

<b>Zeitschrift:</b>	Mémoires de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles
<b>Herausgeber:</b>	Société Vaudoise des Sciences Naturelles
<b>Band:</b>	13 (1963)
<b>Heft:</b>	4
<b>Artikel:</b>	Les gonadotropines : connaissances actuelles : méthodes d'extraction : essais de dosages chimiques
<b>Autor:</b>	Weihs, Doris-E.
<b>Kapitel:</b>	B
<b>DOI:</b>	<a href="https://doi.org/10.5169/seals-258311">https://doi.org/10.5169/seals-258311</a>

### 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:** 11.01.2026

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

De plus, il est bien connu que des traces de l'hormone lutéinisante exercent une action synergique sur la stimulation pondérale des organes du tractus génital, puisque cette propriété est mise à profit dans le « test du FSH ». Dès lors, on comprend qu'un abaissement du taux de l'hormone lutéinisante active de la gonadotropine chorionique se fait bien plus sentir que la même inactivation de ce facteur dans un mélange de gonadostimulines tel que l'Anteron (PMS).

## B. DEUXIÈME PARTIE

### I. EXTRACTION DES GONADOTROPINES

Il est évident que ni les exigences, ni les problèmes à résoudre, ne sont les mêmes, suivant qu'on procède à l'extraction des gonadotropines en vue d'un dosage clinique, ou dans un but de recherche pure, tel que l'établissement d'un standard ou l'étude de la constitution de la molécule.

Nous retiendrons principalement ce qui se rapporte aux dosages cliniques (cf. LORAIN 1958). Il est bon d'en rappeler quelques conditions techniques :

- a) pour qu'un dosage soit valable, il faut que l'extraction soit quantitative et reproductible ;
- b) les extraits, souvent très concentrés, ne doivent pas être toxiques (tests biologiques) ;
- c) ils ne doivent pas contenir des stéroïdes contaminants qui pourraient fausser complètement les résultats (test pondéral de la stimulation des cornes utérines) ;
- d) la méthode choisie doit être simple, rapide et peu coûteuse.

N'oublions pas enfin qu'en raison de leurs taux élevés, il est beaucoup plus facile de choisir une méthode d'extraction satisfaisante pour le dosage des gonadotropines chorioniques que pour les gonadotropines hypophysaires humaines, dont les taux normaux sont très bas (10 — 60 UI/24 h). De ce fait, les quantités de ces dernières contenues dans un litre d'urine, respectivement dans l'urine de 24 heures, sont parfois insuffisantes.

Il est très important de pouvoir se fier aux méthodes d'extraction, puisque l'erreur globale introduite par les tests biologiques peut atteindre 30 à 50 % (il faudrait travailler avec 40 à 80 bêtes pour abaisser l'erreur à 10 %). Non seulement des variations individuelles et raciales interviennent, mais encore le régime alimentaire (HEINRICH, EULEFELD 1960) et, pour une grande part, également la saison à laquelle les tests sont entrepris (LORAIN 1957). Il n'est pas inutile de rappeler ces faits, car les fluctuations quan-

titatives des gonadotropines, observées au cours du cycle oestral de la femme, ont parfois été mises en doute par certains auteurs qui les ont attribuées à une mauvaise reproductibilité de la méthode d'extraction choisie (ALBERT, KELLY, SILBER, KOBI 1958 a; Mc ARTHUR, WORCESTER, INGERSOLL 1958; BROWN 1958). Actuellement, la physiologie hormonale semble bien établie et avoir confirmé l'existence d'un maximum d'excrétion à mi-cycle (BORTH, LUNENFELD, DE WATTEVILLE 1957; BROWN, KLOPPER, LORAIN 1958).

### 1) MÉTHODES D'EXTRACTIONS A BUT CLINIQUE

#### a) *Précipitation alcoolique ou acétonique :*

C'est une des plus anciennes méthodes connues (ZONDEK 1931; KLINEFELTER, ALBRIGHT, GRISWOLD 1943, LORAIN 1949). A l'heure actuelle on lui préfère d'autres techniques. Elle présente plusieurs inconvénients, entre autres la toxicité des produits et parfois la présence d'oestrogènes. Des purifications (par exemple par dialyse) entraînent une trop grande perte de matériel, dont le facteur correctif ne peut être calculé avec précision. Par conséquent, cette méthode n'est utilisable que pour des tests de grossesse.

Dernièrement le principe de la précipitation a été repris dans un travail d'intérêt scientifique pur sur les gonadotropines urinaires de castrats et de femmes postménopausiques (BOURRILLON, GOT, MARCY 1960). Les chercheurs ont préconisé l'utilisation de la précipitation alcoolique suivie d'une deuxième extraction au kaolin. Ils constatent que le rendement final, ainsi que l'activité spécifique, sont supérieurs à ceux obtenus avec de l'urine traitée directement par le kaolin.

#### b) *Ultrafiltration :*

Cette technique avait été proposée par GORBMAN (1945). Elle a été réutilisée par VAN GILSE (1955 ; 1957), qui a déterminé un rendement de 80 à 90 %. Mais la confection de la membrane de collodion, dont dépend le succès de l'extraction, est très délicate. De plus, des vérifications ont prouvé qu'elle n'éliminait pas complètement les oestrogènes (DEMOLE, FANARD, BOUTE, LEFÉBURE, SOÈTE 1957 ; DEMOLE, FANARD, SOÈTE, VERVISCH 1957).

#### c) *Adsorption sur différentes matières (à l'exception du kaolin) :*

Pour extraire des gonadotropines chorioniques, KATZMAN, GODFRIED, CAÏN, DOISY (1943) proposent l'adsorption sur *permutite*, suivie d'une élution par l'ammoniaque et d'une précipitation fractionnée à l'alcool. D'autres auteurs (WODON, DUSTIN, BIGWOOD 1951 ; BIGWOOD, WODON 1952) ont modifié cette technique. Ils ont remplacé le permutite par une *bougie Chamberland*. Ces méthodes n'ont pas retenu l'attention générale, et les meilleurs résultats ont finalement été obtenus par l'adsorption par l'*acide benzoïque*, substrat déjà signalé par KATZMAN et DOISY en 1934. La technique originale a souvent été modifiée et comparée à l'adsorption sur kaolin.

BUTT (1957 ; BUTT, INGRAM 1957) estiment que le rendement de l'adsorption par l'*acide benzoïque* est de 80 % pour les gonadotropines hypophysaires. Il apparaît que l'*acide benzoïque* retient plus ou moins sélectivement l'hormone luténisante ; l'hormone folliculo-stimulante, présente dans l'urine de femme enceinte, peut être récupérée par l'adsorption ultérieure sur kaolin (BUTT, CROOKE, INGRAM, ROUND 1957). L'utilisation de l'*acide benzoïque* semble donc tout indiquée dans le cas des dosages cliniques des gonatropines chorioniques. Elle constitue également une excellente méthode lorsqu'il s'agit d'extraire les gonadotropines à grande échelle où l'extraction quantitative n'est pas absolument exigée (industrie).

L'extraction des gonadotropines hypophysaires de l'urine, par exemple de femme postménopausique, rencontre des difficultés sérieuses. L'acide benzoïque n'en retient que 7,2 à 10%.

L'adsorption par l'*acide phénique*, bien qu'à rendement légèrement supérieur (29,5%) et retenant plus de folliculo-stimuline que l'acide benzoïque, doit pourtant aussi être abandonnée, en raison du fait que la destruction de l'hormone lutéinisante est plus marquée qu'avec l'acide benzoïque et devient nettement appréciable (BUTT, INGRAM 1957).

Certains auteurs ont envisagé le remplacement de l'acide benzoïque par l'*acide tannique*. WALTER (1957) cherche à comparer l'adsorption des gonadotropines d'urine de femme postménopausique par l'acide tannique et sur kaolin ; la purification se fait par chromatographie sur colonne. Les difficultés d'établir des comparaisons valables sont flagrantes. Les auteurs observent des différences considérables pour la même méthode d'extraction, suivant le test biologique choisi ; utilisant le test de la prostate ventrale des rats hypophysectomisés, l'adsorption sur kaolin paraît leur donner un rendement plus élevé. JOHNSON (1958), non satisfait des résultats fournis par l'acide tannique seul, lui ajoute de l'Hyflo-Supercel. L'élution se fait par l'acétate d'ammonium. L'ensemble des manipulations ne prend pas plus d'une heure, ce qui serait parfait en vue d'un dosage clinique. Cependant, la récupération n'atteint, en moyenne, que 66% malgré la faible quantité de matière inerte entraînée. Notons que ces expériences ont été effectuées avec des surcharges utilisant six fois la quantité normale excrétée par l'homme. Au cours de cette même étude, l'auteur a été en mesure de démontrer qu'une faible albuminurie déjà compromet l'extraction. On savait que les albumines, les globulines et les différentes muco-gluco-protéines acides insolubles gênent l'extraction, mais la quantité limite tolérable n'avait encore jamais été mesurée. JOHNSON limite les taux à 0,5 g par litre d'urine ; l'évaluation des gonadotropines est impossible dès que les albumines atteignent ou dépassent un gramme.

Certains groupes de chercheurs ont estimé que l'extraction par adsorption sur kaolin n'est pas quantitative et que l'élution, en milieu fortement alcalin, dénature les gonadotropines et plus particulièrement l'hormone lutéinisante. BUTT et CROOKE (BUTT 1958 ; BUTT, CROOKE, CUNNINGHAM 1958, 1959) ont mis au point une technique utilisant un *mélange d'acide tungstique et d'acide benzoïque*. L'activité spécifique du produit d'extraction est bonne. Ils comparent le rendement par tests biologiques, en attribuant un rendement de 100% à la méthode au kaolin. Dans leurs essais, peu nombreux, la dispersion est énorme. Pour les gonadotropines totales, ils trouvent une moyenne de 163% (81-320%), et pour l'hormone folliculo-stimulante 157% (65-410%).

#### d) *Adsorption sur kaolin :*

La nécessité s'est fait sentir d'établir une méthode standard qu'adopteraient tous les laboratoires pour l'extraction des gonadotropines hypophysaires, en vue d'un dosage quantitatif permettant un diagnostic clinique. ALBERT et LORAINNE se sont attaqués à ce problème. Il est regrettable de constater que ni l'une ni l'autre des deux méthodes proposées ne se soit encore imposée.

L'adsorption sur kaolin suivie d'une élution et d'une précipitation acétonique ou alcoolique, a constitué, finalement, la base même des extractions des hormones gonadotropes non chorioniques. Suivant les besoins, la poudre obtenue est soumise à une détoxication ou à une purification (SCOTT 1941 ; DEKANSKI 1949 ; BRADBURY, BROWN 1949 a ; 1949 b ; LORAINNE 1950 ; BENARD, CRUZ-HORN, MOREAU, LALANDE, RAUBERT 1952 ; Mc ARTHUR 1952 ; LORAINNE, BROWN 1954 ; 1956, etc.). ALBERT (1955) utilise une chambre à pression et certains détails techniques diffèrent de ceux de LORAINNE. Il est intéressant de noter que les essais de récupération à partir d'urines diluées se sont révélés bons, si l'on prend soin de ramener la densité de l'urine à 1,025 avec du NaCl. Toutefois, si l'émission quotidienne

dépasse cinq litres, l'extraction des gonadotropines devient impossible (ALBERT, SILBER 1957 ; ALBERT, ROSENBERG 1959).

La technique d'ALBERT a été reprise par ALEXANDRITIS, APOSTOLAKIS et VOIGT (1958) et légèrement modifiée pour la rendre moins coûteuse. Une comparaison entre le rendement obtenu après précipitation alcoolique (très variable, plus de 200 %) et après adsorption sur kaolin (70-105 % ou 40-60 %, suivant le test biologique utilisé) parle en faveur de la méthode au kaolin, qui amène moins de matières inertes au stade final et qui est plus reproductible.

La méthode de LORAIN (LORAIN, BROWN 1954 ; LORAIN 1957 ; 1958 ; LORAIN, BROWN 1959), connue sous le nom « kaolin-acétone », insiste avant tout sur la nécessité de respecter les valeurs de pH indiquées au cours des différentes manipulations (adsorption, élution, précipitation). La détoxication se fait avec du phosphate tricalcique, soit dans un bêcher, soit sur colonne. Les expériences de surcharge, doublant le taux normal des gonadotropines présentes dans l'urine, démontrent que la récupération moyenne atteint 76 % (52-92 %).

Récemment, HEINRICHS et EULEFELD (1960) ont consacré une étude à la comparaison des deux méthodes standards proposées. Ils donnent la préférence à celle d'ALBERT, dont les extraits sont environ trois fois plus concentrés, tout en étant moins toxiques que ceux obtenus par la méthode de LORAIN.

## 2) MÉTHODE D'EXTRACTION A BUT SCIENTIFIQUE PUR

Nous n'entrerons pas dans les détails concernant les préparations gonadotropes extraites à partir d'hypophyses animales (STEELMAN, SEGALOFF 1959) ou d'hypophyses humaines (LI, 1958 ; RIGAS, PAULSEN, HELLER 1958). Mais nous ne pouvons passer sous silence les études faites sur le plasma humain, d'autant plus que pour les tests de grossesse on préfère injecter aux animaux, dans certains cas, du sérum et non de l'urine.

L'intérêt de l'étude d'ATONIADES, PENNEL, Mc ARTHUR, INGERSOLL, ULFELDER, ONCLEY (1957) n'est pas d'ordre clinique, puisque les auteurs partent de 300 litres de plasma et qu'ils cherchent à savoir si les deux activités biologiques sont liées à une ou deux molécules. Ils concluent que, même s'il y a deux molécules, leurs caractéristiques physico-chimiques (solubilité, etc.) paraissent identiques et liées aux  $\gamma$ -globulines, respectivement à la partie  $\beta$ -lipo-protéique.

A ce sujet, signalons les conclusions opposées du groupe de BOURRILLON. Au cours d'une étude sur le sérum de jument gravide tout se passe comme si les gonado-stimulines étaient principalement liées à l' $\alpha_2$ -globuline et, dans une moindre mesure, aux  $\beta$ - et  $\gamma$ -globulines (BOURRILLON, GOT, MARCY 1958).

Ce même groupe s'est donné pour tâche d'obtenir, à partir de gonadotropines chorioniques, l'hormone « HCG » à l'état pur, sans se limiter par les quantités d'urine nécessaires. Il ne s'est pas non plus préoccupé de l'hormone folliculo-stimulante volontairement éliminée progressivement en cours d'opération, et non récupérée. Le schéma de l'extraction comprend une première adsorption par l'acide benzoïque, suivie d'une extraction aqueuse à pH 4,5, d'une extraction hydro-alcoolique et d'une précipitation au point iso-électrique. Ce n'est qu'à ce stade-là que l'adsorption sur kaolin est in-

tercalée. Différentes chromatographies sur échangeurs d'ions représentent la partie de purification poussée, qui se termine par une électrophorèse sur amidon (GOT 1959).

### 3) EXPÉRIENCE DE RÉCUPÉRATION PONDÉRALE

Ayant eu connaissance du travail de GOT (1959), fait à l'échelle industrielle, le Dr NEUKOMM nous a suggéré l'application de ce mode d'extraction pour étudier le rendement pondéral des différentes étapes, en partant de quantités d'urine ne dépassant pas le cadre clinique, et sans s'attarder aux tests biologiques. Sachant que les différentes muco-protéines urinaires peuvent entraver l'extraction des hormones protéiques et que la quantité, ainsi que la nature, de ces substances gênantes varient d'une récolte d'urine à l'autre, nous avons préparé une solution dont la composition se rapproche des normes urinaires. Son résidu sec est d'environ 54 grammes par litre. On prépare cinq litres de solution à la fois, laisse décanter une nuit et filtre avant l'extraction. Cette solution est appelée « urine synthétique » (tableau 9).

TABLEAU 9  
*Composition de l'urine synthétique (U. S.)*

Substances	g/1000 ml	Observations
NaCl	15.0	
KCl	3.5	
CaCl <sub>2</sub>	0.2	
MgCl <sub>2</sub>	0.15	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.0	
saccharose	1.5	c certains phosphates précipitent à saturation
acides aminés libres (l-Tyrosine)	0.5	
protéines (γ-globulines bovines)	0.03	
urée	30.0	

Nous avons envisagé quatre séries d'expériences :

- 1) Extraction d'un « pool » d'urine d'hommes normaux.
- 2) Extraction d'un « pool » d'urine d'hommes normaux avec surcharge de gonadotropines.
- 3) Extraction de l'« urine synthétique ».
- 4) Extraction de l'« urine synthétique » avec surcharge de gonadotropines.

En vue de surcharges, on a mélangé de façon homogène 500 mg d'Antex lyophilisé (1 050 UI/mg) et 500 mg d'Anteron non lyophilisé (1 100 UI/mg). Ce mélange constitue notre stock de gonadotropines sériques. La surcharge, exprimée en activités biologiques, est énorme, puisque seule la récupération pondérale est en jeu. L'adjonction est uniformément de 20 mg par litre, soit 21 500 UI.

Nous avons toujours travaillé avec des parties aliquotes d'un litre. La solution à analyser est amenée au pH 4,5 en vue de l'adsorption par l'acide benzoïque en solution saturée dans l'acétone. Après filtration, le filtrat est, si possible, soumis à l'extraction « kaolin-acétone » selon LORAINNE ; quant au résidu, il constitue l'extrait brut de gonadotropines après dissolution de l'acide benzoïque dans l'acétone. En raison du faible poids de nos extraits, seuls les trois premiers stades de la purification selon le schéma de Got ont pu être effectués :

- extraction aqueuse par un tampon acétate de pH 4,5 et reprécipitation acétone ;
- extraction hydro-alcoolique à pH 4,5 en amenant le titre d'alcool du liquide de dissolution à 55% puis à 80% ; on recueille une poudre blanche ;
- précipitation alcoolique au point iso-électrique, après dissolution du résidu précédent dans de l'acide acétique 0,5 N et à pH 3.

Tous les précipités sont lavés, puis séchés sous vide sur du chlorure de calcium.

Nous avons obtenu les mêmes pourcentages que Got et récupéré les mêmes quantités de substances en passant d'une étape à l'autre. Les résultats pondéraux sont résumés dans le tableau 10.

Cette étude a démontré qu'on récupère en moyenne 75% des 20 mg ajoutés à l'urine synthétique par l'extraction à l'acide benzoïque. Qu'il s'agisse des « pool-témoins » ou des témoins isolés de la deuxième série, les résultats obtenus avec l'urine d'homme sont beaucoup moins concluants.

Malheureusement cette impression s'accentue lorsqu'on compare les poids des extraits de la série témoin 1 avec la série 2 ayant reçu une surcharge d'hormone. Les variations d'un pool à l'autre sont énormes. Les rendements diffèrent à l'intérieur d'une même série lorsque les « 6 × 1 litre » n'ont pu être extraits le même jour. Vraisemblablement, les variations de température, de faibles écarts de pH, en sont responsables. Même en l'absence de tests biologiques, il est possible de conclure que le schéma original de Got, excellent pour des études d'intérêt scientifique pur, n'est pas utilisable en clinique. Soulignons que l'auteur a dû procéder à 8 stades pour obtenir le facteur « HCG » hautement purifié.

## II. PURIFICATION DES GONADOTROPINES

La simple extraction des gonado-stimulines est souvent insuffisante, car les produits obtenus, encore fortement contaminés par des protéines inertes, sont toxiques aux fortes doses pour les animaux. Des purifications successives se sont imposées surtout dans le cadre des recherches scientifiques. A cet effet, différents groupes de chercheurs ont utilisé des chromatographies et des électrophorèses, soit répétées, soit alternatives, soit combinées. A partir d'un

TABLEAU 10.

*Expériences de surcharges dans de l'urine d'homme et de l'« urine synthétique ». Résultats pondéraux des quatre premières étapes d'extraction d'un mélange de gonadotropines sériques.*

Série d'expériences	Kaolin		Extraction à l'acide benzoïque		Extraction aqueuse		Extraction hydro-alcoolique		Précipité au P. I. E.	
	Moyenne mg	%	Moyenne mg/l;	%	Moyenne mg	mg/l;	Moyenne mg	mg/l;	Moyenne mg	mg/l;
1.	170,7		345,0		35,3		23,5		19,7	
	180,2	208;	296,0	100 %	30,1		18,9		16,5	
	231,8	208;	260,2	296;	32,6	33,7;	11,4 %	22,6	18,9	19,2;
	218,9		282,7		44,3		29,2		23,7	
	238,3		178,5 *		26,5		20		17,3	
	140,1		101,3		32,8		22,7		19,8	
	150,7	157,8;	150 %	103,9	105,5;	100 %	34 %	27,1;	19,5	19,6;
	158,2		93,6		30,1	35,7;	34 %	29,2	23,1	72,5 %
2.	110,9		232,3		44,4		19,5		16,1	
	222,2		84,5		16,2		29,2		23,1	
					35,1		3,9		3,2	
							10,2		6,5	
2.	109,1		181,1		6,8 *		2,5		3,0	
	152,6		312,5		36,8		19,8		—	
	279,7	246,9;	122 %	157,1	202,1;	100 %	36,9;	13,3 %	13,4	36,5 %
	388,8		143,9		25,3		10,1		9,5	7,9;
	304,0		185,7		41,9		11,1		7,2	
	223,1		122,8		28,9		9,7		7,1	
	218,9	213,6;	184 %	114,4	26,9		9,3		6,9	
	246,3		119,2	116,7;	100 %	37,7	30,4;	26 %	11,2	9,8;
—	116,5		116,5		29,7		9,4		7,7	7,1;
	—		110,7		29,1		9,4		7,2	72,5 %
—	—		—		—		—		6,8	

3.	—		19,3		0,2		
	—	25,1	24;	100 %	0,6	2,5 %	
	—	25			0,7		
	—	26,5			0,2		
4.	—	23,9					
	31,3		39,5		5,2		
	37,0		40,8		5,6		
	35,1	36,4;	88 %	41,2	5,6;	13,5 %	
	42,2			44,2	5,9		
	36,5		21,3 *		2,3		
						2,7	1,8
						2,9	1,4
						3,0	2,0
						2,7	2,3
						1,9	0,9

\* Perte mécanique.

#### *Composition des séries d'expériences*

Série 1 : Extraction d'un « pool » d'urine (témoins I).

On a recolté d'abord cinq litres d'urine, puis trois litres de moindre densité. Dans cette série figurent aussi les deux témoins des groupes de la deuxième série.

Série 2 : Extraction d'un « pool » d'urine avec surcharge d'hormone gonadotrope sérique.

On a récolté six litres puis quatre litres d'urine. On préleve un litre de chaque groupe pour obtenir les valeurs témoins. 100 mg, respectivement 60 mg, du mélange de PMS sont ajoutés aux cinq, respectivement trois, litres restants.

Série 3 : Extraction de cinq litres d'« urine synthétique » (témoins II).

Série 4 : Extraction de cinq litres d'« urine synthétique » avec surcharge d'hormone gonadotrope sérique.

On ajoute 100 mg du mélange de PMS.

certain degré de pureté, les éluats provenant des chromatographies et des électrophorèses ont été soumis systématiquement à des analyses chimiques, complétées souvent par des tests biologiques. Les protéines ont été dosées principalement par leur absorption dans l'UV, par la ninhydrine et le Folin.

### 1) LA CHROMATOGRAPHIE

#### a) *But clinique :*

En 1951, SWINGLE et TISELIUS ont proposé l'utilisation du phosphate tricalcique comme matériel d'adsorption pour les protéines. Il est donc tout naturel que ce moyen-là ait servi à des essais de séparation des deux hormones gonadotropes (BUTT, CROOKE 1952; BUTT, CROOKE 1953; CROOKE, BUTT INGRAM, ROMANCHUCK 1954; INGRAM, BUTT, CROOKE 1954).

Les résultats des premiers essais étaient concluants. Il semblait que le dosage clinique avait trouvé sa voie. Malheureusement, des études d'intérêt scientifique, permettant de travailler avec des quantités de gonadotropines plus importantes, ont indiqué clairement l'erreur des conclusions hâtivement tirées (BUTT 1955).

Lors des premières expériences, les colonnes de chromatographies étaient élues d'abord par du  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,002 M), donnant un pic « GA », puis par du  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (0,02 M), donnant un second pic, « GB ». Sur des extraits bruts, la séparation en deux zones brunes pouvait être suivie à l'œil. Les vérifications par la ninhydrine étaient bonnes. L'urine de femme enceinte fournissait un faible pic « GA » à activité folliculo-stimulante, et un pic « GB » important, à activité lutéinisante.

Les expériences ont été répétées avec des gonadotropines extraites d'urine de femmes postménopausiques, d'enfants entre deux et quatre ans, d'une femme atteinte de la maladie de Simmons, et d'un homme présentant un panhypopituitarisme.

La fraction « GA », préparée en becher par double extraction du phosphate tricalcique par le phosphate disodique a été soumise aux tests biologiques. A la suite de cette vérification, BUTT et CROOKE ont eux-mêmes reconnu qu'une activité lutéinisante accompagnait l'hormone folliculo-stimulante. Ils notent également qu'une agitation de dix minutes est suffisante; prolongée à une heure, elle entraîne une perte d'activité non négligeable. Pourtant, l'emploi du phosphate tricalcique a été recommandé comme agent détoxifiant (LORAINNE, BROWN 1954). Actuellement, on lui préfère l'Amberlite ou différents types de cellulose (DEAE, CM, etc.). Ces matières permettent une élution moins brutale (pH, force ionique), par conséquent la perte de substance est moins importante (BUTT 1958).

L'étude chimique approfondie du « GA » par chromatographie sur colonne de Hyflo-Supercel (système : butyl-cellosolve-phosphate de potassium - eau) met encore en évidence un fait important : les dosages des éluats à la ninhydrine et par l'absorption en U.V. ne concordent pas nécessairement. Des altérations chimiques, différentes suivant les méthodes employées, sont responsables de la dissimilitude des résultats.

b) *But scientifique pur :*

1<sup>o</sup> *Les gonadotropines urinaires.* — Peu ou pas limitée par les quantités de matériel disponible, la chromatographie sur colonne a été abondamment exploitée, et plus particulièrement les colonnes d'échangeurs d'ions, de résines ou de différents types de cellulose (cf. PETERSON, SOBER 1956).

JOHNSON (1955 a, 1955 b) par exemple, traite 40 litres d'urine de femme postménopausique par du Cabunite qu'il élue par l'acétate d'ammonium alcoolique avant de purifier par fractionnement au sulfate d'ammonium saturé. KLINGSÖYR et STÖA (1955) utilisent les mêmes éluants pour le Decalso. Signalons les études comparatives portant sur les gonadotropines de l'urine d'homme, de femme postménopausique, ainsi que sur les deux standards HMG-J<sub>3</sub> et HMG-20A. Les gonadotropines, extraites selon la méthode acide benzoïque-acide tungstique, sont chromatographiées sur de la DEAE-cellulose. On constate que l'urine d'homme contient proportionnellement plus d'hormone lutéinisante que les trois urines postménopausiques, identiques entre elles. Cependant, la séparation FSH-ICSH n'est qu'esquissée. La fraction éluee contient principalement de la folliculo-stimuline avec une forte proportion d'hormone lutéinisante. La fraction adsorbée, au contraire, est constituée de ICSH contaminé par du FSH. Les pertes de substance sont énormes, puisque la récupération est de 60% en bécher et de 15% seulement en colonne (système : acétate d'ammonium 0,01 M- 0,2 M- 0,5 M et 0,5 M en présence de NaCl 0,2 M. BUTT, CROOKE, CUNNINGHAM 1959 b).

La DEAE-cellulose est également citée par SEGALOFF et STEELMAN (1959). Les auteurs confirment les résultats de BUTT, et, de plus, observent une activité plus élevée dans les fractions obtenues à partir d'hypophyses humaines que d'urine.

La DEAE- et la CM-cellulose ont été utilisées dans le cadre des travaux sur l'urine postménopausique. Les chercheurs insistent sur la non-séparation des deux hormones ainsi que sur la grande perte d'activité biologique au cours des purifications (BOURRILLON, GOT, MARCY 1959 b). L'utilisation de Decalso ou de Dowex leur paraît plus judicieuse. Pourtant, l'électrophorèse libre révèle encore la présence d'un mélange des deux constituants de gonadotropines. Ce n'est qu'après une nouvelle purification par électrophorèse sur amidon qu'il a été possible de conclure à l'homogénéité de la substance grâce à l'immuno-électrophorèse (BOURRILLON, GOT, MARCY 1960).

On peut se demander s'il faut imputer les demi-succès de ces séparations aux méthodes d'extraction ou à l'accumulation des difficultés dues au choix de la matière première, l'urine.

2<sup>o</sup> *Les gonadotropines hypophysaires humaines.* — Depuis quelques années, le nombre des études entreprises avec des hypophyses humaines est allé en augmentant. Nous ne citerons ici que quelques travaux.

STEELMAN, SEGALOFF et ANDERS (1959) utilisent la CM-cellulose. Ils distinguent une première fraction « A », élue par l'acétate d'ammonium (0,01 M), représentant le 80% de l'hormone folliculo-stimulante contaminée par une activité lutéinisante et une fraction « B », élue par l'acétate d'ammonium (1 M), constituée par de l'hormone lutéinisante presque pure.

LI, SQUIRE, GRÖSCHL (1960) procèdent d'abord à l'électrophorèse sur amidon, puis à la chromatographie sur DEAE-cellulose. L'élution se fait avec des solutions de phosphate à molarité croissante (0,05 M-0,1 M-0,2 M). Les substances recueillies se distinguent par un très haut degré de pureté. Il semble qu'on puisse parler d'une certaine spécificité du matériel de chromatographie : la DEAE-cellulose fournit de meilleurs résultats pour la folliculo-stimuline et l'Amberlite pour

l'hormone lutéinisante (LI 1960). LI souligne la flagrante dissemblance des constantes physico-chimiques des deux gonadotropines hypophysaires humaines par rapport à celles des hormones hypophysaires de mouton.

Roos et GEMZELL (1960) ont complété deux chromatographies successives, faites respectivement sur de la CM-cellulose et de la DEAE-cellulose, par une électrophorèse. Ainsi ils parviennent également à une folliculo-stimuline d'origine hypophysaire humaine extrêmement pure.

### *3<sup>e</sup> Les gonadotropines hypophysaires animales. —*

En 1958, STEELMAN rapporte quelques observations au sujet de *l'hormone folliculo-stimulante d'hypophyses de porc*. Des solutions de phosphate de concentration croissante (0,01 M - 0,04 M, 0,2 M) sont utilisées pour l'éluation fractionnée des colonnes d'hydroxyl-apatite. Les éluats, analysés en UV, révèlent trois fractions, dont la deuxième est biologiquement active. A l'ultra-centrifugation, elle paraît être constituée de deux composés. Or, la substance active est instable. Assez curieusement, la perte d'activité fait augmenter fortement la première fraction et, dans une moindre mesure, aussi la troisième.

Les recherches de Woods et SIMPSON (1960) sur *l'hormone folliculo-stimulante de l'hypophyse de mouton* indiquent la persistance des facteurs contaminants après chromatographie sur DEAE-cellulose. Les conditions dans lesquelles les expériences ont été menées ne semblent pas favorables à une deuxième chromatographie : les auteurs récupèrent 60-75 % d'activité au premier passage et seulement 20 % au deuxième.

Ce sont les résultats des études de *l'hormone lutéinisante*, extraite d'*hypophyses de mouton*, qui ont été les plus inattendus. L'électrophorèse de certaines fractions, obtenues sur colonne d'Amberlite (éluation par le phosphate de potassium 0,2 M à pH variable), dosées par absorption en UV, a fait apparaître la présence de deux hormones lutéinisantes, appelées  $\alpha$ -ICH et  $\beta$ -ICH (SQUIRE, LI 1959).

Un autre groupe (WARD, MC GREGOR, GRIFFIN 1959) obtient des résultats analogues avec une colonne de CM-cellulose. L'hormone folliculo-stimulante est éluée par un tampon phosphate 0,005 M à pH 6,0 et les impuretés par un tampon phosphate 0,01 M à pH 7. Ensuite, la même colonne est traitée par un tampon borate 0,04 M. La première fraction lutéinisante, appelée LH<sub>1</sub>, sort au pH 8, la seconde, appelée LH<sub>2</sub>, après adjonction de NaCl 0,2 M au tampon borate 0,04 M. Diverses vérifications, telles que la rechromatographie des substances éluées et des tests biologiques, indiquent que le LH<sub>1</sub> n'est pas stable et se convertit en LH<sub>2</sub>. Les auteurs cherchent alors à caractériser le LH<sub>2</sub>.

### *4<sup>e</sup> Les gonadotropines sériques animales. — Tout comme dans les extraits urinaires humains, on n'a pas encore réussi à séparer les deux gonadotropines présentes dans le sérum de jument gravide.*

BOURRILLON et GOT (1957) ont fait ressortir très clairement que l'hétérogénéité de la substance n'apparaît qu'à partir d'un certain degré de purification atteignant au moins 5000 UI/mg. En dessous de cette valeur limite, des associations de molécules empêchent toute séparation, ce qui a été confirmé par LEGAULT, CLAUSER et JUTISZ (1958). Ces derniers avaient abandonné la DEAE-cellulose en raison de son mauvais rendement (35 %) au profit de la permutite (90 %) et complété la chromatographie par l'adsorption des protéines inertes sur du carbonate de baryum. Malgré ces opérations successives, ils n'ont pas mieux abouti à la séparation des deux activités biologiques des gonadotropines sériques.

#### *c) Contribution à l'étude de la séparation chromatographique des deux activités gonadotropes :*

Nous avons utilisé la chromatographie sur phosphate tricalcique lavé avec une solution physiologique et élué par du Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,002 M puis du Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,02 M. Le premier essai avec une substance brute, c'est-à-dire de l'urine de femme enceinte extraite à l'acide benzoïque,

a confirmé l'apparition de zones brunes éluées séparément. Ces zones, dont nous n'avons pas déterminé la nature, étaient bien visibles à l'œil, mais rendaient le dosage des éluats en UV impossible.

Les expériences ont été effectuées avec des substances commerciales, donnant des éluats incolores en l'absence de zones visibles :

**1<sup>o</sup> chromatographie de Primogonyl (PU; pose 5000 UI) : fig. 4.**

La hauteur des deux pics est presque identique aussi bien à l'UV qu'au Folin. Des mesures par polarographie semblent indiquer qu'une plus forte quantité de substance est éluée par le  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , mais les ions sodium gênent la mesure. Dans l'ensemble, les trois courbes de dosage concordent ;

**2<sup>o</sup> chromatographie d'Anteron et test biologique des éluats (PMS; pose 5000 UI) : fig. 5.**

Les conditions de travail sont toujours les mêmes. On voit apparaître les mêmes deux pics de l'expérience précédente en absorption dans l'UV à 280 m $\mu$ . Les éluats sont réunis en fonction de la courbe de dosage, lyophylisés et testés sur femelles de souris impubères. Il apparaît clairement que les deux pics ne correspondent pas aux deux activités recherchées. Seul le premier, élué par  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , stimule les ovaires. Le deuxième pic, mieux délimité et plus important, correspond à des impuretés protéiques pouvant être soit des artefacts d'extraction, soit des substances ajoutées à l'extrait pour le rendre injectable.

Nous pouvons parfaitement admettre que la majeure partie de l'hormone soumise à la chromatographie est éluée par les premiers ml du phosphate disodique. Les ml suivants ne font qu'augmenter le pourcentage de récupération, mais ne contiennent plus qu'une faible part des substances adsorbées. Or, les animaux recevant les éluats réunis correspondant au premier pic (et donc aux premiers ml) présentent une réaction FSH/LH mixte forte. Les animaux du deuxième groupe, recevant l'équivalent des 10 ml qui suivent où aucun pic ne s'inscrivait à l'UV, montrent tout au plus une stimulation folliculaire faible, voire physiologique. Cette expérience a été répétée avec de l'Antex (pose 6000 UI), et les résultats en sont les mêmes.

**3<sup>o</sup> Double-chromatographie d'Anteron (pose 2  $\times$  5000 UI) : fig. 6.**

On nous a demandé de vérifier si le deuxième pic dans l'UV, correspondant à l'élution par du phosphate trisodique et qui s'avère inactif, ne contient pas une protéine pouvant éventuellement servir d'entraîneur. Une double-chromatographie devait résoudre le problème :

Sur une première colonne, lavée au  $\text{NaCl}$  à 8 %, on pose 6000 UI d'Antex, respectivement 5000 UI d'Anteron. On élue par le phosphate disodique. Les éluats, recueillis par fractions de deux ml, sont dosés à l'UV. L'éluat trisodique entraînant la substance inerte est recueilli *in toto*. Sur une deuxième colonne, lavée également au  $\text{NaCl}$  à 8 %, on pose la même quantité de substance que sur la première. Mais au lieu d'éluer par des solutions fraîches de phosphate di- et trisodique, on fait passer directement le  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  provenant de la première colonne. On recueille à nouveau des fractions de deux ml qu'on analyse à l'UV.

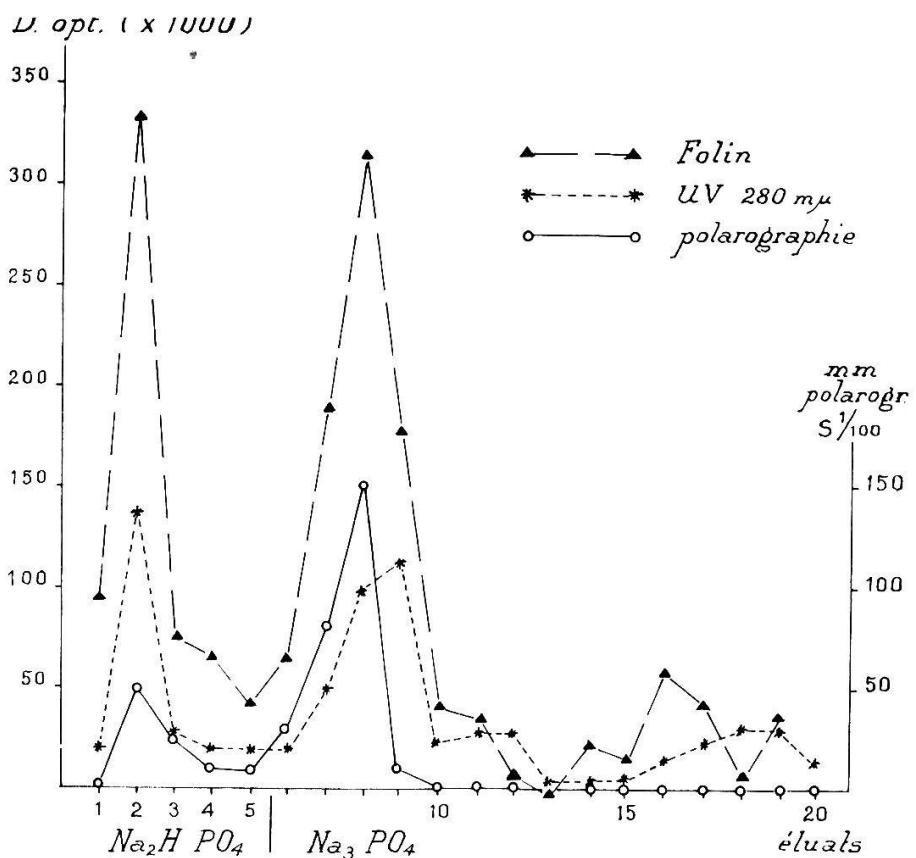


FIG. 4. — Chromatographie de 5000 UI de Primogonyle et dosages chimiques des éluats (cf. p. 299).

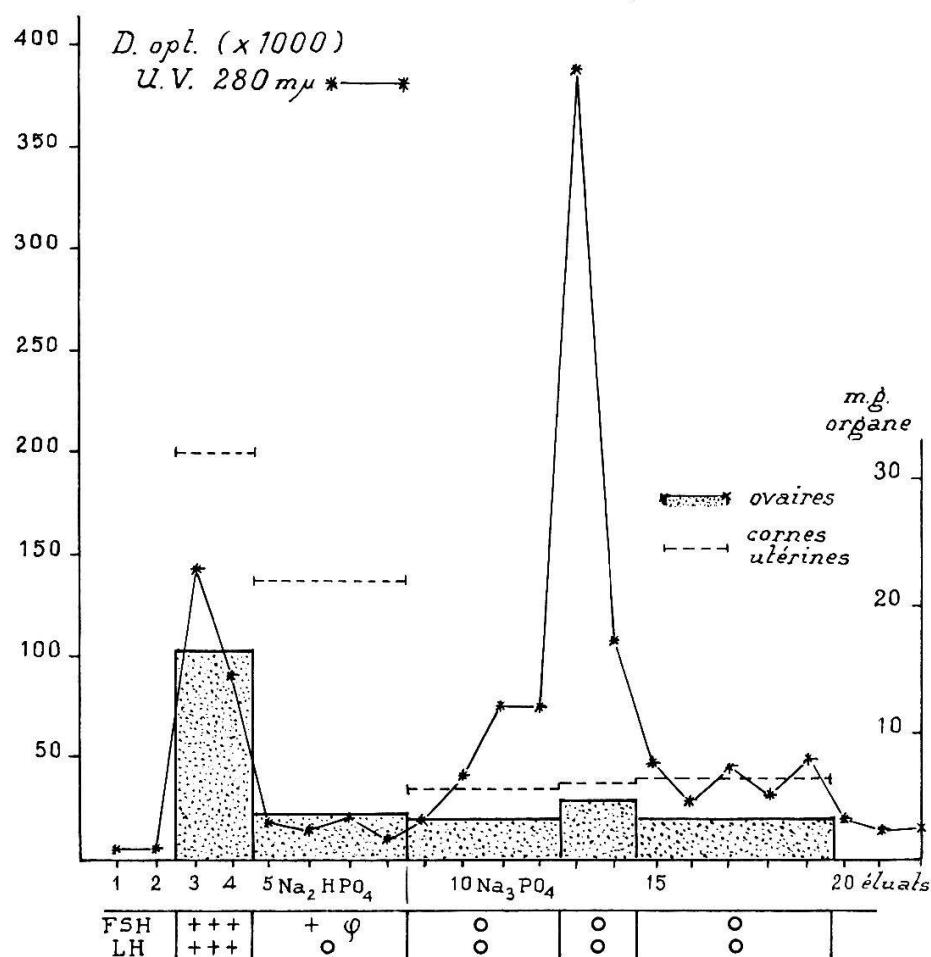


FIG. 5. — Chromatographie de 5000 UI d'Anteron.  
Dosages parallèles des éluats:  
Absorption à 280 mμ, tests biologiques pondéraux et étude histologique  
des ovaires (action FSH/LH).

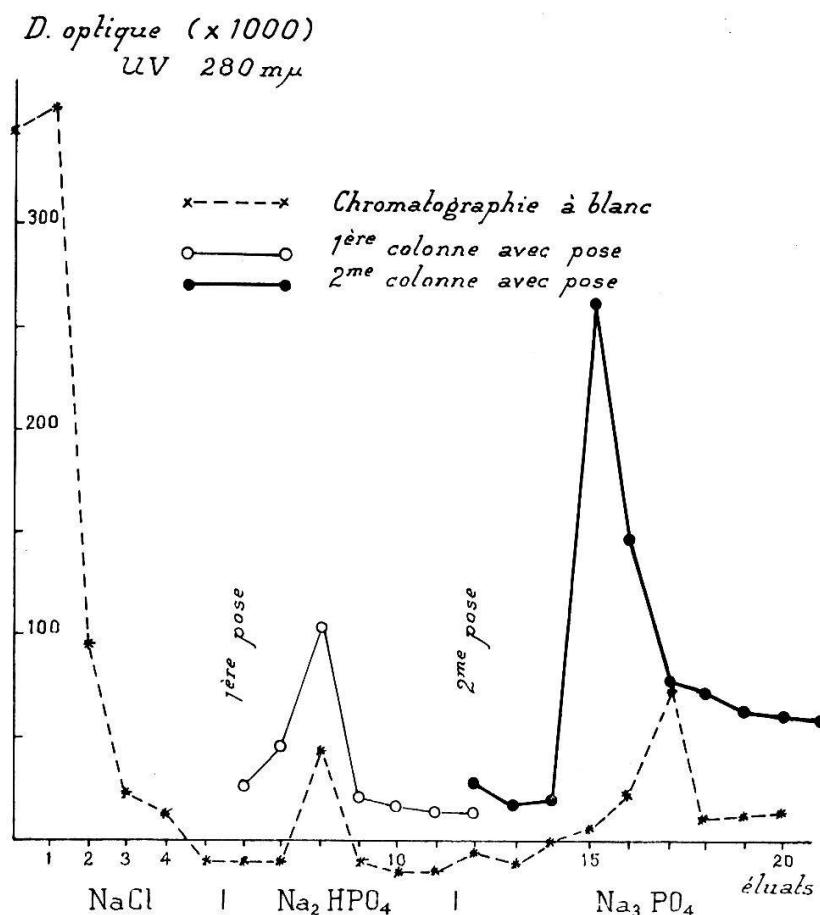


FIG. 6. — Comparaison de deux doubles-chromatographies éluées l'une à blanc, l'autre avec deux poses de 5000 UI d'Anteron.

Les résultats des deux préparations de gonadotropines sérielles concordent. La hauteur de l'unique pic de cette deuxième colonne apparaît plus rapidement que lors de l'expérience à blanc. Pourtant, ce maximum n'est pas plus haut que le deuxième pic apparaissant au cours des chromatographies simples. Il n'est pas non plus dédoublé. On constate pourtant une certaine asymétrie, ainsi qu'un net effet de « traînée », qui se traduit à l'UV par une absorption de fond plus élevée.

Dans la dernière expérience l'« effet-entraîneur » n'a pas eu lieu. La double-chromatographie n'a fait qu'enrichir la deuxième pose en protéines non actives. Il serait alors plus intéressant d'enrichir la fraction active. On peut se demander s'il en serait résulté un gain réel, et si l'enrichissement par la deuxième chromatographie n'aurait pas été annulé par l'inactivation spontanée observée au cours des chromatographies.

#### d) *Conclusions :*

Chaque nouvel éluant utilisé pour la chromatographie des gonadotropines provoque l'apparition d'un éluat présentant un pic d'ab-

sorption maximum. Ces pics ne correspondent pas tous à des protéines douées d'une activité biologique. En outre, la hauteur des pics n'a qu'une valeur relative; elle ne mesure pas l'activité absolue des fractions. Bien au contraire, l'activité spécifique ne peut se calculer qu'à partir des résultats fournis par les tests biologiques et les dosages des protéines.

Considérant l'ensemble des recherches faites jusqu'à maintenant en chromatographie nous pouvons dire que, dans la plupart des expériences, la séparation des deux hormones gonadotropes n'a pu être réalisée. En fait, il s'agit simplement d'une purification des extraits, puisqu'une certaine masse de substance, biologiquement inerte, est éliminée. Au cours de quelques travaux spéciaux et dans certaines conditions particulières, une séparation a été obtenue de façon plus ou moins satisfaisante. Mais des quantités initiales considérables de substances brutes doivent être déposées.

Dans nos propres expériences, les 5000 UI mises en jeu représentent en moyenne cent fois le taux des gonadotropines hypophysaires excrétées quotidiennement par un sujet normal.

L'adaptation de la séparation chromatographique aux dosages cliniques des deux gonadotropines hypophysaires, même incomplète, reste donc encore aujourd'hui une gageure.

## 2) LE CONTRE-COURANT

Devant les brillants résultats obtenus dans le domaine des séparations ocytocines-vasopressines, de la résolution des différentes hormones corticotropes et des facteurs contrôlant la décharge de l'ACTH, on peut se demander si la distribution à contre-courant n'apporterait pas aussi une solution pour les gonadotropines. Peu de publications mentionnent ce mode d'extraction.

La récupération de la fraction « GA » provenant de la chromatographie d'extraits d'urine de femme postménopausique de BUTT était mauvaise, en raison de la trop forte concentration en sels. Il est regrettable qu'aucun dosage biologique ne soit mentionné (BUTT 1956).

Dans une communication personnelle, WARD (1960) nous a signalé que les essais de purifier l'hormone lutéinisante par la distribution à contre-courant avaient échoué, tous les systèmes de solvant ayant provoqué la dénaturation des protéines.

Travaillant avec des gonadotropines sériques, LEGAULT (1960) a surmonté cet obstacle. Mais il affirme n'avoir observé aucune séparation des hormones folliculo-stimulante et lutéinisante. Cette technique n'est donc encore et sous toute réserve qu'une méthode de purification.

## 3) L'ÉLECTROPHORÈSE

Cette méthode a été utilisée au cours des recherches sur les gonadotropines aussi bien en vue d'une application clinique que pour les besoins des recherches de base.

a) *But clinique :*

Du point de vue purement historique, il faut mentionner le travail de SPIELMANN (1938).

Presque quinze ans plus tard, un groupe de chercheurs propose un dosage de l'urine de femme enceinte par électrophorèse sur papier avec des extraits obtenus sur filtre Chamberland. Il distingue une fraction immobile, biologiquement inerte, et une fraction mobile, représentant la protéine active, puisqu'elle seule est « Friedman-positive » (DUSTIN, MÉDARD, WODON, BIGWOOD 1952).

STRAN et JONES (1953) croient observer une différence qualitative entre l'urine normale d'une part et l'urine de femme enceinte ou de certains malades d'autre part. (L'urine de femme normale ne présente pas de migration. Par contre, ils observent une migration dans le cas des femmes enceintes ou atteintes d'hypogonadotropisme. L'urine d'un malade à protéinurie présente un complexe migrant vers l'anode.)

Mais en fait il n'est pas possible de distinguer les gonadotropines hypophysaires des chorioniques. Si l'on ajoute à cet inconvénient que d'autres expériences ont prouvé que la purification entraîne une diminution de la colorabilité allant jusqu'à effacer des zones, tandis que l'activité biologique des éluats persiste, il faut convenir qu'un dosage des gonadotropines par cette voie est douteux (STRAN, JONES 1954).

b) *But scientifique pur :*

1<sup>o</sup> *L'urine de femme enceinte a fait l'objet d'un certain nombre de travaux, qui ne concordent pas toujours.*

Ainsi, le groupe de LI (RAACKE, LI, LOSTROH 1954) utilise des produits à différents degrés de pureté (2000-7000 UI/mg). Les éluats de l'électrophorèse sur amidon, lus à 750 mμ font apparaître deux pics appelés « HCG-A » et « HCG-B ». Tous deux possèdent une activité biologique du type ICSH. L'activité spécifique de « B » est supérieure à celle de « A » ; leurs points iso-électriques sont très voisins (3,6 et 3,5).

Les résultats précités sont en désaccord avec ceux obtenus par BOURRILLON, GOT et MARCY (1956). Ces chercheurs ne retrouvent pas les pics « A » et « B » pour des produits titrant 6000 et 10.000 UI, mais ils obtiennent une protéohormone homogène, bien individualisée, migrant vers l'anode. Ils concluent que les gonadotropines sont excrétées dans l'urine sous forme de complexes protéiques labiles qui seraient scindés au cours des purifications.

Les travaux d'un autre groupe nous intéressent particulièrement puisque les auteurs ont travaillé, comme nous, avec du Primogonyl (SCHNEIDER, FRAHM 1955 a ; 1956 a ; 1956 b). Le tableau 11 résume leurs résultats obtenus par électrophorèse sur papier.

Cherchant à isoler le facteur « HCG » de l'urine de femme enceinte, GOT (1959) a rendu évident le rôle des différents types d'électrophorèses qui, en aucun cas, ne peuvent servir à des fins d'extraction ou de purification même grossière, et ne présentent un réel intérêt que pour des substances déjà hautement purifiées. L'électrophorèse sur papier sert d'analyse courante. L'électrophorèse de zone sur amidon aboutit, grâce à son haut pouvoir de résolution, à des purifications très poussées. Elle permet de juger de l'homogénéité des fractions. Par l'électrophorèse libre, on détermine le point iso-électrique, établit la courbe de mobilité et vérifie le degré de pureté de la substance.

Or, il s'est trouvé que des produits hautement purifiés, homogènes selon les critères habituels et ne présentant aucune activité folliculo-stimulante se sont révélés fortement inhomogènes à l'immuno-électrophorèse ; cette dernière méthode devient alors une méthode de vérification ultra-sensible (GOT, LÉVY, BOURRILLON 1959). Les auteurs soulignent l'importance du choix de l'immunsérum. La même

TABLEAU 11

*Expériences de SCHNEIDER et FRAHM. Electrophorèses de gonadotropines chorioniques et activités biologiques des éluats.*

	Z o n e s						
	1	2	entre 2 et 3	3	entre 3 et 4	4	5
<i>Coloration des bandes</i>							
Ninhydrine (acides aminés libres)	+	+	—	(+ large)	—	+	(+ variable)
Amidoschwarz (protéines)	—	(rare)	—	++	—	++	—
Schiff (aldéhydes)	—	—	—	—	—	+	—
<i>Tests préliminaires</i>							
Rat ♂ entier de 21 jours : poids : prostate ventrale	1 pic	1 pic	—	3 pics	—	—	—
Souris ♀ entière de 21 jours : poids ovarien	—	1 pic	—	2 pics	—	—	—
poids : cornes utérines	1 pic	1 pic	—	3 pics	—	—	—
<i>Tests sensibles</i>							
Rat ♂ hypophysectomisé : poids : prostate ventrale	—	—	petit maximum	—	grand maximum	—	—
Rat ♀ hypophysectomisée : poids ovarien	—	—	—	++	—	—	—
histologie ovarienne	—	—	LH	LH ±	ICSH	—	—

substance, titrant 1500 UI/mg présente deux lignes de précipitation avec l'immunsérum de cheval et 7 à 8 lignes avec celui de lapin. Quatre lignes sont encore présentes (immunsérum de lapin) aux titres de 6000 UI/mg ; et c'est seulement pour une activité spécifique de 12.000 UI/mg qu'on obtient une ligne de précipitation unique. Il reste cependant à savoir si ce produit représente réellement l'hormone recherchée, à l'état pur.

2<sup>o</sup> En ce qui concerne l'*urine de femme postménopausique*, citons entre autres le travail de BOURRILLON, GOT et MARCY (1960) annonçant l'apparition d'une fraction présentant un seul maximum symétrique. Cette fraction est active sur l'utérus de souris à la dose de 0,001 mg.

3<sup>o</sup> Dans des extraits d'*hypophyses humaines*, RIGAS, PAULSEN et HELLER (1958) ont observé trois zones nettes, ne représentant pourtant pas les trois hormones recherchées FSH, LH et LTH (prolactine).

Ce n'est qu'en combinant judicieusement l'électrophorèse sur colonne d'amidon et la chromatographie que l'équipe de LI (SQUIRE, LI 1959; LI 1960) a réussi la séparation des hormones folliculo-stimulante et lutéinisante à partir d'hypophyses humaines.

4<sup>o</sup> *Le serum de jument gravide* a également été étudié à l'électrophorèse. En soumettant de l'Anteron aux mêmes conditions d'expérience que le Primogonyl on peut croire, à première vue, avoir obtenu l'individualisation des deux facteurs (SCHNEIDER, FRAHM 1955 b; 1956 c; FRAHM, SCHNEIDER 1957).

Le tableau 12 résume les résultats.

TABLEAU 12

*Expérience de SCHNEIDER et FRAHM. Electrophorèses de gonadotropines sériques et activités biologiques des éluats.*

	Z o n e s						
	1	2	entre 2 et 3	3	entr 3 et 4	4	5
<i>Coloration des bandes</i>							
Ninhydrine (acides aminés libres)	+	+	—	+	—	+	+ (variable)
Amidoschwarz (protéines)	+	++	—	+	—	—	—
Schiff (aldéhydes)	+	++	—	+	—	—	—
<i>Tests préliminaires</i>							
Souris ♀ entière 21 jours : poids ovarien	+	+	—	2 pics + (in- homogène)	—	+ (vers bande 5)	—
poids : cornes utérines	+	+	—		—	+ (vers bande 5)	—
follicules hémorragiques	—	—	—	+	—	—	—
<i>Tests sensibles</i>							
Rat ♂ hypophysectomisé : poids : prostate ventrale	—	—	petit maximum	—	grand maximum	—	—
Rat ♀ hypophysectomisée : poids ovarien	—	—	—	+	—	—	—
poids : cornes utérines	—	—	—	+	—	—	—
histologie ovarienne	—	—	LH/ICSH	FSH+++	FSH ± ICSH	—	—

RAACKE, LORAIN, BODA et LI (1957), comparant dans une étude critique approfondie deux séparations de gonadotropines sérielles de pureté différente, soumises à l'électrophorèse sur amidon (différents

systèmes de tampon), ont dû constater que les éluats, qui sont doués d'une activité biologique, ne présentent pas nécessairement un pic dans la courbe de dosage des protéines. Il semble que les deux activités biologiques soient retenues dans les mêmes proportions au cours de toute la purification. Les auteurs se sont opposés à l'annonce prématurée de la séparation des hormones.

Depuis, ni les recherches de BOURRILLON et GOT (1957), ni celles de LEGAULT (1960) n'ont abouti à une séparation par l'électrophorèse. Bien au contraire, un récent travail de SCHNEIDER et FRAHM (1961) confirme l'impossibilité d'une résolution entre les différentes activités biologiques.

c) *Contribution à l'étude électrophorétique :*

Par électrophorèse continue, PEGUIRON (1955) avait obtenu, avec de la gonadotropine chorionique CIBA, titrant 125 UI/mg, la résolution en deux zones bien distinctes à l'Amidoschwarz et désignées par les lettres A et B. Aucune vérification des activités biologiques n'avait été décrite à l'époque, et la dénomination A et B n'a aucun rapport avec les deux facteurs hormonaux recherchés.

Ce travail a été repris avec d'autres substances commerciales, tantôt avec l'appareil ELPHOR, tantôt avec le système à chevalet de DURRUM. Nous avons utilisé du papier Schleicher et Schüll 2043, du papier Whatman de différentes épaisseurs permettant des poses d'importance variable, et de l'acétate de cellulose. Les zones sont généralement révélées par la ninhydrine (acides aminés) et l'Amidoschwarz (protéines).

1<sup>o</sup> *Electrophorèse d'un extrait brut d'urine de femmes enceintes : fig. 7.*

Un gramme de poudre d'extrait à l'acide benzoïque titrant environ 300 UI/mg est extrait par deux fois 2,5 ml de tampon véronal-acide acétique à pH 8,6. On pose 30 µl, répartis sur trois cm, et fait migrer quatre heures et demie à 13 V/cm.

Les zones révélées par l'Amidoschwarz (AS) et la ninhydrine (N) ne se recouvrent pas nécessairement. (A titre de comparaison, la figure montre l'électrophorèse de sérum humain normal, faite dans les mêmes conditions.)

2<sup>o</sup> *Vérification de la sensibilité de la ninhydrine.*

Si la ninhydrine révèle la présence de traces d'acides aminés, il est pourtant bien connu que les quantités minimales nécessaires à l'apparition d'une tache, dont la couleur varie suivant l'acide aminé envisagé, dépend également de la substance analysée. Il nous a paru utile de déterminer le seuil de sensibilité de la ninhydrine dans le cas des gonadotropines. Il dépend de la substance utilisée et de son degré de pureté. Du Physex, provenant d'une ampoule contenant 1500 UI, a été déposé à raison de 15 UI - 30 UI - 45 UI - 60 UI -

75 UI - 90 UI et 105 UI, puis soumis à l'électrophorèse (tampon : véronal-acétate à pH 5,8; migration : 40 heures à 6 V/cm). On n'observe qu'une seule bande. A 30 UI et 45 UI la zone est à peine perceptible, alors qu'elle est nette à partir de 60 UI. Puisque les extraits d'hormone sont constitués par un mélange de produits, il faut toujours se demander si une tache foncée révèle la présence d'une faible quantité d'une substance à grande affinité pour la ninhydrine ou, au contraire, une très grande quantité de substance peu chromogène.

Ainsi, dans la figure 9 la bande II représente une électrophorèse de 500 UI de Physex. Les conditions de migration sont identiques à celles de l'expérience précédente. Lorsqu'on dépose une quantité plus importante de produit, d'autres bandes apparaissent. La même observation a été faite avec du Primogonyl.

### 3<sup>e</sup> Double-électrophorèse (Primogonyl) : fig. 8.

Lorsque nous avons travaillé avec la préparation PU de Schering, le Primogonyl, les quantités de UI mises en jeu ont été, en général, très élevées. Avec 300 UI de gonadotropines déposées sur une largeur de trois centimètres et soumises à l'électrophorèse, on se trouve juste en dessous du seuil de sensibilité de la ninhydrine. Lors d'un dépôt punctiforme, on observe après électrophorèse un spot allongé sans résolution apparente. Nous avons alors effectué une double-électrophorèse en tournant le papier de 90° avant la deuxième migration. Les conditions restent inchangées (tampon : véronal-acétate à pH 5,8; migration : 3 heures à 13 V/cm). Il en résulte une succession de spots, en diagonale, plus ou moins bien individualisés (fig. 8 b). Malheureusement, du point de vue pratique, il n'est pas possible, avant la coloration, de découper l'électrophorèse et d'éluer sélectivement et individuellement l'une ou l'autre des substances, car l'emplacement n'en est pas rigoureusement fixe. De faibles variations des conditions d'expérience (température, pH, etc.) causent une déviation de la localisation.

### 4<sup>e</sup> Influence du degré de pureté de la préparation : fig. 9 et 10.

Dans une série d'électrophorèses de Primogonyl, nous avons constaté certaines divergences des résultats, s'expliquant uniquement par l'utilisation de préparations provenant de lots de fabrication différents.

L'influence des substances inertes sur le comportement électrophorétique des gonado-stimulines a été mise en évidence avec des préparations commerciales de différentes concentrations, donc de « degré de pureté » différent :

Physex (PU), titrant soit 500 UI, soit 3000 UI par ampoule ; Antex (PMS), titrant soit 750 UI, soit 3000 UI par ampoule. On pose toujours l'équivalent de 500 UI sur une largeur de trois cm. Les conditions de migration figurent dans le tableau 13.

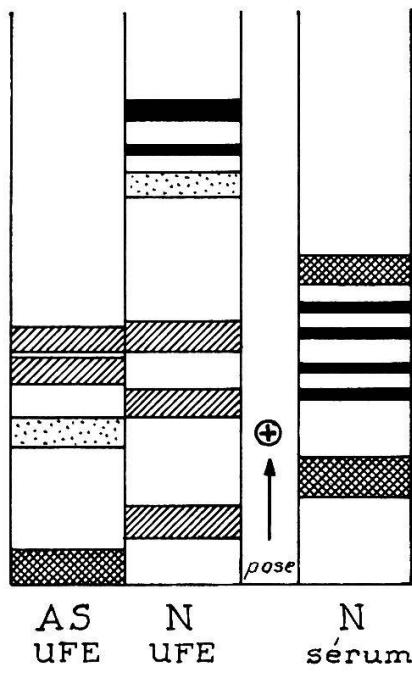


FIG. 7. — Electrophorèses d'un extrait brut d'urine de femme enceinte (UFE) et de sérum humain normal.

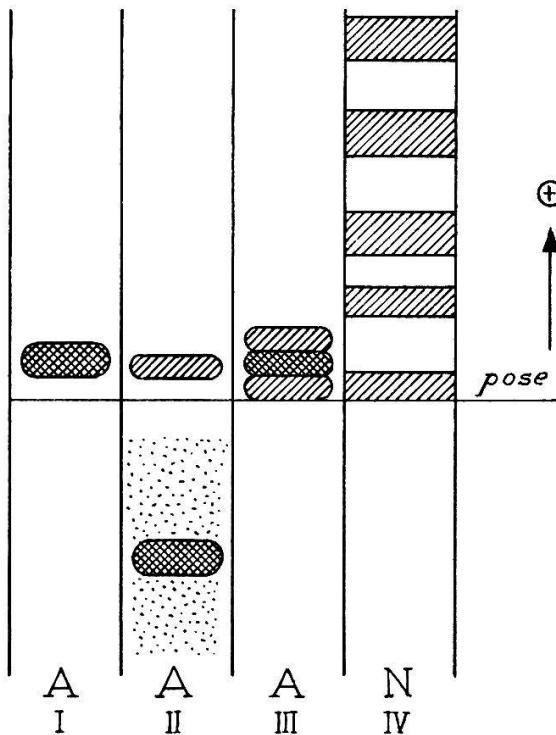


FIG. 9. — Electrophorèses de 500 UI de Physex, faites dans différentes conditions : voir tableau 13.

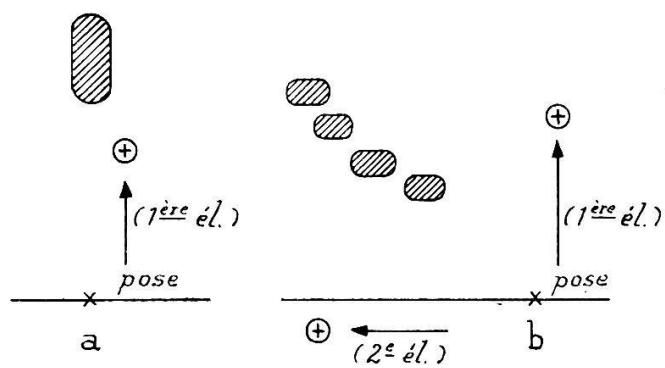


FIG. 8. — Electrophorèse simple (a) et double (b) de 300 UI de Primogonyl.

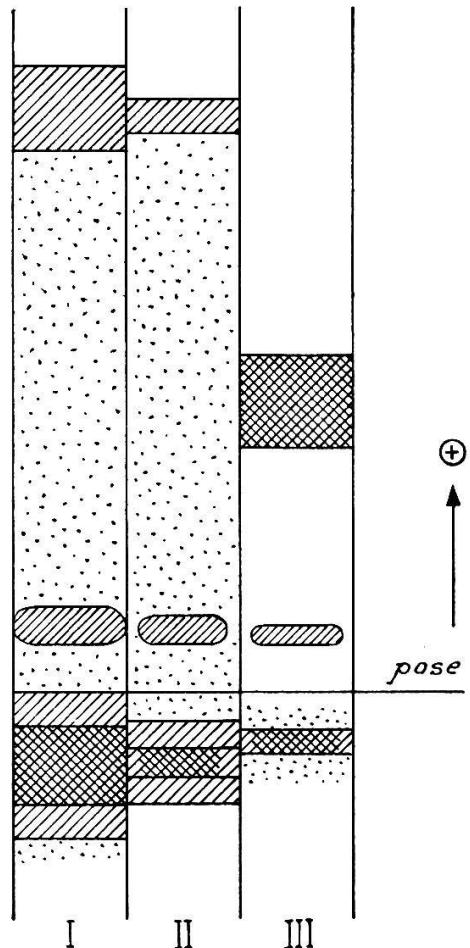


FIG. 10. — Electrophorèses de 500 UI d'Anteron faites dans différentes conditions : voir tableau 13.

TABLEAU 13  
*Electrophorèses faites dans différentes conditions.*  
*(V. également fig. 8 et 9)*

Bande	Titre de l'ampoule	Appareil	Tampons	pH	Durée	Diff. de potentiel	Coloration
a) Pose de 500 UI de Physex (fig. 8)							
I	500 UI	à chevalet	Véronal-acétate	5,8	40 h	6 V/cm	Amidoschwarz
II	3000 UI	»	»	»	»	»	»
III	3000 UI	Elphor	T. E. B.	8,5	8 h	8 V/cm	»
IV	1500 UI	»	Véronal-acétate	5,8	»	»	Ninhydrine
b) Pose de 500 UI d'Antex (fig. 9)							
I	750 UI	à chevalet	Véronal-acétate	5,8	40 h	6 V/cm	Amidoschwarz
II	3000 UI	»	»	»	»	»	»
III	3000 UI	Elphor (acétate de cellulose)	»	»	5 1/2 h	8 V/cm	»

Dans le cas du Physex, la masse plus ou moins immobile d'une quantité importante d'impuretés a empêché la migration cathodique des gonadotropines. Dans le cas de l'Antex, la migration a eu lieu. La forte coloration de la zone, proche de l'endroit de pose, correspondant aux substances inertes, indique la présence d'une forte quantité d'impuretés. Les zones sont mal délimitées et l'on note des phénomènes de traînées très prononcées. Ce dernier inconvénient peut être évité par l'emploi d'acétate de cellulose (fig. 10 III). L'emploi de ce support présente de plus l'avantage de n'exiger qu'une courte durée de migration.

Il est intéressant de souligner que, dans les mêmes conditions, la coloration à l'Amidoschwarz révèle une migration anodique du Primogonyl et cathodique du Physex, alors que dans les deux cas il s'agit de préparations de gonadotropines choriales.

#### 5<sup>e</sup> Tests biologiques et dosages des éluats : fig. 11, 12 et 13.

Des substances commerciales ont été soumises à l'électrophorèse, dans un système jugé optimal pour les séparations.

Sur les papiers encore humides, on prélève longitudinalement, sur une petite largeur, une bande témoin qui est colorée à la ninhydrine. Sur la bande principale, on coupe et élue des bandelettes de un ou de deux cm de long, suivant la

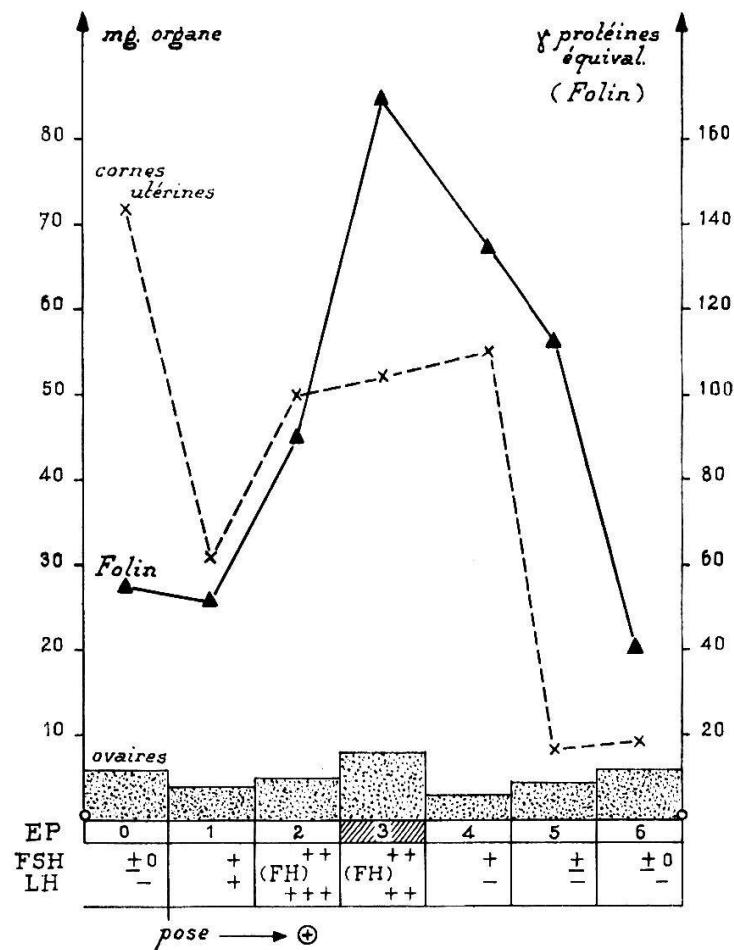


FIG. 11. — Electrophorèses de 1000 UI de Physex. EP = bande témoin colorée à la ninhydrine. Dosage au Folin et tests biologiques pondéraux des éluats. Etude biologique des ovaires (action FSH/LH et présence de follicules hémorragiques).

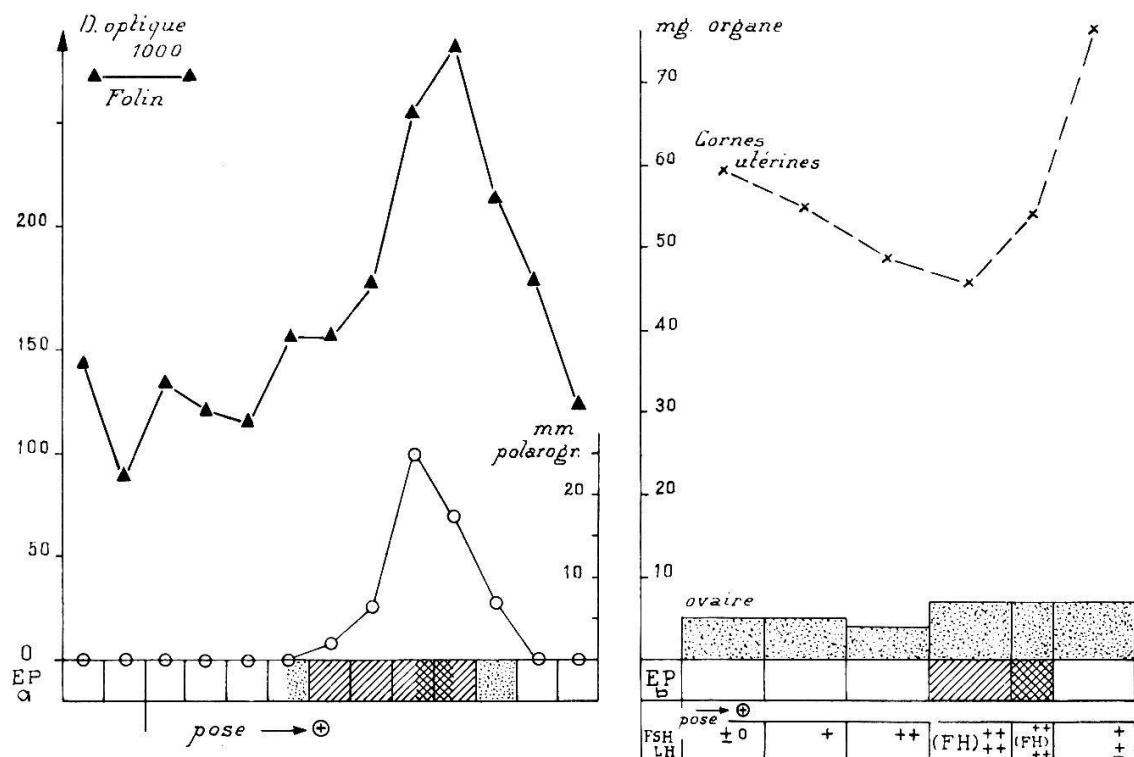


FIG. 12. — Electrophorèses de 1200 UI de Primogonyl, faites simultanément, colorées à la ninhydrine (EP).  
 a) dosages chimiques et physico-chimiques  
 b) Tests biologiques.

précision désirée. Les éluats aqueux sont lyophilisés, puis repris par un volume de solution physiologique minimal, permettant de faire simultanément des tests biologiques et des dosages chimiques. Dans certains cas, il était préférable de faire simultanément deux électrophorèses parallèles identiques, l'une servant aux tests biologiques et l'autre aux dosages chimiques et physico-chimiques. A cet effet, les éluats lyophilisés sont repris par de l'eau distillée, car le sodium gêne l'apparition de la double vague de BRDICKA lors de la mesure polarographique.

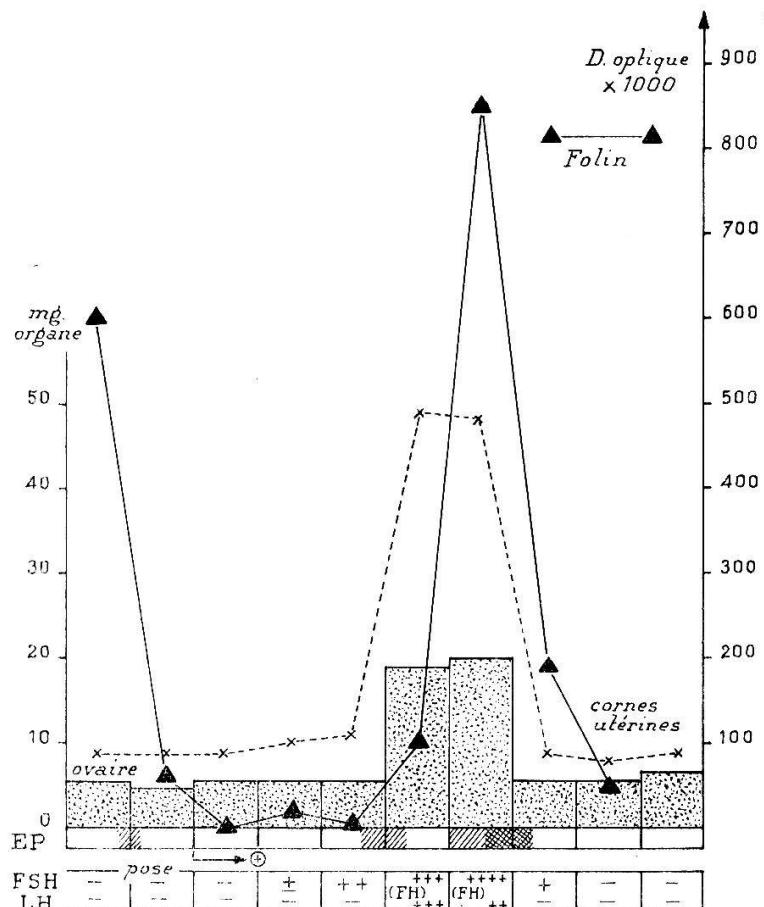


FIG. 13. — Electrophorèses de 2500 UI d'Anteron. EP = bande témoin colorée à la ninhydrine. Dosage au Folin et tests biologiques des éluats.

Une première série d'expériences est effectuée avec des préparations de gonadotropines chorioniques. Les figures 11 et 12 font ressortir une relation entre la stimulation pondérale des ovaires et des cornes utérines des femelles de souris impubères d'une part et des zones colorées à la ninhydrine sur la bande témoin d'autre part. Cependant, l'étude histologique révèle non pas une séparation franche entre une éventuelle hormone folliculo-stimulante et l'hormone luténisante, mais en quelque sorte une stimulation des follicules, graduellement plus puissante entre le lieu de pose et la zone colorée à la ninhydrine. La zone ninhydrine-positive, qui correspond à une forte luténisation, avec apparition de follicules hémorragiques, est encadrée de deux zones, d'importance inégale, à activité folliculo-stimulante. Cette dernière se trouve dans les éluats cor-

respondant à des parties peu ou pas colorées à la ninhydrine, pouvant donc correspondre à des régions de l'électrophoré-gramme où les gonadotropines étaient en faible concentration. Leur présence peut être due à un effet de « traînée » ou de « prémigration », cette dernière en raison de la grande quantité de substance déposée.

Dans une deuxième série, l'expérience a été répétée avec de l'Anteron. Les résultats sont représentés par la figure 13. On ne peut affirmer que les différentes zones, révélées par la ninhydrine, représentent les deux activités biologiques recherchées. La stimulation pondérale reflète pourtant une migration des gonadotropines. A nouveau, une forte croissance folliculaire suit la lutéinisation et la présence des follicules hémorragiques.

d) *Conclusions :*

De tout ce qui précède concernant l'électrophorèse des hormones gonadotropes nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- Les impuretés, quelles qu'elles soient, substrats de préparations commerciales ou impuretés d'extraits bruts, gênent l'électrophorèse en s'opposant à une bonne migration des gonadotropines.
- L'électrophorèse ne peut être envisagée que pour des substances déjà hautement purifiées, pour autant qu'on dispose de suffisamment de matériel.
- Pour ce genre d'étude, le papier est un mauvais support car il retient une trop forte proportion de matériel. L'amidon et l'acétate de cellulose lui sont préférables.

Tenant compte des critiques de LI on peut se demander :

- 1<sup>o</sup> si la traînée, observée sur les électrophorèses, est formée par des substances actives, liées à une autre protéine, donnant une réaction du type FSH en raison de sa nature ou en raison de la faible quantité d'hormones présente ;
- 2<sup>o</sup> s'il s'agit d'une séparation réelle de deux produits présents initialement au moment de la pose, ou
- 3<sup>o</sup> s'il y a eu dégradation.

L'absorption à l'UV à 280 m $\mu$  et la réaction au Folin des éluats indiquent une certaine corrélation entre les zones colorables à la ninhydrine et les pics des courbes de dosages, sans que la preuve soit apportée qu'il s'agisse exclusivement de substances hormonales. On dose donc aussi les impuretés dans la mesure où celles-ci sont des acides aminés ou des protéines, ainsi que les protéines vectrices éventuelles des gonadotropines.

Il est regrettable que les expériences biologiques sur rats hypophysectomisés de FRAHM et de SCHNEIDER ne puissent être comparées aux nôtres, en raison du choix différent des animaux. Nous n'avons jamais rencontré la zone « LH », mais bien les deux zones

« FSH » et « ICSH ». De ce fait aussi nos conclusions ne concordent pas avec celles des auteurs précités. L'hypothèse selon laquelle certains minima pondéraux correspondent à des surdosages nous paraît discutable et nécessiterait une vérification histologique.

Comme nous d'ailleurs, ce groupe de chercheurs a pu constater une forte variabilité entre les différents lots de fabrication d'une même gonado-stimuline. Nous ajoutons que cette constatation est encore plus frappante pour des substances de provenance différente (nombre et localisation des zones). C'est notamment cette divergence des résultats qui nous incite à souligner la grande importance du choix du mode d'extraction, dans le cas où l'on envisagerait un dosage chimique des gonado-stimulines.

### III. DOSAGES CHIMIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES DES GONADOTROPINES

#### 1) MÉTHODES CHIMIQUES

##### a) *Travaux étrangers :*

Plusieurs méthodes de dosage ont été proposées. Elles se basent sur certaines caractéristiques chimiques grossières, non spécifiques des gonadotropines.

Ainsi, VAN DEN DRIESSCHE et HANS (1952) ont utilisé la *réaction des sucres* à l'orcinol pour déceler les gonadotropones chorioniques dans les urines de femmes enceintes. La réaction est négative chez les femmes non gravides.

WODON et BIGWOOD (1952) ont mesuré le développement de la couleur rouge du *réactif de Schiff*. Selon ces auteurs, cette coloration apparaît déjà en début de grossesse. Il ne s'agit pas d'un dosage à proprement parler des gonadotropines, mais d'un test chimique, censé remplacer les tests biologiques de grossesse.

En 1955, DE GENNES, MOUKHTAR et BAILLET publient une technique chimique nouvelle. La méthode repose sur la transformation des glucoprotéides (FSH) par l'acide périodique en formol et acide formique. On évalue au spectrophotomètre, après adjonction de l'acide chromotropique, la quantité de *formaldéhyde libérée*. Les chercheurs se réfèrent aux expériences de surcharges donnant une récupération très satisfaisante. Mais il faut remarquer que les expériences n'ont pas été effectuées avec de l'urine. On ne sait donc pas dans quelle mesure des substances, pouvant interférer avec cette réaction, masquent la présence des gonadotropines et rendent impossible un dosage clinique.

Rappelons qu'un grand nombre d'électrophorèses, de chromatographies, etc. ont été suivies d'un dosage chimique des protéines ou des acides aminés présents dans les éluats. On ne peut pas cependant considérer les dosages au Folin, ou les mesures d'absorption dans l'UV, comme des dosages chimiques précis des gonadotropines. Ils ne sont pas spécifiques et ne constituent, par conséquent, qu'un moyen de vérification, par exemple de l'évolution de la purification.

- b) *Observations personnelles sur le dosage des hormones gonadotropes par la méthode au Folin et par l'absorption dans l'ultraviolet (UV), fig. 14 et 15.*

Nous avons établi des courbes d'étalonnage pour les produits commerciaux utilisés dans nos expériences. Ces courbes devaient nous permettre, par la suite, de trouver les relations existant entre les unités internationales, c'est-à-dire l'activité biologique d'une part et les valeurs obtenues après les analyses chimiques des gonadotropines d'autre part. Aussi bien pour la méthode au Folin que pour l'absorption dans l'UV, il est apparu que, si les courbes tracées appartiennent à la même famille, elles ne sont pas pour autant superposables (p. ex. Physex et Primogonyl, tous deux des gonadotropines chorioniques). Pour un même produit, la hauteur des courbes est inversement proportionnelle à la concentration initiale, exprimée en unités internationales et inscrite sur les ampoules (cf. fig. 14).

Comparant les courbes, après dosage au Folin, de l'Antex (PMS) et du Physex (PU) provenant l'un et l'autre d'ampoules à 3000 UI, l'unité internationale n'apparaît pas comme une mesure quantitative réelle, mais bien comme une mesure relative de l'activité caractéristique du produit envisagé.

Signalons aussi l'influence qu'exercent, entre autres, la nature et le pH du solvant des gonadotropines commerciales sur la densité optique : le tampon véronal-acétate à pH 5,8 et pH 8,6 abaisse considérablement les valeurs trouvées avec du NaCl 8 % qui sont, elles, plus basses que celles obtenues avec de l'eau distillée.

Il est donc évident que ces courbes ne peuvent être mises à profit pour le dosage chimique des gonadotropines urinaires.

Ayant constaté la valeur douteuse des différentes courbes d'étalonnage au Folin, nous avons préféré utiliser la méthode de dosage basée sur la mesure de l'absorption dans l'UV à 280 m $\mu$ . Les résultats sont alors exprimés en «  $\gamma$ -équivalent » d'une certaine protéine connue. On sait que l'absorption entre 276 et 281 m $\mu$  est due à la tyrosine et au tryptophane, le pH pouvant varier entre 6 et 13. Comme substance de référence nous avons utilisé la  $\gamma$ -globuline bovine, l'albumine humaine et le Labtrol DADE; cette dernière solution est couramment utilisée comme solution de référence pour les dosages d'analyses médicales, puisqu'elle reproduit artificiellement, mais de façon constante, le sérum humain.

La figure 15 représente l'allure des courbes de la densité optique à 280 m $\mu$  en fonction de la quantité de chacune des trois substances de référence. Ce sont des droites parfaites, qui se prêtent beaucoup mieux à l'évaluation des résultats expérimentaux que les courbes de la fig. 14.

Néanmoins, dans nos expériences il nous a paru préférable de ne pas convertir les valeurs trouvées au spectrophotomètre en mg de protéines, mais d'adopter tout simplement pour nos mesures les valeurs de la densité optique multipliées  $\times 1000$ .

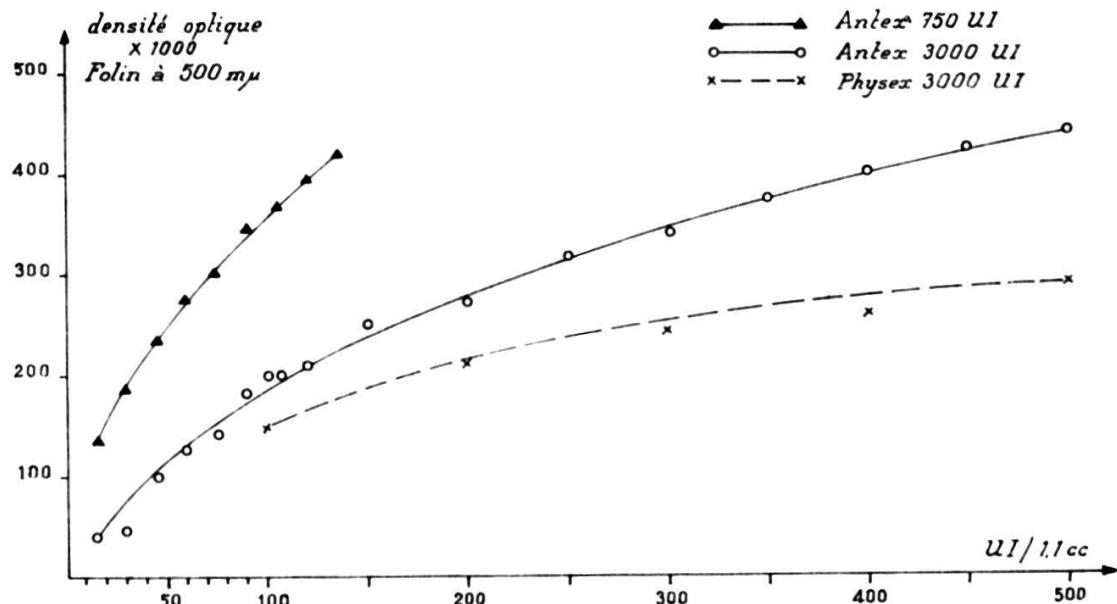


FIG. 14. — Courbes d'étalonnage au Folin (à  $500 \text{ m}\mu$ ) de gonadotropines provenant d'ampoules à différentes contenance.

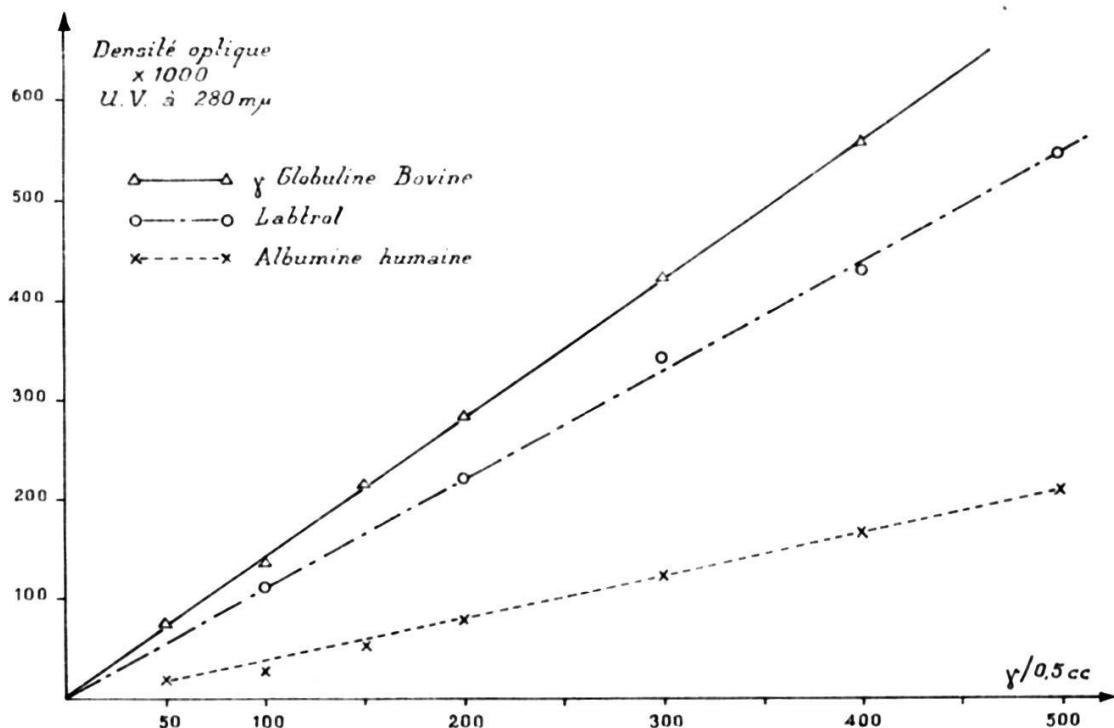


FIG. 15. — Courbes d'étalonnage de trois protéines différentes :  $\gamma$ -globulines bovines, Labtrol, albumine humaine.  
Mesure de l'absorption en UV à  $280 \text{ m}\mu$ .

## 2) DOSAGES POLAROGRAPHIQUES

### a) *Travaux étrangers :*

La polarographie est devenue un instrument de travail très efficace et courant, surtout en chimie minérale, et cela à tel point que certains problèmes ne peuvent être résolus que par cette méthode. Il n'en est pas de même en chimie organique, où les substances étudiées doivent remplir des conditions bien déterminées. L'application de la polarographie à la recherche des stéroïdes, substances bien définies, a rencontré un certain succès. Mais, de façon générale, cette technique a relativement peu retenu l'attention en hormonologie et plus particulièrement dans le domaine des stimulines.

BALLE-HELAERS a publié une méthode de dosage des gluco-protéines urinaires, c'est-à-dire des gonadotropines (1957; 1958; 1959).

### b) *Contribution à l'étude polarographique :*

Le Dr NEUKOMM eut l'idée d'étudier le comportement polarographique des gonadotropines et de mettre à profit la double-vague de BRDICKA pour évaluer quantitativement le taux des gonadotropines urinaires (1951). Par la suite une étude plus systématique et plus approfondie a permis de fixer le mode opératoire et les conditions optimales de la méthode PEGUIRON (PEGUIRON, NEUKOMM 1954; PEGUIRON 1955). L'équation de la courbe d'étalonnage a été calculée, d'où la possibilité de déduire le pourcentage d'impureté accompagnant les différentes préparations commerciales examinées. Ces auteurs ont finalement admis que la polarographie permettait le dosage de la gonadotropine placentaire si l'on pouvait obtenir cette hormone dans un état tout à fait pur, car cette méthode constitue un excellent moyen de doser quantitativement une protéine connue.

Ces conclusions ont en fait également déterminé la poursuite des recherches sur des méthodes d'extraction et de purification des produits se trouvant dans des liquides physiologiques.

Nous avons donc repris la technique de PEGUIRON pour effectuer des mesures sur les éluats provenant des électrophorèses de gonadotropines (PMS et PU) faites soit sur papier, soit sur amidon (cf. fig. 12), mais en ayant au préalable établi de nouvelles courbes d'étalonnage.

De façon générale, nous avons fait les mêmes observations que pour les courbes d'étalonnage au Folin et à l'UV : pour une même quantité de gonadotropines mesurée en UI, les hauteurs des paliers sont variables ; elles dépendent du produit envisagé, du lot de fabrication et de la concentration des ampoules. La très grande sensibilité de la polarographie accentue encore les facteurs interférents. On démontre aussi la nécessité de travailler avec un thermostat, puisque de faibles élévations de température entraînent une forte

augmentation des valeurs, ce qui est vraisemblablement dû à des altérations physiques des molécules.

A la suite de ces observations, nous avons jugé préférable de renoncer à convertir les résultats en unités internationales. Les concentrations des solutions sont exprimées en « hauteur - mm, rapportée à la sensibilité 1/100 ».

Dans ces conditions nous avons donc abouti à la même conclusion que nos prédecesseurs, à savoir que la polarographie n'est pas applicable pratiquement sur des produits insuffisamment purifiés selon une méthode non parfaitement reproductible. Cette méthode de mesure ne reprendra donc tout son intérêt qu'au moment où les méthodes d'extraction et surtout de purification seront au point et — étant donné l'extrême sensibilité de la polarographie — également au moment où il s'agira de doser de très petites quantités d'hormone purifiée.

#### IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Dans les pages qui précèdent, nous n'avons pas cherché à retracer un historique complet ni à énumérer toutes les nouvelles notions acquises au cours des dernières années dans le domaine des gonadotropines. Nous nous sommes limitée à étudier les possibilités d'un dosage chimique en vue de son application en clinique humaine. A cet effet il nous a paru utile de souligner certains obstacles techniques et quelques difficultés théoriques.

Connaissant la portée des équilibres physiologiques et biochimiques en hormonologie, il est indiscutable que la découverte d'un mode de détermination rapide et exact des deux activités biologiques dues aux hormones folliculo-stimulante et lutéinisante, c'est-à-dire la mise au point d'un dosage permettant leur mesure quantitative absolue et menant à l'établissement du rapport entre les deux facteurs, est de toute première importance. Une telle découverte trouverait sa pleine signification non seulement dans les mains des endocrinologues, cliniciens ou non, mais, comme nous l'avons dit dans l'introduction du sujet, également dans celles des cancérologues.

Il existe une différence de prime abord essentielle entre le test biologique et le dosage chimique. Si, au cours de l'extraction, la molécule gonadotrope subit une altération entraînant la perte de son activité biologique, les résultats fournis par les tests biologiques n'ont pratiquement plus aucune signification. La préservation de l'intégralité de la molécule hormonale constitue donc la condition fondamentale du test biologique. Au contraire, tout en observant certaines restrictions, on peut admettre que cette même inactivation des gonado-stimulines n'entrave en rien un dosage chimique, surtout si l'altération n'entraîne aucune dégradation structurale fondamentale de la molécule hormonale.

Dans les conditions générales d'un bon dosage des hormones en question figure également la nécessité de l'absence de toute autre substance étrangère qui puisse s'ajouter à la gonadotropine ou à son dérivé au moment de la mesure finale. Ces impuretés pourraient être, et sont probablement, des molécules biologiquement inactives, mais cependant chimiquement très voisines des gonadotropines, et présentes dès le début dans le mélange à analyser : de ce fait elles peuvent subir les mêmes transformations que les hormones qui nous intéressent. D'autres artefacts pourraient être constitués par des molécules plus petites, se joignant aux dérivés des gonadotropines ou présentant, en raison de leurs fonctions identiques, les mêmes réactions au dosage final. On conçoit qu'il serait relativement malaisé d'évaluer dans quelles proportions l'on a affaire à des produits d'origine hormonale. De toute façon, on doit être en mesure de connaître les modifications successives des molécules gonadotropes survenues au cours des manipulations et de s'assurer de leur parfaite reproductibilité.

Théoriquement, pour aboutir au dosage quantitatif des gonadotropines on dispose de deux méthodes de travail : lorsqu'on possède des dosages spécifiques sûrs, on peut, dans certains cas, se contenter d'une extraction globale, suivie d'une purification plus ou moins grossière. Si, par contre, les dosages ne sont pas spécifiques, il est nécessaire d'exécuter au préalable une extraction sélective et une séparation chimique très poussée. En ce qui concerne les gonadotropines urinaires humaines, nous sommes forcée de reconnaître qu'il faut associer une séparation spécifique à l'extraction spécifique et trouver un mode de dosage également spécifique et ultra-sensible.

On a relevé à plusieurs reprises les difficultés infiniment plus grandes rencontrées lors des extractions urinaires comparativement à celles des extractions tissulaires, hypophysaires par exemple. La composition de ces diverses matières premières est très différente selon les cas : d'une part on est en face de cellules actives, faisant partie d'un organe humain et produisant des hormones natives, et d'autre part on a affaire à un liquide complexe dans lequel les produits d'excrétion se trouvent mélangés à leurs propres produits d'inactivation ainsi qu'aux divers produits des dégradations métaboliques provenant de l'organisme tout entier. Soulignons à ce propos que le dosage des stéroïdes hormonaux ne peut être comparé à celui des gonadotropines ; ces dernières ne représentent qu'une infime partie des gluco-muco-protéines urinaires. De plus, les différences dans la constitution chimique des substances à activités biologiques dissemblables sont beaucoup moins évidentes dans le domaine des macromolécules.

Une autre difficulté doit être soulignée : il existe à l'heure actuelle une différence énorme entre les quantités d'hormones à doser en clinique et celles mises en jeu dans le cadre des travaux à but scientifique pur. C'est ainsi que l'activité spécifique d'un produit hautement purifié, mais encore contaminé malgré de nombreux stades de purification, est de 12 000 UI par milligramme, respectivement 12 UI par gamma ; or ce chiffre représente précisément l'ordre de grandeur des valeurs à doser et à fractionner en deux constituants hormonaux au moins chez un sujet normal, à partir d'un volume urinaire d'environ un litre. On mesure alors les obstacles qui se dressent devant le chercheur. Il est vrai que dans la plupart des cas pathologiques qui nous intéressent principalement, les taux des gonado-stimulines sont incomparablement plus élevés, puisqu'ils atteignent facilement ceux rencontrés au cours de la grossesse.

Nos remerciements s'adressent tout d'abord à Mmes C. Boitel, M. Halmi et M. Kiraly pour leur aide technique. Par ailleurs, c'est avec gratitude que nous avons reçu des Maisons LEO (Copenhague) et SCHERING (Berlin) les échantillons d'hormones gonadotropes nécessaires à une partie de nos travaux.

### ZUSAMMENFASSUNG

Mit dieser Arbeit bezweckten wir einerseits einen allgemeinen Ueberblick über die biologischen sowie die chemischen und physico-chemischen Eigenschaften der gonadotropen Hormone zu gewähren, und andererseits die hauptsächlichsten Extraktions- und Purifikationsmethoden anzuführen. Dies bot uns die Gelegenheit, ebenfalls unsere eigenen Experimente und Resultate einzuflechten. Auf die rein biologischen Probleme dieser Substanzen mussten wir allerdings grösstenteils verzichten.

Seit über einem Jahrzehnt hat man sich im «Centre anticancéreux romand» zu wiederholten Malen um die Auftrennung der menschlichen Gonadotropine im Harn in ihre beiden biologischen Komponenten (FSH-ICSH) bemüht. Das Ziel war, im Anschluss an die Auftrennung eine individuelle, exakte, chemische Auswertung auszuarbeiten, die für den Kliniker die verhältnismässig unzuverlässigen und vor allem unspezifischen, globalen biologischen Teste ersetzen sollte.

Unsere hier veröffentlichten Experimente wurden mit pharmazeutischen Produkten ausgeführt. Die Standardkurven anhand der Gewichtszunahme infantiler Mäuseovarien wurden durch histologische Befunde ergänzt. Auffallenderweise kommt es selbst bei Chorion-Gonadotropinen, bei schwacher Dosierung, zu einer eindeutigen Follikelstimulierung (FSH) ; bei Serum-Gonadotropinen nimmt diese FSH-Reaktion einen physiologischen Charakter an.

Ferner bestätigten verschiedene Experimente, die grössere Labilität des ICSH. Dieser äusserst wichtige Punkt wird eingehend besprochen.

Vor Jahren hoffte man auf chromatographischem Wege eine Aufteilung der beiden Hormone zu erhalten. Obgleich eine systematische Durchtestung der Chromatographien in Bezug auf die Proteinkonzentration zwei Gipfel aufweist, befindet sich dennoch die biologische Wirksamkeit einheitlich in den ersten Eluaten vereinigt. Einerseits stellt man eine beträchtliche Aktivitätsverminderung in der Folge von Substanzverlust und partieller Inaktivierung fest ; andererseits aber kann eine gewisse Purifikation nicht verneint werden.

Durch verschiedene Elektrophorese-Systeme erreichten wir eine schwache Aufteilung in FSH und ICSH, die aber noch kritisch beleuchtet werden muss.