéiniques, mais pas de méroxanthosomes. Au contraire, la femelle 255 présente une hépatisation crinogène avec une série de gros méroxanthosomes et de follicules prélutéiniques. Il y a accoutumance plus ou moins avancée dans les deux cas.

Chez les deux femelles, les cornes utérines sont en état d'hyperémie. La sécrétion est forte. Les mamelons ont bien réagi et mesurent 4 à 5 mm à l'autopsie.

Les surrénales sont grosses (femelle 345: 67,8%, femelle 255: 62,5%).

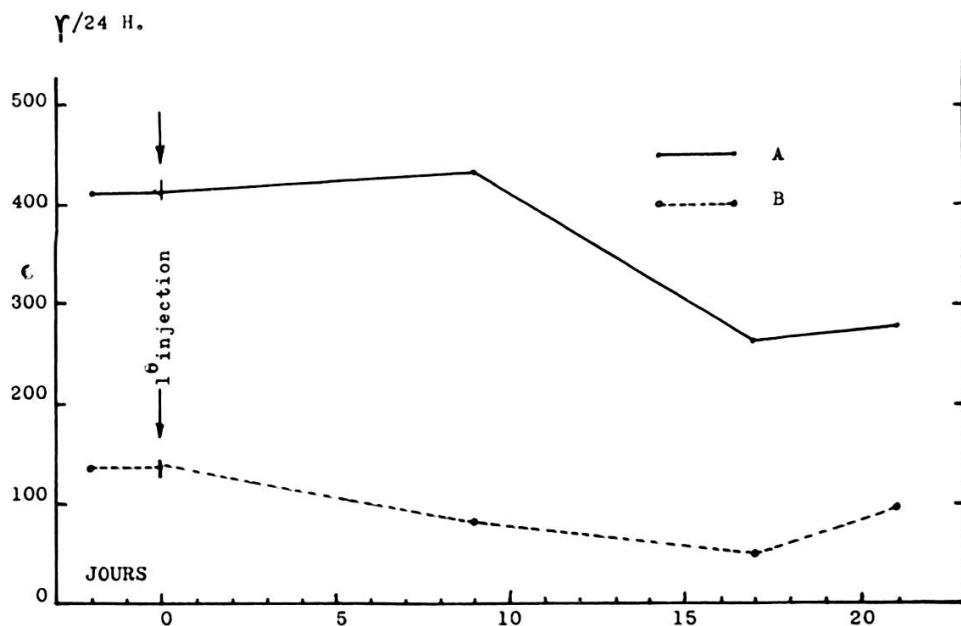


Fig. 5.

Elimination des 17-CS de cobaye femelle traitée par le Physex (femelle 345, 20 × 150 U.I.).

On note peu d'analogie avec le traitement à l'Antuitrine S (même dose). La raison essentielle est sans doute une accoutumance beaucoup plus tardive, une formation plus lente d'anticorps.

Les 17-CS métabolites des androgènes de la femelle 255 n'ont été dosés qu'avant et après traitement (fraction A: 274 et 174  $\mu\text{g}/24$  heures, la fraction B: 66 et 34  $\mu\text{g}/24$  heures). Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence la montée caractéristique de la masculinisation. Cependant, on note l'effondrement final caractéristique de cette réaction. Les 17-CS de la femelle 345 (figure 5) ne présentent pas, en ce qui concerne la fraction A, une véritable montée au moment de la masculinisation. Le taux se maintient en plateau (413  $\mu\text{g}/24$  heures avant traitement contre 432 à la neuvième injection). Par contre, en fin de traitement (dix-septième à vingtième injection), le taux s'effondre pour n'atteindre que 262 et 278  $\mu\text{g}/24$  heures.

La fraction B semble baisser au cours du traitement et effectuer une légère remontée en fin d'expérience. Cependant, cette élimination tardive n'a rien de comparable avec celle des animaux traités par l'Antuitrine S.

Aussi bien du point de vue histologique que du point de vue biochimique (métabolites urinaires), on ne peut pas dire que cette femelle présente une réaction typique de masculinisation telle que nous l'observerons plus loin.

c) *Action du Physex*:  $20 \times 40$  U.I.

1. *Animaux utilisés*. — Deux femelles adultes normales ont été traitées par le Physex à raison de  $20 \times 40$  U.I. (une injection sous-cutanée par jour), soit environ 0,1 U.I./g de poids du corps. La femelle 364, âgée de  $18\frac{1}{2}$  semaines pesait 450 g au début des injections, 490 à la fin. La femelle 371 de 16 semaines pesait 420 et 445 g. Avant le traitement, la femelle 364 avait des cycles un peu longs, ceux de la femelle 371 étaient normaux.

2. *Réactions morphologiques et histologiques*. — La masculinisation (clitoris) apparaît plus rapidement chez la femelle 364 que chez la femelle 371. Chez la première, les éminences blanches sont visibles dès le cinquième jour, elles se détachent le septième et dès le huitième jour les crochets sont visibles et se développent jusqu'à la fin (1,25 mm). Chez la seconde, les éminences ne sont visibles qu'après 8 injections, elles se détachent à la dixième, à la onzième, les crochets apparaissent nettement.

Les mamelons réagissent. Ils sont gros et gonflés (3 à 4 mm), cependant la réaction est plus faible qu'avec 150 U.I.

Les ovaires ne sont pas très gros (femelle 364: 115 mg, 22,5%; femelle 371: 79 mg, 17,8%). Ils présentent une réaction crinogène nette, l'index nucléaire est remonté par suite de l'accoutumance (femelle 364: 27,6; femelle 371: 24,1). On note la présence de follicules III en croissance et de méroxanthosomes (2 gros). L'accoutumance est presque complète.

Le vagin s'ouvre à la dix-septième injection chez la femelle 364, à la treizième chez la femelle 371. Il se referme avant l'autopsie. Sa structure histologique est celle d'un postœstre (femelle 371), cependant on note une kératinisation locale chez la femelle 364.

Les cornes utérines sont grosses, rondes, stimulées, bien vascularisées, mais à épithélium endométrial non frangé. Les surrénales sont grosses (femelle 364: 428 mg, 87%; femelle 371: 353 mg, 79%).

En résumé: la masculinisation du clitoris est bonne, elle est accompagnée de féminisation: rut terminal prolongé (quoique peu physiologique), développement des mamelons. Cette dose est suffisante, mais chez l'animal entier, l'ovaire présente des formations mixtes et non pas un tissu crinogène pur.

3. *Métabolites des androgènes*. 17-CS (figure 6). — Les fractions B et C présentent peu d'intérêt, nous les négligerons. La fraction A suit l'évolution caractéristique des femelles masculinisées par le Physex, à savoir:

Maintien d'un taux à peu près normal (femelle 364: 400 à 470  $\mu\text{g}/24$  heures; femelle 371: 270 à 350  $\mu\text{g}/24$  heures) avec quelques fluctuations jusqu'à la huitième-neuvième injection, puis montée vers un maximum atteint à la onzième-douzième injection (femelle 364: 537  $\mu\text{g}/24$  heures; femelle 371: 390  $\mu\text{g}/24$  heures).

L'élimination journalière devient ensuite plus faible, pour être égale ou inférieure au taux moyen normal au moment de l'autopsie (femelle 364: 290  $\mu\text{g}/24$  heures; femelle 371: 278  $\mu\text{g}/24$  heures).

d) *Action du Physex*:  $21 \times 10$  U.I.

1. *Animaux utilisés.* — Deux femelles adultes ont été traitées par ces faibles doses (femelle P45 et femelle P71). La première (P45), âgée de 29 semaines pesait 675 g; la seconde un peu plus âgée (âge exact inconnu) pesait 800 g. Ces gros animaux n'ont pratiquement pas varié de poids au cours du traitement. Les cycles œstriens avaient été réguliers (16 à 18 jours). La dose quotidienne de Physex (10 U.I.) est très faible, elle correspond à 0,012 à 0,015 U.I. par gramme de poids du corps.

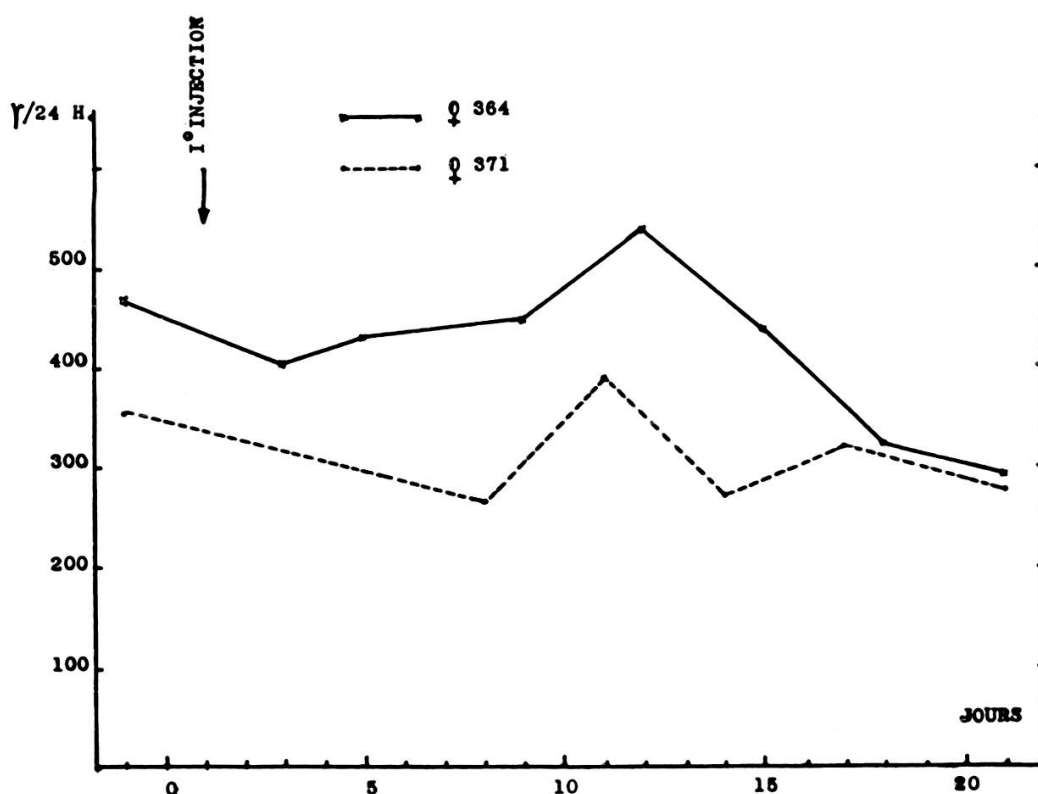


Fig. 6.

Élimination des 17-CS de cobayes femelles traitées par le Physex ( $20 \times 40$  U.I.).

2. *Réactions morphologiques et histologiques.* — Nous sommes obligés de séparer l'étude de ces deux animaux car la femelle P45 a réagi très anormalement. Cependant, il y a quelques traits communs que nous signalerons en conclusion.

Femelle P45: la masculinisation est tardive et ne débute pas avant la troisième injection. A l'autopsie, le clitoris est peu dévaginable, les crochets ont à peine 1 mm; il n'y a pas d'odontoïdes.

Les mamelons réagissent très fortement, ils sont turgescents et atteignent 7 mm de longueur.

Les ovaires sont petits (98 mg, 14,6%); ils contiennent beaucoup de follicules jeunes et quelques follicules moyens en croissance. On note 1 à 2 méroxanthosomes. L'index nucléaire est de 30,4, c'est-à-dire presque normal (35).

Le vagin s'ouvre irrégulièrement au cours du traitement (aux huitième, dixième, quinzième et dix-neuvième jours). A l'autopsie, il est mucifié avec quelques leucocytes.

Les cornes utérines sont très grosses, vascularisées et glandulokystiques. Les surrénales sont à peu près normales (435 mg, 64,5%).

Femelle P71: Ici encore, la masculinisation est tardive (douzième-quinzième injection), mais elle est nette, tout en étant faible. Les crochets ont environ 1 mm, les odontoides commencent à se développer.

Les mamelons sont gros et gonflés (longueur 3,5 mm).

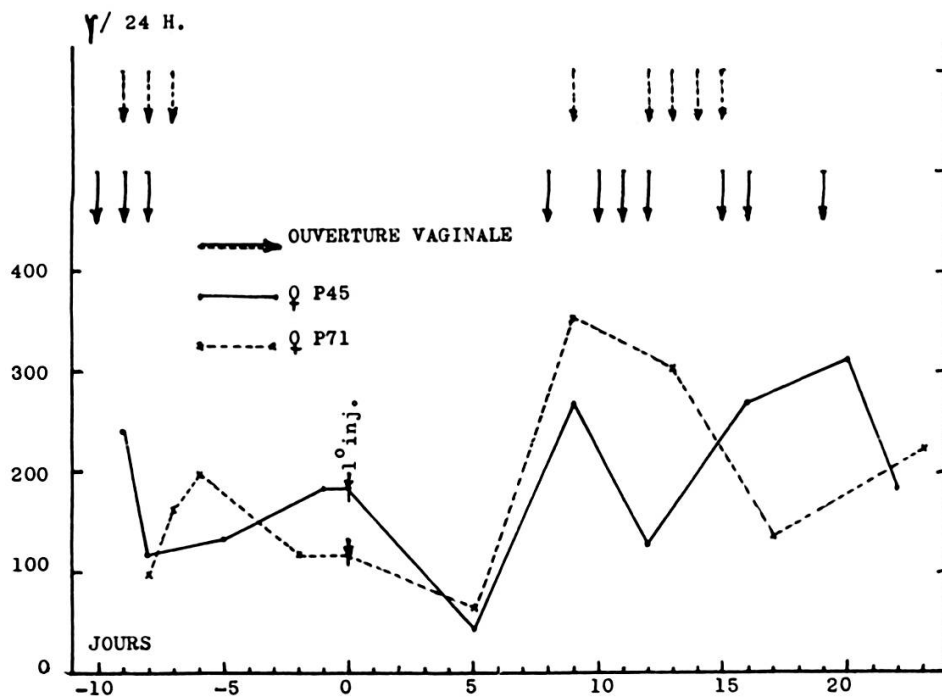


Fig. 7.

Elimination des 17-CS de cobayes femelles traitées par le Physex ( $21 \times 10$  U.I.).

Les ovaires sont petits (198 mg, 24,5%). Ils renferment de nombreux follicules III en croissance et beaucoup de gros follicules. L'animal ayant eu un œstre à peu près normal au milieu du traitement, on trouve deux corps jaunes actifs. L'index nucléaire est quasi normal (32,1). Les ovaires présentent le type d'accoutumance.

Le tractus est peu stimulé, il semble y avoir eu un cycle à peu près normal car: le vagin fermé est en postœstre avec une légère mucification et quelques leucocytes, les cornes utérines sont petites et également en postœstre. Les surrénales sont à peu près normales (463 mg, 57%).

3. *Métabolites des androgènes*. 17-CS (figure 7). — Signalons d'abord que ces animaux ont reçu une nourriture qui convenait mal aux dosages urinaires. Le taux de 17-CS était fortement abaissé, alors que la glucuro-conjugaison était très

élevée, compte tenu de ces différences, on peut tout de même noter les réactions de ces deux animaux :

Femelle P45: Avant traitement, le dernier rut a été marqué par la montée caractéristique des 17-CS (242  $\mu\text{g}/24$  heures) suivie d'une chute et du rétablissement du taux normal (183  $\mu\text{g}/24$  heures). Au début du traitement (après 4 injections), les valeurs trouvées sont très faibles (nourriture ou traitement ?). On assiste alors à deux remontées (268 et 312  $\mu\text{g}/24$  heures) correspondant aux deux ouvertures vaginales les plus longues. Il s'agit peut-être d'une réaction analogue à un œstre physiologique.

L'analyse chromatographique révèle exactement les mêmes variations concernant la 11- $\beta$ -hydroxy- et la 11-céto-étiocholanolone. On note surtout une forte élimination d'un 17-CS occupant la position de l'étiocholanolone/épiandrosterone au moment où la masculinisation se développe (douzième injection). Ce 17-CS est présent à raison d'environ 40% de la totalité. On en trouve également un peu plus de 25% à la fin du traitement. Notons cependant que ce même 17-CS a été observé au moment du rut (précédant le traitement), mais en plus faible quantité (moins de 20%). Signalons également que cette femelle était très grosse et peut-être en voie de virilisation spontanée.

Femelle P71: La nourriture a été changée en cours de traitement afin de rétablir autant que possible le taux normal des 17-CS. Chez cette femelle, il y a sans doute superposition de la montée due à un rut plus ou moins physiologique et celle de la masculinisation, si bien que l'élimination des 17-CS se maintient élevée pendant au moins 4 jours (356 à 305  $\mu\text{g}/24$  heures). Le début de ce plateau correspond à l'ouverture vaginale, la fin, au développement de la masculinisation. Cette interprétation est renforcée par la chromatographie sur papier qui révèle une forte montée de 11- $\beta$ -hydroxy et 11-céto-étiocholanolone (ainsi qu'une élévation plus discrète des 11- $\beta$ -hydroxy et 11-céto-androsterone), surtout au moment de la masculinisation.

Il n'est cependant pas exclu que la nourriture ait aussi joué un rôle.

### *Conclusions concernant les femelles normales traitées au Phyxer :*

Les résultats morphologiques et histologiques ont montré que la dose de 150 U.I. pendant 20 à 21 jours était trop élevée, les résultats sont très complexes. Par tâtonnements, après avoir essayé 120, 75, 60, 40, 20 et 10 unités, nous avons constaté que 40 U.I. par jour pendant 20 jours était la dose la mieux adaptée. La masculinisation est aussi forte qu'avec 150 U.I., les réactions finales sont atténuées (surtout chez les hypophysectomisées), le taux des métabolites urinaires présente des variations particulièrement nettes et caractéristiques de la masculinisation (femelle 364 et 371). La masculinisation est presque toujours accompagnée de féminisation (développement des mamelons, rut terminal) surtout pour les fortes doses. La masculinisation semble bien être en fonction de l'état crinogène des ovaires, mais la présence des surrénales complique l'interprétation concernant les 17-CS urinaires.

## B. Femelles hypophysectomisées.

La série des femelles hypophysectomisées traitées au Physex est celle qui a présenté le plus de difficultés. En effet, l'hypophysectomie est une opération difficile à réaliser, l'ablation complète de l'hypophyse n'est jamais certaine. Lorsqu'il s'agit de témoins, nous avons vu qu'il fallait de gros reliquats pour qu'ils enrayent la chute des 17-CS. Lorsque les animaux sont traités au gonadotropes, de très petits reliquats se manifestent déjà. De plus, l'animal hypophysectomisé est très délicat, beaucoup de survivants ne sont pas dans un état que l'on pourrait qualifier de physiologique, les métabolismes sont déréglés, on assiste à une chute des 17-CS, malgré le traitement aux gonadotropes (exemple femelle 348). Enfin, même pour une opération réussie et un animal en bon état, il est extrêmement malaisé de se placer dans des conditions rigoureusement comparables. C'est pourquoi les quelques animaux utilisés ne permettent de tirer que des conclusions très générales.

TABLEAU 14.

*Femelles hypophysectomisées traitées au Physex 20 × 150 U.I.*

*(0,3 U.I./g de poids du corps).*

Numéro de l'animal	♀ 342	♀ 346	♀ 351	♀ 378	♀ 347	♀ 348
<i>Poids à</i>						
l'hypophysectomie	370 g	455 g	565 g	500 g	505 g	585 g
la 1 <sup>re</sup> injection . .	415 g	475 g	570 g	520 g	520 g	495 g
l'autopsie . . . .	405 g	505 g	600 g	570 g	550 g	505 g
<i>Age</i>	16 sem.	15 sem.	18 sem.	19 sem.	19 sem.	19 sem.
<i>Cycle</i>						
durée du dernier .	16 j.	13 j.	15 j.	15 j.	18 j.	19 j.
j. de l'opération le	6 <sup>e</sup> j.	10 <sup>e</sup> j.	16 <sup>e</sup> j.	5 <sup>e</sup> j.	11 <sup>e</sup> j.	3 <sup>e</sup> j.
1 <sup>re</sup> injection après						
hypophysectomie						
le . . . . .	10 <sup>e</sup> j.	10 <sup>e</sup> j.	10 <sup>e</sup> j.	7 <sup>e</sup> j.	10 <sup>e</sup> j.	10 <sup>e</sup> j.
valeur de l'hypo-						
physectomie . .	totale	peu de P.A. P.N. et tige	qq. cell. de P.A.	totale P.T. en place	régéné- rat im- portant	totale P.T. en place



a) *Action du Physex*:  $20 \times 150$  U.I.

1. *Animaux utilisés* (tableau 14). — Sur six femelles hypophysectomisées traitées par 20 fois 150 U.I. de Physex, trois (femelles 342, 346, 351) peuvent être considérées comme présentant une réaction caractéristique, une (femelle 378) voit les résultats compliqués par la présence d'un adénome surrénalien, une autre (femelle 347) a présenté une régénération importante de l'hypophyse, enfin une dernière (femelle 348) malade a présenté en fin de traitement une chute des 17-CS. Bien qu'elle se soit modérément masculinisée et que l'histologie montre des ovaires crinogènes, on ne peut pas en tenir compte du point de vue métabolites urinaires.

2. *Réactions morphologiques et histologiques*. — Chez les trois femelles (342, 346, 351), représentant l'action typique du Physex à 150 U.I., les résultats sont les suivants:

La masculinisation se développe bien (très importante chez les femelles 351 et 342) dès la sixième et septième injection où les éminences blanches deviennent visibles. Après 9 à 10 injections, elles se détachent pour former de petits crochets atteignant 1,5 à 2 mm à l'autopsie.

Les mamelons réagissent peu (2,5 à 4 mm), ils restent assez petits et flasques. (En présence de l'hypophyse en place ou de reliquats hypophysaires, ils réagissent en général très fortement.)

Les ovaires sont en général petits (femelle 342: 95 mg, 23,4%); femelle 346: 65 mg, 12,9%; femelle 351: 90 mg, 15%). Les index nucléaires sont faibles, soit 12,3, 16,2 et 17,3 pour les femelles 342, 346 et 351. L'accoutumance est presque complète. Ces ovaires renferment des follicules III moyens ou petits en croissance, pas de méroxanthosomes (un petit chez la femelle 342). Ils sont fortement crinogènes.

Le tractus génital ne réagit pas de façon uniforme, car il est très sensible aux différents facteurs hormonaux (œstrogènes, androgènes, progestérone), ainsi qu'à leur rapport d'intensité. Aussi observe-t-on chez les femelles 342 et 351 un vagin fermé, tout au cours du traitement, en proœstre plus ou moins physiologique au moment de l'autopsie (mucification). Les cornes utérines sont au stade à peu près correspondant: elles sont moyennes, arrondies, avec œdème chez la femelle 342, petites et plates, mais bien vascularisées chez la femelle 351. Par contre, chez la femelle 346, le vagin s'ouvre entre les douzième et dix-septième injections. A l'autopsie, il est en métœstre atypique, avec des leucocytes. Les cornes utérines sont moyennes, plates et hyperémiées.

Les surrénales de ces animaux ont nettement régressé (femelle 342: 132 mg, 32,6%; femelle 346: 196 mg, 38,8%; femelle 351: 261 mg, 43,5%).

3. *Métabolites des androgènes*. 17-CS (figure 8). — Pour ces trois animaux la réaction caractéristique de la masculinisation a pu être observée beaucoup plus facilement que chez les femelles normales. L'hypophysectomie abaissant fortement le taux des 17-CS urinaires, les variations ultérieures sont beaucoup mieux visibles. La courbe d'élimination de la fraction A présente les caractéristiques suivantes:

Chute des 17-CS consécutive à l'hypophysectomie. En dix jours, le taux passe de  $358 \pm 8$   $\mu\text{g}/24$  heures (moyenne des trois animaux) à  $211 \pm 31$   $\mu\text{g}/24$  heures.

Cette chute qui continue chez l'animal non traité, est enrayée dès les premières injections de Physex. Le taux remonte, et on atteint un maximum d'élimination après 7 à 8 injections, c'est-à-dire au moment où la masculinisation se développe.



Les maxima sont respectivement de 274 et 290  $\mu\text{g}/24$  heures pour les femelles 346 et 351. La femelle 342 présente un maximum à peine esquissé (199  $\mu\text{g}/24$  heures), il est possible qu'il soit situé un peu avant ou un peu après la neuvième injection.

Enfin, la courbe se termine par une lente chute vers des taux très faibles ( $151 \pm 18$   $\mu\text{g}/24$  heures: moyenne des trois animaux). Cette chute correspond sans doute à un état d'accoutumance aux gonadotropes injectés, tel que l'état des ovaires le révèle.

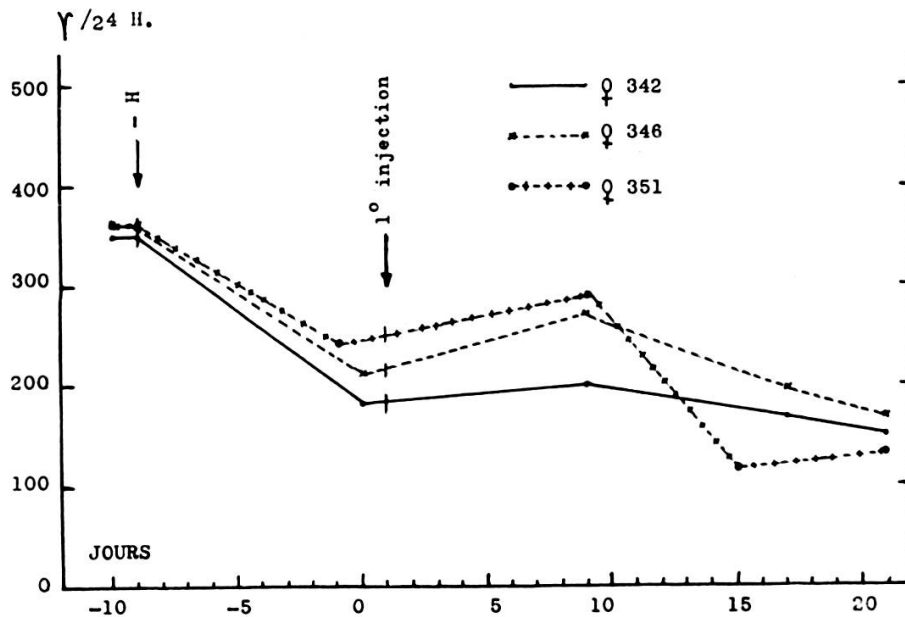


Fig. 8.

Elimination des 17-CS de cobayes femelles hypophysectomisées et traitées par le Physex ( $20 \times 150$  U.I.).

Restent à examiner les deux femelles hypophysectomisées traitées: 347 et 378 présentant, la première un régénérat hypophysaire, la seconde un petit adénome surrénalien.

Femelle 347 à régénérat hypophysaire:

La masculinisation n'a pas été entravée par cette anomalie, mais les mamelons ont fortement réagi, ils sont turgescents et mesurent environ 5 mm.

Les ovaires ont une taille moyenne (302 mg, 54,9%). Ils renferment de nombreux méroxanthosomes et des follicules prélutéiniques. L'index nucléaire est bas (13,6). L'accoutumance incomplète.

Le vagin s'ouvre dès la quinzième injection, il est encore ouvert à l'autopsie, où l'on observe une hypermucification sans leucocytes. Ce rut prolongé confirme bien l'existence d'un reliquat hypophysaire.

Les cornes utérines sont grosses et bien vascularisées. Les surrénales sont grosses (332 mg, 69,5%).

La régénération de trois quarts d'hypophyse bien différenciée est une anomalie peu courante. Nous n'avons pas un reliquat, car l'hypophyse entière avait été prélevée à l'opération et conservée.

Le diagramme des 17-CS (figure 9) est d'abord normal, c'est-à-dire chute après hypophysectomie (de 322 à 210  $\mu\text{g}/24$  heures). Les injections provoquent

une remontée (280  $\mu\text{g}/24$  heures à la huitième injection). A ce moment, au lieu d'un maximum, on observe une montée continue. Le taux se stabilise ou baisse légèrement à la fin du traitement (400 à 426  $\mu\text{g}/24$  heures). Il est vraisemblable que la masculinisation et la régénération de l'hypophyse se succèdent, et qu'elles se traduisent par ce diagramme.

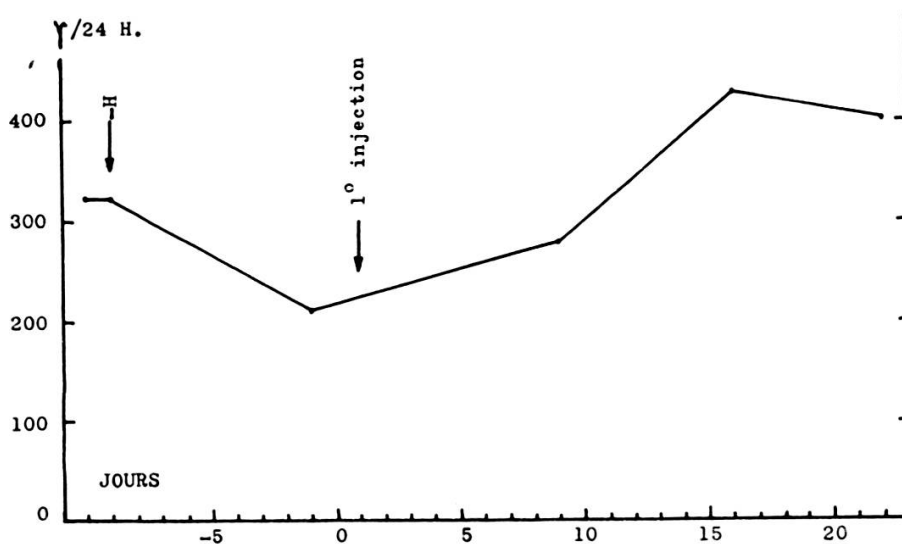


Fig. 9.

Elimination des 17-CS de cobaye femelle hypophysectomisée et traitée par le Physex avec régénérat hypophysaire (femelle 347,  $20 \times 150$  U.I.).

Femelle 378 à adénome surrénalien :

Morphologiquement, on peut dire que cette femelle ressemble beaucoup à la précédente :

La masculinisation est très nette (crochets d'environ 2 mm), les mamelons n'ont pas réagi (absence de reliquat hypophysaire).

Cependant, les ovaires sont énormes (515 mg, 90,3%). Ils contiennent de nombreuses formations : méroxanthosomes, follicules petits, moyens et prélutéiniques. Ils sont mal accoutumés, l'index est bas (11,7).

Le vagin qui ne s'est pas ouvert au cours du traitement est hypermucifié, les cornes utérines grosses et frangées représentent un proœstre sans œdème.

Les surrénales sont petites (176 mg, 30,7%), mais l'une d'elle contient un petit adénome ; or on sait que ce tissu pathologique est capable de sécréter des stéroïdes, et en particulier des androgènes.

Le diagramme des 17-CS (figure 10) est comparable à celui de la femelle 347. Cependant, on note deux maxima : l'un après neuf injections à 431  $\mu\text{g}/24$  heures, correspond sans doute à la masculinisation, l'autre en fin de traitement à 576  $\mu\text{g}/24$  heures, en relation probable avec cette formation surrénalienne. En effet, ce taux élevé de 17-CS est anormal chez une femelle hypophysectomisée, même traitée au Physex.

#### b) Action du Physex : $20 \times 40$ U.I.

1. *Animaux utilisés.* — Deux femelles hypophysectomisées ont été traitées par  $20 \times 40$  U.I. de Physex (femelle 365 et femelle 370). Dans le tableau 15, on

trouve les principales données concernant le poids, l'âge, les cycles et la valeur de l'hypophysectomie.

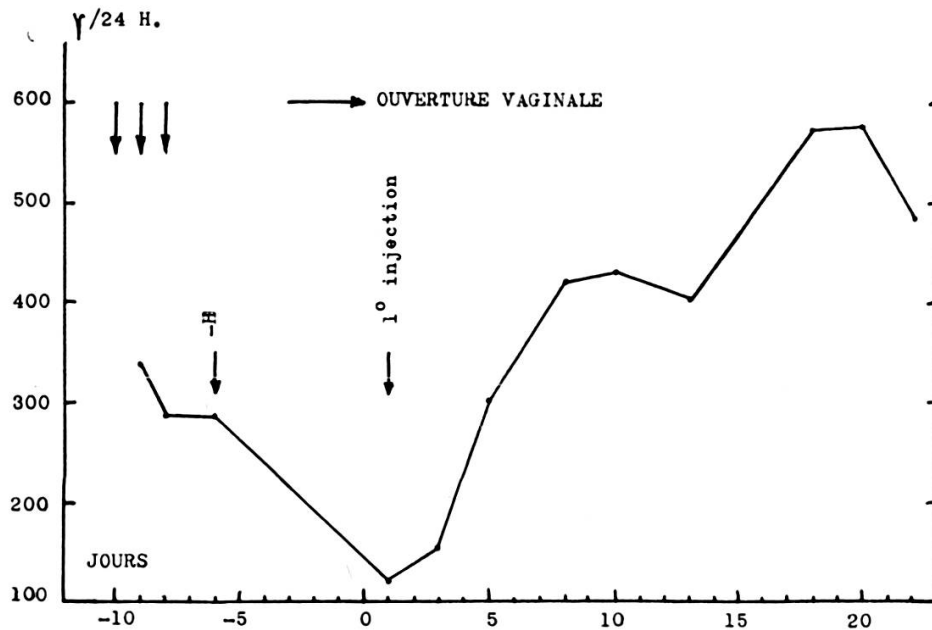


Fig. 10.

Elimination des 17-CS de cobaye femelle hypophysectomisée et traitée par le Physex avec adénome surrénalien (femelle 378,  $20 \times 150$  U.I.).

TABLEAU 15.

*Femelles hypophysectomisées traitées au Physex  $20 \times 40$  U.I.  
0,1 U.I./g de poids du corps).*

Numéro de l'animal	♀ 365	♀ 370
<i>Poids à</i>		
l'hypophysectomie . . . . .	390 g	380 g
la 1 <sup>re</sup> injection . . . . .	430 g	320 g
l'autopsie . . . . .	460 g	405 g
<i>Age</i>	17 sem.	20 sem.
<i>Cycle</i>		
durée du dernier . . . . .	17 j.	20 j.
jour de l'opération le . . . . .	13 <sup>e</sup> j.	4 <sup>e</sup> j.
1 <sup>re</sup> injection après hypophysectomie le . . . . .	7 <sup>e</sup> j.	7 <sup>e</sup> j.
valeur de l'hypophysectomie .	faible reliquat de pars tuberalis	faible reliquat de pars tuberalis

2. *Réactions morphologiques et histologiques.* — La masculinisation s'est très bien développée. Elle débute dès la huitième injection, moment où les éminences blanches deviennent visibles. Puis elles se détachent entre la neuvième et la douzième injection pour donner dès la seizième injection de petits crochets qui atteignent 1,5 à 1,7 mm. On note même quelques odontoïdes chez ces deux femelles. La masculinisation est cependant un peu plus faible qu'avec 150 U.I. Les mamelons ne réagissent pas, ils restent flasques (2,5 à 3,5 mm).

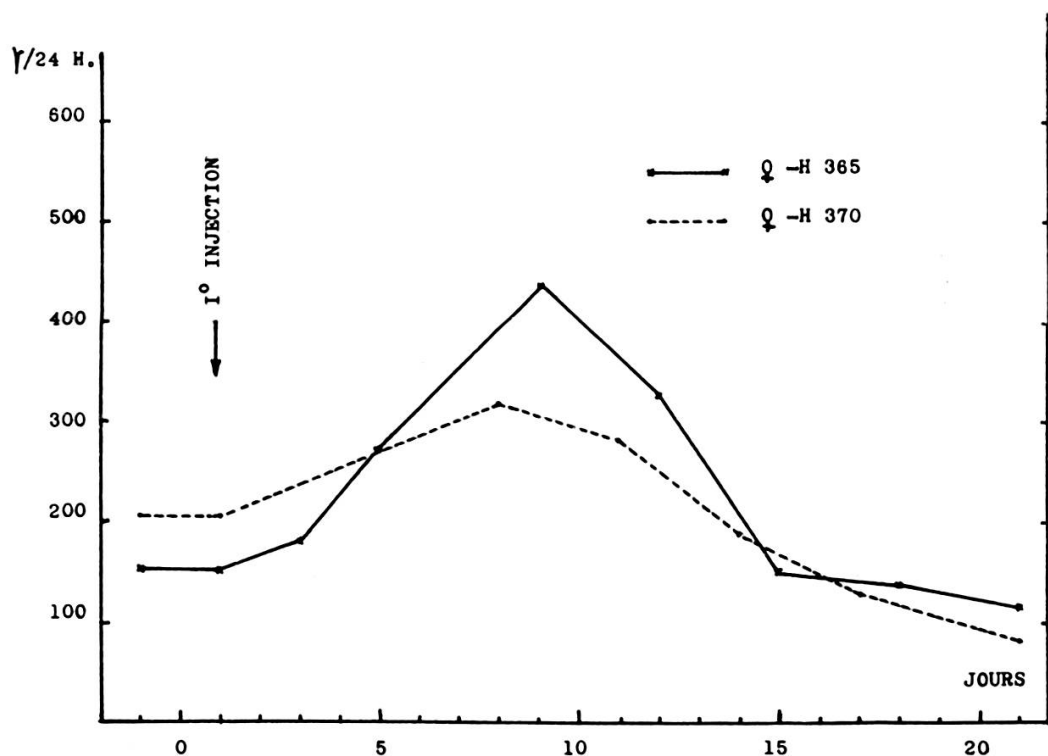


Fig. 11.

Élimination des 17-CS de cobayes femelles hypophysectomisées et traitées par le Physex (20 × 40 U.I.).

Les ovaires sont de poids moyen (140 mg, 30,4%) chez la femelle 365, l'index est remonté à 18,5, ce qui correspond à une accoutumance presque complète. Il y a beaucoup de follicules III moyens, mais pas de méroxanthosomes. Ces ovaires sont hépatisés et crinogènes. Chez la femelle 370, les ovaires sont petits (87 mg, 21,5%), l'index est également bas (24,1), l'accoutumance presque complète. On note également beaucoup de follicules III jeunes et moyens, mais pas de méroxanthosome. Ces ovaires sont crinogènes.

Dans les deux cas, à l'autopsie, le vagin est fermé et présente une hypermucification caractéristique des femelles masculinisées.

Les cornes utérines sont petites à moyennes, mais bien vascularisées. Les surrénales ont bien régressé par suite de l'hypophysectomie (femelle 365: 205 mg, 44,1%; femelle 370: 182 mg, 45%).

3. *Métabolites des androgènes.* 17-CS, fraction A (figure 11). — Chez ces deux animaux, les variations de l'élimination des 17-CS neutres (fraction A) sont caractéristiques de la masculinisation. Tout d'abord l'hypophysectomie provoque

un effondrement rapide des 17-CS. Le taux moyen normal (300 à 400  $\mu\text{g}/24$  heures) tombe à 153  $\mu\text{g}/24$  heures pour la femelle 365 et 208  $\mu\text{g}/24$  heures pour la femelle 370.

Le traitement aux gonadotropes provoque une rapide remontée jusqu'à un maximum qui se situe exactement au moment où la masculinisation se développe (436  $\mu\text{g}/24$  heures après 8 injections chez la femelle 365; 320  $\mu\text{g}/24$  heures après 7 injections chez la femelle 370). Enfin, une chute régulière, jusqu'à la fin du traitement, constitue la dernière partie de la courbe. L'accoutumance aux hormones gonadotropes (puisqu'il s'agit d'animaux pratiquement accoutumés) entraîne un blocage dans l'élimination des 17-CS, après une vingtaine d'injections (118  $\mu\text{g}/24$  heures chez la femelle 365, 83  $\mu\text{g}/24$  heures chez la femelle 370).

c) *Action du Physex*:  $20 \times 10$  U.I.

1. *Animaux utilisés.* — Trois jeunes femelles (P51, P57 et P62), d'environ 18 semaines, ont été hypophysectomisées puis traitées au Physex à raison de 10 U.I. par jour. Les indications concernant ces trois animaux sont consignées dans le tableau 16.

TABLEAU 16.

*Femelles hypophysectomisées traitées au Physex  $20 \times 10$  U.I.  
(0,02 U.I./g de poids du corps).*

Numéro de l'animal	♀ P 51	♀ P 57	♀ P 62
<i>Poids à</i>			
l'hypophysectomie . . .	455 g	440 g	400 g
la 1 <sup>re</sup> injection . . . . .	450 g	500 g	500 g
l'autopsie . . . . .	515 g	585 g	590 g
<i>Age</i>	?	18 sem.	18 sem.
<i>Cycle</i>			
durée du dernier . . . .	18 j.	16 j.	18 j.
jour de l'opération . . .	13 <sup>e</sup> j.	9 <sup>e</sup> j.	14 <sup>e</sup> j.
1 <sup>re</sup> injection après hypophysectomie le . .	12 <sup>e</sup> j.	9 <sup>e</sup> j.	12 <sup>e</sup> j.
valeur de l'hypophysectomie . . .	pas de reliquat	pas de reliquat	pas de reliquat

Il est à noter que ces animaux ont été nourris avec un mélange qui a provoqué quelques modifications quantitatives dans la courbe de poids et des 17-CS. La première est modifiée en ce sens que les animaux grossissent beaucoup plus vite que les autres, et qu'ils augmentent de poids après hypophysectomie (tableau 16). Les 17-CS, au contraire, présentent des taux beaucoup plus faibles que ceux généralement observés. Cependant, un témoin hypophysectomisé (P58) nous a montré

une réaction parfaitement normale, compte tenu de ce faible taux. On peut donc considérer ces courbes du point de vue qualitatif sans tenir compte des valeurs absolues.

2. *Réactions morphologiques et histologiques.* — La dose de 10 U.I. par jour de Physex est une dose très faible. On est à la limite de réaction et les variations individuelles sont particulièrement sensibles. La masculinisation est faible. Les éminences blanches du clitoris deviennent visibles après 8 à 10 injections. Après 20 injections, on observe de petits crochets de 1,5 à 2 mm et quelques fois un début d'odontoides (femelle P57). Cette faible masculinisation n'est pas en relation avec la nourriture, mais uniquement avec la dose de Physex injectée, d'autres animaux nourris normalement ayant présenté la même réaction.

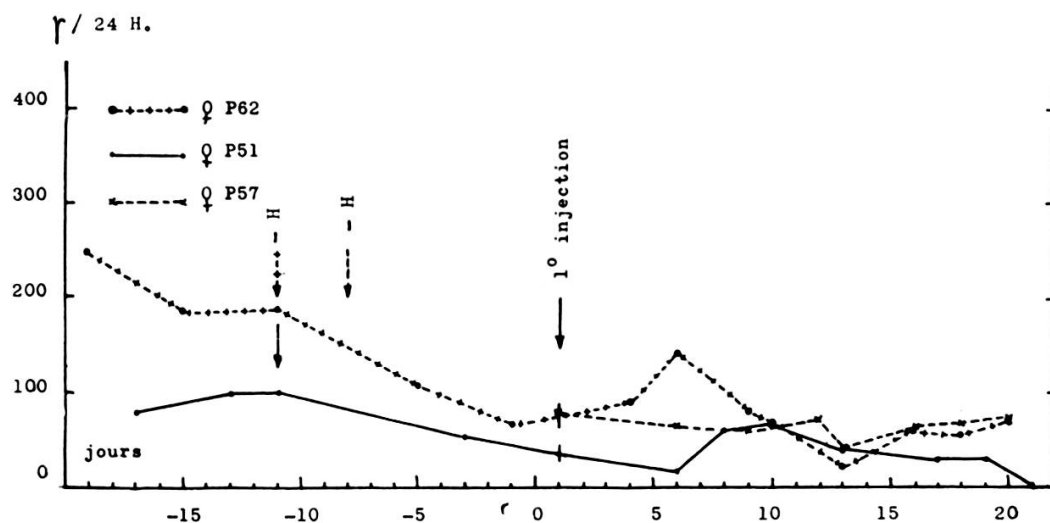


Fig. 12.

Elimination des 17-CS de cobayes femelles hypophysectomisées et traitées par le Physex ( $20 \times 10$  U.I.).

Il n'y a pas de féminisation accompagnant la masculinisation. Les mamelons n'ont pas réagi (2 à 3 mm). Le vagin est resté fermé, il est en diœstre à l'autopsie.

Les ovaires sont chez ces trois femelles très petits (34 à 37 mg, soit 5,8 à 6,6%). Ils sont atrésiés, il y a en général beaucoup de jeunes follicules III. L'index est remonté (30,6 à 33,4). Le tissu théco-interstitiel renferme des lipides, caractéristiques d'une accoutumance quasi complète. On note un corps jaune persistant chez la femelle P57. Les cornes utérines sont aplasiées, filiformes, mais dans les trois cas, bien vascularisées.

Enfin, les surrénales ont bien régressé: femelle P51: 105 mg, 20,9%; P57: 237 mg, 40,5%; P62: 212 mg, 36%.

3. *Métabolites des androgènes.* 17-CS, fraction A (figure 12). — Les dosages ont été affectés dans leur précision par une nourriture mal adaptée. Les taux moyens de 17-CS sont fortement abaissés. Cependant, on note pour les femelles P51 et P62 une chute caractéristique due à l'hypophysectomie. Chez la première, le taux était de 90  $\mu\text{g}/24$  heures avant l'opération. Il tombe à 51  $\mu\text{g}/24$  heures après 8 jours d'hypophysectomie, puis à 35  $\mu\text{g}/24$  heures après 12 jours. Chez la seconde, il

passé de  $220 \pm 32 \mu\text{g}/24$  heures à  $108 \mu\text{g}/24$  heures après 10 jours. On voit donc que les animaux réagissent normalement et que les résultats peuvent être considérés comme valables.

Chez les femelles P51 et P57, les injections de Physex sont sans effet sur les métabolites des androgènes jusqu'à concurrence de 7 à 9 injections. La chute amorcée par l'hypophysectomie continue. On observe un faible maximum (69 à  $74 \mu\text{g}/24$  heures) qui n'atteint même pas le taux normal. Cette valeur se maintient avec de nombreuses fluctuations jusqu'à l'autopsie (femelle P57) ou bien diminue lentement (femelle P51). La femelle P62 réagit un peu différemment. Après 6 injections, on atteint un maximum à  $142 \mu\text{g}/24$  heures. Ce maximum ne correspond pas à la masculinisation comme chez les deux animaux précédents. Le taux reste ensuite faible jusqu'à l'autopsie.

En résumé, on peut dire que les doses quotidiennes de 10 U.I. de Physex sur femelles hypophysectomisées ne provoquent pas un effet spectaculaire de masculinisation accompagné d'une forte montée des 17-CS. Les variations individuelles sont de plus très marquées.

#### *Conclusions concernant les femelles hypophysectomisées traitées au Physex :*

Ici, comme pour les femelles entières, la dose de 40 U.I. par jour pendant trois semaines est la mieux adaptée. On note ainsi une masculinisation nette dès la huitième à dixième injection. En fin de traitement, les ovaires sont fortement crinogènes; on note également une réaction de féminisation (hypermucification) au niveau du vagin. Enfin, la courbe des 17-CS est caractérisée par un maximum d'élimination au moment même où la masculinisation se développe. Tous ces résultats sont confirmés et précisés par l'étude de l'action du Physex sur des femelles surrénalectomisées.

#### *C. Femelles surrénalectomisées.*

##### *Action du Physex : 40 U.I. par jour.*

1. *Animaux utilisés.* — Trois jeunes femelles (136, 137 et 141) de 365 à 385 g ont été opérées d'abord à droite selon la technique habituelle, puis 51 à 56 jours après, du côté gauche. Ces animaux pesaient alors 475 à 540 g.

Notons aussi que 4 à 5 jours avant la surrénalectomie gauche, les animaux reçoivent leur première injection d'aldostérone ( $10 \mu\text{g}$ ) et cortisone ( $30 \mu\text{g}$ ) dans 2 ml d'eau physiologique. Ce traitement sera poursuivi quotidiennement jusqu'à l'autopsie de l'animal. En plus, dès la seconde opération, le traitement est complété par une injection de 2 ml de glucose à 10% et de 40 U.I. de Physex. La femelle 141 a reçu 19 injections de Physex, la femelle 136, 15 injections, et la femelle 137, 14 seulement.

2. *Résultats morphologiques et histologiques.* — Ces trois animaux réagissent exactement de la même façon. La masculinisation se développe normalement, dès la sixième à huitième injection, les éminences blanches du clitoris sont visibles,



les crochets se détachent dès la dixième injection. A l'autopsie, ils mesurent 1 à 2 mm; on observe quelques odontoides chez la femelle 141, qui a reçu 19 injections de Physex.

Les mamelons sont gros et turgescents (3,5 à 5,5 mm). Les ovaires sont moyens à gros (femelle 136: 185 mg, 46%; femelle 137: 160 mg, 31,5%; femelle 141: 85 mg, 21,2%). Histologiquement, ils sont fortement hépatisés, très crinogènes. Après 19 injections de Physex (femelle 141), il y a accoutumance.

Le vagin est peu stratifié, assez mucifié avec quelques leucocytes. Les cornes utérines sont grosses, bien vascularisées avec fibrose.

Notons aussi qu'en fin de traitement, ces animaux présentent des troubles métaboliques importants (surtout hydrominéraux) et que nous avons dû les chloroformer dès l'apparition de la paralysie caractéristique des membres postérieurs et de l'arrière-train qui est survenue plus ou moins précocement dans les trois cas.

TABLEAU 17.

*Cobaye femelle surrénalectomisée et traitée par 19 × 40 U.I. de Physex.*

*Femelle 141.*

Remarques	Ac. glucu- ronique conjugué μég/24 h.	17-CS (μg/24 h.)					
		Frac- tion AB	11- OHE	11- OHA	11- COE	11- COA	E/éA
Avant							
2 <sup>de</sup> surrénalectomie	1,09	153	40	40	55	traces	traces
	1,48	236	55	75	55	traces	traces
Après							
2 <sup>de</sup> surrénalectomie							
5 <sup>e</sup> injection . .	1,00	—	0	0	0	0	35
7 <sup>e</sup> injection . .	0,62	—	0	0	0	0	45
9 <sup>e</sup> injection . .	0,45	—	0	0	0	0	35
12 <sup>e</sup> injection . .	1,11	—	0	0	0	0	35
14 <sup>e</sup> injection . .	0,99	—	0	0	0	0	25
17 <sup>e</sup> injection . .	0,53	—	0	0	0	0	traces

3. *Métabolites des androgènes. 17-CS.* — Les 17-CS n'ont malheureusement pu être dosés régulièrement que chez une femelle (femelle 141). Une seule mesure a pu être effectuée chez la femelle 136. La femelle 137 n'a pu être dosée. Cependant, vu la bonne concordance des résultats morphologiques et histologiques observés chez ces trois animaux, on peut considérer que la femelle 141 représente bien la réaction typique des animaux surrénalectomisés traités par les gonadotropes (tableau 17). De plus, ces résultats correspondent quantitativement avec ceux observés, après le même traitement, chez des femelles hypophysectomisées ou normales.

Ici, il s'agit d'une masculinisation purement ovarienne, les 17-CS trouvés proviennent donc uniquement de l'ovaire.

Après l'ablation de la seconde surrénale, le taux des 17-CS n'est plus mesurable quantitativement, il faut recourir à la chromatographie sur papier. Chez les femelles témoins, on n'observe plus aucun 17-CS en l'absence des deux surrénales. Après injection de Physex, on voit apparaître dès la cinquième injection (peut-être même avant), c'est-à-dire bien avant le début de la masculinisation, une tache importante d'étiocolanolone/épiandrostérone (environ 35  $\mu\text{g}/24$  heures). Le maximum d'élimination de ce stéroïde s'observe aux environs de la septième injection (45  $\mu\text{g}/24$  heures), puis ce taux baisse lentement et après 17 injections, il n'y en a plus que des traces. Ceci correspond à une accoutumance aux gonadotropes exogènes.

Chez la femelle 136, une analyse effectuée à la neuvième injection de Physex montre également la présence de l'étiocolanolone/épiandrostérone (15  $\mu\text{g}/24$  heures) et environ 5  $\mu\text{g}/24$  heures de 11-hydroxyétiocolanolone.

D'après ce que nous savons sur le métabolisme des androgènes chez le cobaye, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle le précurseur actif, cause de la masculinisation, pourrait être la testostérone synthétisée par le tissu crinogène ovarien. En effet, la testostérone administrée à un mâle surrénalectomisé se métabolise surtout en étiocolanolone/épiandrostérone.

#### D. Femelles castrées sans masculinisation.

Afin de démontrer le rôle essentiel de l'ovaire, lors de la masculinisation, nous avons traité des femelles castrées par du Physex et dosé les métabolites urinaires.

Examinons d'abord brièvement ce qui se passe chez la femelle castrée sans traitement. Dans ce but, trois femelles adultes (500 à 600 g) ont été castrées et utilisées comme témoins. Ces opérations ont été contrôlées par l'absence complète d'ouverture vaginale et à l'autopsie par l'absence de reliquats ovariens et un tractus génital fortement régressé. L'une (femelle 381) a été suivie pendant six semaines après l'opération, deux autres (femelle P84 et P87) pendant vingt-six semaines afin de voir si à la longue rien ne se passait. Les résultats sont négatifs, c'est-à-dire que les taux quotidiens d'élimination des 17-CS ne subissent pas de variations significatives, ils sont tantôt au-dessus, tantôt au-dessous d'une valeur moyenne qui est comparable au taux moyen du dioestres.

Voici les résultats obtenus concernant les fractions A:

Femelle 381: Deux ruts espacés de 17 jours ont été suivis avant la castration. Le maximum atteint respectivement 451 et 470  $\mu\text{g}/24$  heures. Le taux moyen de repos est de 284  $\mu\text{g}/24$  heures avec des variations atteignant  $\pm 88$   $\mu\text{g}$  (8 mesures à différents moments du cycle). La valeur moyenne obtenue après castration est de 374  $\mu\text{g}/24$  heures; les fluctuations de  $\pm 72$   $\mu\text{g}$  (5 mesures réparties sur six semaines).

Femelle P87: Un rut a été suivi avant la castration, montrant un maximum à 370  $\mu\text{g}/24$  heures. Le taux moyen de repos est de 240  $\mu\text{g}/24$  heures, avec des variations atteignant  $\pm 39$   $\mu\text{g}$  (3 mesures à différents moments du cycle). Après castration, le taux moyen est de 210  $\mu\text{g}/24$  heures avec des écarts maxima de  $\pm 137$   $\mu\text{g}$  (8 mesures réparties sur 26 semaines).

Femelle P84: Cette femelle n'a pas été suivie avant l'opération. Le taux moyen après castration s'élève à 171  $\mu\text{g}/24$  heures avec des écarts maxima de  $\pm 85$   $\mu\text{g}$  (8 mesures réparties sur 26 semaines).

Ces trois animaux ont été également étudiés par chromatographie sur papier. Comme nous l'avons vu précédemment, la femelle normale élimine peu ou pas du tout de 17-CS occupant la position de l'étiocholanolone/épiandrostérone. Au contraire, cette tache est assez importante chez la femelle castrée. Ainsi, après deux à trois semaines de castration, le diagramme d'une femelle est assez voisin de celui d'un mâle normal. Voici comment se répartissent les différents 17-CS chez la femelle castrée:

11- $\beta$ -hydroxy-étiocholanolone . . . . .	4 parties
11- $\beta$ -hydroxy-androstérone . . . . .	1 »
11-céto-étiocholanolone . . . . .	2 »
11-céto-androstérone . . . . .	1 »
Etiocholanolone ou épiandrostérone . . . . .	1 »

(Moyenne faite sur les trois femelles par chromatographie de 25 fractions A dosées.)

Cette constatation est importante, car nous avons indiqué précédemment que l'ovaire d'une femelle masculinisée en l'absence de surrénales jouait apparemment un rôle analogue à celui du testicule du mâle surrénalectomisé, c'est-à-dire que ces deux organes étaient capables de synthétiser un ou des stéroïdes éliminés dans l'urine sous forme d'étiocholanolone ou épiandrostérone. Il semble qu'inversement, la surrénale en l'absence d'ovaires puisse réaliser les mêmes processus de transformation, qu'elle ne paraît pas effectuer dans les conditions normales. Ceci montre qu'il faut être extrêmement prudent lorsqu'on tire des conclusions à partir d'observations faites sur des animaux entiers. Dans ces dernières conditions, on ne peut plus affirmer à priori si tel ou tel stéroïde provient des gonades ou des surrénales.

Examinons maintenant ce qui se passe chez la femelle castrée traitée au Physex. Notons d'emblée, ici, que la dose a relativement peu d'importance, car on sait depuis longtemps que les gonadotropes n'ont aucune action virilisante sur la femelle castrée.

Deux femelles adultes (383, 384) ont été castrées à 425, à 450 g, puis traitées au Physex ( $20 \times 150$  U.I.) un mois environ après l'opération. On ne note aucune masculinisation, l'élimination des 17-CS contrôlée toutes les 72 heures, oscille autour d'une valeur moyenne, comme pour les femelles castrées non traitées.

Voici les résultats obtenus concernant les fractions A:

Femelle 383: Avant castration, cet animal a été suivi au cours de deux ruts espacés de 16 jours. Les maxima observés d'élèvent successivement à 705 et 469  $\mu\text{g}/24$  heures. Le taux moyen normal est de 279  $\mu\text{g}/24$  heures, avec des variations de  $\pm 25$   $\mu\text{g}$ . Après 24 jours de castration, le taux est à 388  $\mu\text{g}/24$  heures. La valeur moyenne obtenue pendant le traitement au Physex est de 309  $\mu\text{g}/24$  heures, les fluctuations de  $\pm 77$   $\mu\text{g}$  (7 mesures portant sur 3 semaines).

Femelle 384: le taux observé après 33 jours de castration est de  $324 \pm 14$   $\mu\text{g}/24$  heures. La valeur moyenne obtenue au cours du traitement au Physex est de 280  $\mu\text{g}/24$  heures avec des écarts maxima de  $\pm 83$   $\mu\text{g}$  (7 mesures portant sur 3 semaines).

### DISCUSSION.

De ces différentes séries de résultats, on peut tirer les conclusions générales suivantes:

1. La dose de 40 U.I. de Physex par jour pendant 20 jours (soit environ 0,1 U.I. par gramme de poids du corps) semble la mieux adaptée à l'étude des phénomènes de masculinisation du cobaye femelle. Après hypophysectomie, dans les conditions décrites plus haut, on arrive à obtenir des ovaires renfermant du tissu crinogène presque pur. C'est à ce tissu que l'on peut attribuer la sécrétion d'androgènes en l'absence des surrénales. Ce qui confirme les recherches de K. PONSE sur le Rat.
2. Dans ces conditions (surrénalectomie), la masculinisation se développe bien, en général, dès la huitième injection. Elle est accompagnée d'une montée caractéristique des 17-CS urinaires, métabolites des androgènes. Chez la femelle normale, ou hypophysectomisée, il est difficile de distinguer ce qui, au maximum d'élimination des 17-CS, provient de l'ovaire ou de la surrénale.
3. Chez la femelle surrénalectomisée, qui n'élimine pratiquement plus de 17-CS (la totalité des urines de 24 heures ne révèle aucune tache Zimmermann positive), on assiste lors du traitement virilisant à l'apparition de l'étiocolanolone ou épiandrostérone dès la quatrième injection avec un maximum à la sixième (45  $\mu\text{g}/24$  heures). Il en persiste une certaine quantité pendant plus de la moitié du traitement. On observe également des traces de 11- $\beta$ -hydroxy-étiocolanolone comme chez le mâle surrénalectomisé. Ici, nous avons la preuve de l'origine ovarienne de ces

stéroïdes. La femelle surrénalectomisée qui se masculinise présente une élimination de 17-CS comparable à celle d'un mâle surrénalectomisé dont les testicules fonctionnent encore normalement. En se référant aux données du métabolisme de la testostérone chez le cobaye, on peut dire qu'il apparaît très vraisemblable que cette dernière est responsable de la masculinisation d'une part, de l'élimination de l'étiocolanolone ou épiandrosterone et de la 11- $\beta$ -hydroxy-étiocholanolone d'autre part.

4. Les femelles castrées traitées par le Physex ne présentent aucune masculinisation et pas de changement dans l'élimination urinaire des 17-CS. L'ovaire est un rouage essentiel dans le mécanisme de la masculinisation. Vraisemblablement, les gonadotropines exagèrent ou rendent possible une sécrétion androgène.

#### SUMMARY

A short study of the metabolism of a few androgenic steroids or precursors of 17-ketosteroids has been made on normal male guinea pigs. Testosterone, androsterone, dehydroepiandrosterone, epiandrosterone and cortisone have been studied. The fact that there may be a genetic relationship between these steroids and 17-ketosteroids isolated from urine is considered. The 11-oxy-17-ketosteroids most likely derive from the adrenal glands. Etiocolanolone or epiandrosterone come from the gonads.

By means of adrenalectomy, the fundamental role of the adrenal cortex, as well as the less important part played by the gonads in the elaboration of 17-ketosteroids (metabolites of androgens) have been established.

In the absence of the pituitary, the adrenal glands degenerate; the result is that the elimination of urinary 17-ketosteroids is greatly reduced but not suppressed. The composition nevertheless remains normal.

Under the action of chorial gonadotrophins Physex the female guinea pigs rapidly shows signs of masculinization. A three weeks administration of 40 U.I. per day is the most convenient treatment for this study. In the normal hypophysectomized or adrenalectomized treated females, the elimination of the 17-ketosteroids reaches a maximum at masculinization. On the other hand, no changes occur in the castrated treated female. The ovarian origin of urinary 17-ketosteroids in the masculinized female in the absence of adrenal glands is proved.

#### BIBLIOGRAPHIE

##### AUTEURS CITÉS

- BITMAN, J., S. L. COHEN: *J. Biol. Chem.*, **191**, 351, 1951.  
CHAROLLAIS, E. J.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37**, 299, 1955.  
—, O. LIBERT, M. PERRET, D. ROSENBUSCH-WEIHS: *Rev. Suisse Zool.*, **64**, 773, 1957a.  
—, K. PONSE, M. F. JAYLE: *Ann. endoc.*, **18**, 109, 1957b.

- DORFMAN, R. I., R. SHIPLEY: *Androgens*. John Wiley and Sons, N.Y., 1956.
- GUYÉNOT, E.: *Rev. Suisse Zool.*, 53, 1, 1946.
- HUIS IN'T VELD, L. G.: *Acta Endocrinol.* (sous presse), 1960.
- JAYLE, M.-F., L. G. HUIS IN'T VELD, E.-E. BAULIEU, O. CREPY: *Acta Endocrinol.* 21, 115, 1956.
- PONSE, K.: *La fonction androgène de l'ovaire. III<sup>e</sup> réunion des endocrinologistes de langue française*. Masson, éd., 1955a.
- , E.-J. CHAROLLAIS, R. DOVAZ, P. JEANNERET, O. LIBERT, D. WEIHS: *Revue Suisse Zool.*, 62, 214, 1955b.
- ROSENBUSCH-WEIHS, D., K. PONSE: *Rev. Suisse Zool.*, 64, 271, 1957.
- Thèse, Genève (n° 1316), 1960.
- SIMPSON, M. E., C. H. LI, H. M. EVANS: *Endocrinol.*, 48, 370, 1951.

*Station de Zoologie expérimentale, Genève  
et Faculté de Médecine, Paris.*

---

