

Biosynthèse des hormones stéroïdes^{1,2}

Par A. WETTSTEIN³

Quantité de problèmes se posent au biochimiste discutant des hormones stéroïdes. Le plus intéressant, celui qui touche la question du mécanisme d'action des hormones, n'est pas encore élucidé. Au sujet des réactions primaires des hormones stéroïdes avec les récepteurs spécifiques de la cellule au point d'action, nous ne savons presque rien. On parle de changements de perméabilité des zones frontières, soit au niveau de la membrane cellulaire, soit au niveau des particules intracellulaires. Sur un autre terrain d'approche on recherche l'influence activatrice ou inhibitrice des hormones stéroïdes sur des systèmes enzymatiques. Que ces hormones puissent être parties intégrantes de systèmes enzymatiques, comme c'est le cas pour beaucoup de vitamines, doit être exclu en général.

Le présent rapport concerne l'aspect biochimique des hormones stéroïdes que je considère comme le deuxième en importance; c'est leur biosynthèse. Dans ce domaine particulier du métabolisme il existe une immense documentation bien fondée, ce qui m'oblige à restreindre mon exposé. La question de savoir ce que l'organisme produit en fait de métabolites ne peut pas être abordée, puisqu'à ce jour on a, par exemple, isolé des glandes surrénales seules environ 70 stéroïdes. Même si nous nous bornons aux substances dont la sécrétion par les glandes endocrines est démontrée par le fait qu'elles se trouvent en plus grande quantité dans leur sang veineux que dans leur sang artériel, il en reste encore une vingtaine⁴. Nous allons donc examiner principalement le cheminement des réactions qui conduisent aux hormones stéroïdes, en laissant de côté les transformations cataboliques. Enfin nous aborderons le sujet de la régulation de la biosynthèse, ainsi que celui des substances qui freinent ou bloquent la biosynthèse⁵ et qui sont d'un grand intérêt pratique. Nous ne pouvons citer que les publications les plus récentes; pour d'autres travaux plus anciens et souvent de base, nous nous en référons aux mises au point citées.

Le schéma principal de la biosynthèse de toutes les hormones stéroïdes suit au début celui du cholestérol (C₂₇) à partir d'acide acétique. Le cholestérol est lui-même transformé en pregnénolone (C₂₁) par séparation d'aldéhyde iso-caproïque (C₆) de la chaîne latérale. Par déshydrogénation de la pregnénolone se forme déjà l'hormone progestative: la progestérone. Ces dérivés du prégnane sont à leur tour les substances centrales

de départ, d'une part pour l'élaboration des hormones androgènes (C₁₉) et œstrogènes (C₁₈), d'autre part pour l'élaboration de produits types, oxygénés plus fortement: les hormones corticosurrénales glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes. Le cholestérol et la pregnénolone⁶ représentent ainsi des précurseurs de toutes les hormones stéroïdes, mais qu'ils soient des intermédiaires obligatoires n'est pas du tout prouvé. De toute façon nous devons nous occuper d'abord de leur biogénèse.

Cholestérol. Le cholestérol est synthétisé principalement dans le foie, dans l'intestin et dans la peau, mais d'autre part aussi, par exemple, et ceci nous intéresse spécialement, dans les glandes surrénales et dans les gonades. Les étapes de la synthèse ont été reconnues très largement grâce à des travaux avec des enzymes du foie et particulièrement grâce aux recherches de RITTENBERG et SCHÖNHEIMER, de BLOCH, BUCHER, COOK, de CORNFORTH et POPJÁK, DAUBEN, FOLKERS, LYNEN, RUZICKA, TAVORMINA et al., ainsi que de WOODWARD (résumés voir ⁷⁻⁹). Cette biosynthèse

¹ D'après une conférence faite aux VIes Journées biochimiques latines, Genève (Suisse), 25 mai 1961.

² Publication No. 179 *Über Steroide*. Communication No. 178 voir K. HEUSLER, P. WIELAND et A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta*, sous presse.

³ Laboratoires de Recherche, CIBA S.A. Bâle, Département Pharmaceutique. Je remercie Monsieur CH. MEYSTRE qui s'est chargé de la traduction française.

⁴ L. T. SAMUELS, dans D. M. GREENBERG *Metabolic Pathways* (Academic Press, New York 1960), vol. 1, p. 431.

⁵ R. GAUNT, J. J. CHART et A. A. RENZI, *Science* 133, 613 (1961).

⁶ On vient dernièrement de déceler de la pregnénolone dans les racines d'une Asclépiadacée (*Xysmalobium undulatum*); ainsi une corrélation intéressante entre la biosynthèse qui conduit d'une part dans le règne végétal aux glucosides digitaliques et d'autre part dans le règne animal aux hormones stéroïdes est mise en évidence (R. TSCHESCHE, *Angew. Chemie* 73, 74 (1961)). D'ailleurs depuis longtemps déjà on utilise largement des génines stéroïdes végétales pour la fabrication industrielle de la pregnénolone.

⁷ T. T. TCHEN, dans ⁴, p. 389. – G. POPJÁK et J. W. CORNFORTH, *Adv. Enzymol.* 22, 281 (1960). – Divers auteurs dans *Biosynthesis of Terpenes and Sterols* (CIBA Found. Symp., Churchill, London 1959). – K. BLOCH; G. POPJÁK, dans G. PINCUS, *Hormones and Atherosclerosis* (Academic Press, New York 1959), p. 1; 7. – D. KRITCHEVSKY, dans *Cholesterol* (Wiley & Sons, New York 1958), p. 54.

⁸ R. G. GOULD, dans R. P. COOK *Cholesterol* (Academic Press, New York 1958), p. 209.

⁹ (a) L. F. FIESER et M. FIESER, *Steroids* (Reinhold Publ. Corp., New York 1959), p. 403. – (b) E. HEFTMANN et E. MOSETTIG, *Biochemistry of Steroids* (Reinhold Publ. Corp., New York 1960), p. 3.

(Figure 1) comprend à partir de l'acide acétique environ 30 réactions enzymatiques. Elle diffère dès le début de celle des acides gras supérieurs par le fait qu'il se forme ici tout d'abord de l'acéto-acétyl-CoA (II) tandis que pour les acides gras il s'agit, d'après les plus récentes données de LYNEN, du malonyl-CoA. Avec une troisième molécule d'acétyl-CoA prend naissance, sous l'influence de l'enzyme microsomique, le β -hydroxy- β -méthyl-glutaryl-CoA (III). Celui-ci donne par réduction de la fonction thioester-carboxylique, en passant par le stade aldéhyde, le carbinol primaire sous forme de sa δ -lactone, l'acide mévalonique (IV). Ce dernier avait déjà été isolé antérieurement comme substance de croissance du *Lactobacillus casei*.

Contrairement aux premières suppositions la condensation de l'acide mévalonique ne passe pas par l'isoprène, qui en fait ne peut servir de précurseur biologique. La condensation se fait au contraire avec le pyrophosphate du Δ^3 -isopenténol (V), qui dérive lui-même du 5-pyrophosphate de l'acide mévalonique et peut être désigné comme «l'unité isoprène biologique» cherchée depuis longtemps. Trois de ces unités se condensent ensuite par isomérisation en pyrophosphate de farnésol (VI). Deux molécules de ce dérivé des sesquiterpènes se lient par réduction en squalène (VII), qui avait été déterminé comme produit intermédiaire de cette synthèse en 1953 déjà. Jusqu'à ce dernier stade aliphatique (avec 30 atomes de C) toute la série de réactions est anaérobie, c'est-à-dire qu'elle se poursuit

par réduction et de façon formelle par élimination d'eau et de CO_2 .

De toutes les possibilités de pliage du squalène, celle proposée par WOODWARD et BLOCH est indiquée dans la Figure 1. Des expériences avec des indicateurs radioactifs ont en effet montré que chez l'homme et l'animal *in vivo* ainsi qu'avec des homogénats de foie, TPNH, etc., *in vitro* c'est bien dans cet arrangement qu'il est cyclisé oxydativement. Ainsi se forme, d'après RUZICKA en une réaction «concertée» ou «non stop», avec déplacement des deux groupes méthyles dans une position voisine et introduction d'un groupe hydroxyle, le lanostérol (VIII) tétracyclique. Dans cette stérine, dont la vie dans le foie est très courte, 3 groupes méthyles angulaires sont éliminés sous l'influence d'oxygène et de TPNH, tout d'abord celui de la position 14, la configuration restant conservée ainsi que, de manière étonnante, la position de la double liaison du squelette; suivent alors les deux groupes méthyles en C-4 pour former la stérine de la levure: le zymostérol¹⁰ (IX).

La transformation du zymostérol en cholestérol (XII), qui demande également de l'oxygène, n'est pas encore connue de façon exacte. Les produits intermédiaires comprennent probablement des combinaisons Δ^7 -6-hydroxylées du type X qui peuvent expliquer le passage

¹⁰ Pour le chemin par le méthostérol, voir W. W. WELLS et C. L. LORAH, J. biol. Chem. 235, 978 (1960).

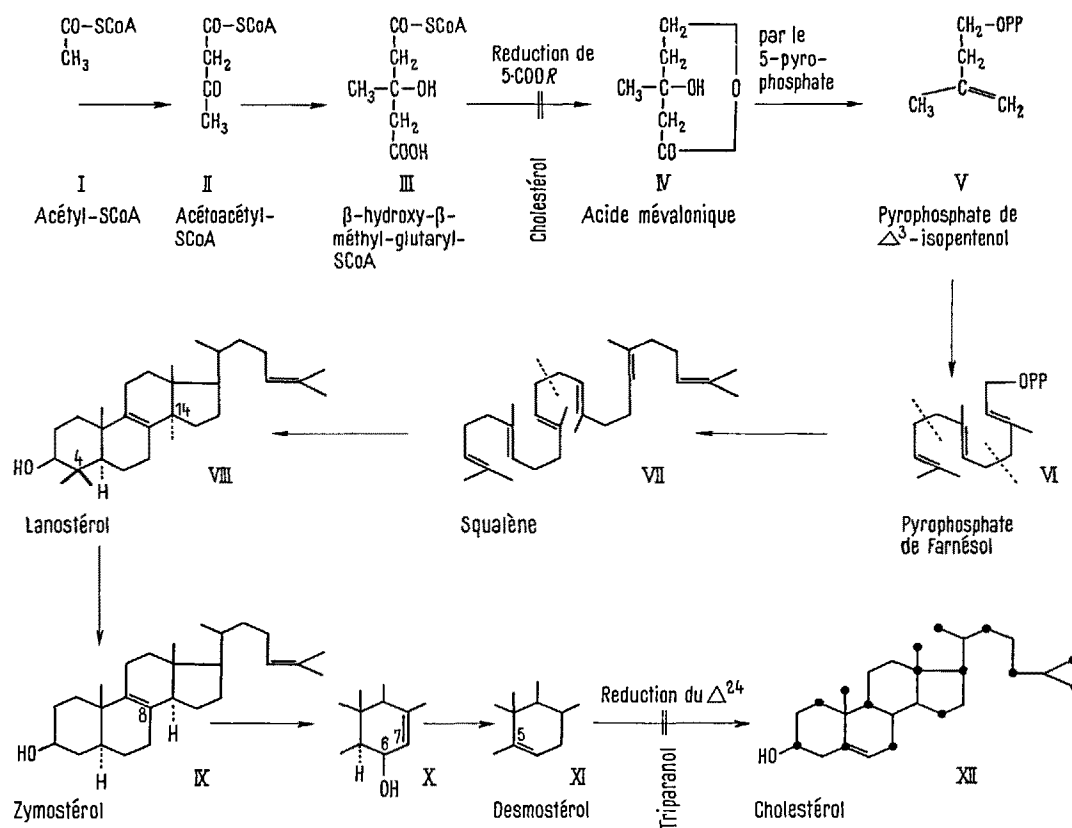


Fig. 1. Biosynthèse du cholestérol.

de la double liaison de la position 8, 9 à 5, 6. Vraisemblablement, la réduction de la double liaison de la chaîne latérale ne s'effectue qu'à la fin, de telle sorte que le *desmostérol* (XI) serait le dernier produit intermédiaire. Dans la formule XII les atomes de carbone du cholestérol provenant des groupes méthyles des restes acide acétique sont désignés spécialement. Les essais avec des précurseurs marqués radioactifs ont été de toute importance pour la détermination de ces emplacements et, par conséquent, de toute la biosynthèse. Il est cependant probable que, à côté de la synthèse principale indiquée ici, d'autres chemins conduisent de l'acide acétique au cholestérol.

La *régulation* du taux de cholestérol du sang qui, normalement, est relativement constant se fait par un mécanisme homéostatique, un mécanisme «feed back». On voit par exemple qu'après ingestion de cholestérol, sa biosynthèse est réduite de manière frappante et ceci au stade de la transformation réductive de l'hydroxyméthyl-glutaryl-CoA (III) en acide mévalonique (IV)¹¹. De ce fait il est presque impossible de créer une hypercholestérolémie chez l'homme et il n'est pas certain que l'hypercholestérolémie soit d'importance primaire pour l'apparition de l'artériosclérose. D'autre part il est possible de produire de l'athéromatose et de l'athérosclérose chez l'animal par hypercholestérolémie expérimentale, et des lésions de ce type contiennent également beaucoup de cholestérol chez l'homme. Le cholestérol est en effet synthétisé aussi localement par les tissus de l'aorte à partir d'acide acétique.

De toute façon des substances qui freineraient ou bloqueraient la biosynthèse du cholestérol présentent un grand intérêt. En effet nombre de produits sont connus¹², qui semblent posséder cette action *in vitro*, mais très rarement *in vivo*; ainsi particulièrement certains analogues de l'œstrane, mais aussi de l'androstande, de l'acide mévalonique et du farnésol, ainsi que la cholesténone, en outre des substances qui n'ont aucune parenté chimique avec le cholestérol ou ses précurseurs, telles que des acides gras inférieurs phénylés, l'amide de l'acide nicotinique ou l'acide pyridyl-acétique et, pour finir, même des substances inorganiques comme des sels de vanadium. Actuellement l'étude du Triparanol (Mer-29) qui s'apparente chimiquement aux œstrogènes synthétiques est poussée activement; cette substance bloque la biosynthèse du cholestérol spécifiquement au dernier stade de l'hydrogénation du *desmostérol* (XI)¹³ dont le taux augmente. On ignore encore si le *desmostérol* possède lui aussi des propriétés athérogènes.

Avant de nous pencher sur la biosynthèse des groupes particuliers d'hormones stéroïdes à partir du cholestérol, il est nécessaire de toucher rapidement la question suivante: le cholestérol est-il un stade intermédiaire obligatoire, ou existe-t-il des *voies vicariantes* de la biogénèse? La coexistence de synthèses indépendantes du cholestérol a été suggérée pratiquement pour

toutes les hormones stéroïdes. Des indications ont été fournies par des expériences dans lesquelles l'acide acétique ou d'autres précurseurs inférieurs radioactifs furent transformés en hormones stéroïdes possédant une activité spécifique supérieure à celle du cholestérol isolé en même temps. HECHTER a été un des premiers à obtenir de tels résultats et il considère l'existence de voies vicariantes comme probable, puisqu'il dit: «La nature semble ne pas vouloir s'appuyer sur une seule voie de synthèse pour des fonctions vitales si importantes.» D'autre part c'est HECHTER qui a discuté d'une façon critique les résultats cités¹⁴. Il dénie la valeur de preuve concluante à ces essais, même à ceux exécutés avec des homogénats exempts de cellules, tant que la comparaison des activités spécifiques n'a pas été faite sur une base cinétique et parce qu'il existe probablement plusieurs «pools» métaboliques du cholestérol qui ne sont pas tous capables d'effectuer la synthèse hormonale. Puisque les substances intermédiaires «X», par lesquelles le cholestérol serait évité, n'ont pas encore été définies jusqu'ici, nous les laissons de côté dans les schémas suivants.

Hormones progestatives. La dégradation de la chaîne latérale du cholestérol (XII)¹⁴ dans les surrénales, les testicules, les ovaires et le placenta, conduit, ainsi que le montre la Figure 2 aux hormones progestatives. Avec des enzymes hydroxylants se forme tout d'abord le 20 β -hydroxy-cholestérol (XIII) et peut-être à partir de celui-ci un 20 β ,22 ξ -dihydroxy cholestérol XIV, puis ensuite sous l'influence d'une 20,22-desmolase la *pregnénolone* (XV). Dans cette transformation étudiée spécialement sur des mitochondries de la surrénale et qui nécessite du TPNH et de l'oxygène, il se scinde contrairement aux constatations antérieures non pas de l'acide iso-caproïque mais de l'aldéhyde iso-caproïque¹⁵. C'est aussi tout récemment que nous avons réussi pour la première fois à isoler de la *pregnénolone* à partir de surrénales (de porc)¹⁶ tandis qu'elle avait été isolée depuis longtemps déjà des tissus testiculaires.

C'est ce passage du cholestérol hydroxylé à la *pregnénolone* qui de toutes les étapes de la biogénèse de toutes les hormones stéroïdes dépend le plus fortement de l'hormone *adrénocorticotrope* (ACTH). Si à ce stade la concentration en triphosphopyridine-nucléotide (TPNH) est déterminante pour la vitesse de réaction,

¹¹ F. LYNEN et al., *Biochem. Z.* 330, 269 (1958); *Fed. Proc.* 18, 20 (1959). - M. D. SIPERSTEIN et M. J. GUEST, *J. clin. Invest.* 39, 642 (1960).

¹² R. G. GOULD et R. P. COOK, dans ⁸, p. 276. - I. H. PAGE, dans ⁸, p. 431. - T.-M. LIU et K. K. CHEN, dans E. JUCKER, *Fortschritte der Arzneimittelforschung* (1959), vol. 1, p. 127.

¹³ T. R. BLOHM et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 85, 245, 250 (1959). - W. M. STOKES et W. A. FISH, *J. biol. Chem.* 235, 2604 (1960). - J. AVIGAN, E. MOSETTIG et al., *J. biol. Chem.* 235, 3123 (1960).

¹⁴ O. HECHTER, dans ⁸, p. 337.

¹⁵ G. CONSTANTOPOULOS et T. T. TCHEN, *Abstracts Papers 139th Meet. Amer. Chem. Soc.* (1961), p. 31C; *J. biol. Chem.* 236, 65 (1961).

¹⁶ R. NEHER et A. WETTSTEIN, *Acta endocr.* 35, 1 (1960).

noter encore que des séquences beaucoup plus courtes telles que 1-10 et même 4-10 sont capables, *in vitro*, de libérer de l'ACTH de l'hypophyse²²; elles possèdent donc une certaine activité du *corticotropin releasing factor* (CRF), hormone de l'hypothalamus postulé par GUILLEMIN, DEGARILHE, SAYERS et par d'autres auteurs^{23,24}, et règlent ainsi indirectement la biogénèse des stéroïdes.

Le premier pas de la transformation de la pregnénone (XV) en progestérone⁴, consiste en la déshydrogénation réversible du groupe carbinol en cétone (Figure 2), sous l'influence d'une déshydrogénase des 3 β -hydroxy stéroïdes²⁵ trouvée dans les microsomes, de préférence avec DPN comme cofacteur. L'enzyme est stéréospécifique, de telle sorte qu'elle attaque bien des combinaisons sans double liaison dans les cycles A et B, mais pas de groupes hydroxyles 3 α . Suit alors, sous l'action d'une Δ^5 -3-céto isomérase, contenue dans le cytoplasme, le déplacement irréversible de la double liaison dans la position conjuguée par rapport au groupe cétonique avec formation de la *progestérone* (XVI). Des enzymes analogues, une 3 β -déshydrogénase et une isomérase, induites dans certaines bactéries, ont été obtenus par TALALAY, le deuxième enzyme étant même isolé sous forme cristalline²⁶.

La progestérone est indubitablement l'hormone progestative propre. Elle a été isolée du corps jaune, il y a 27 ans déjà, par 4 groupes de chercheurs dont le nôtre, plus tard des glandes surrénales, mais ce n'est que dernièrement que nous avons pu démontrer sa présence dans les tissus testiculaires²⁷. Elle a d'autre part aussi été trouvée dans des homogénats ou des perfusats de corps jaunes, de placenta, de surrénales et de testicules. La preuve irréfutable de la sécrétion de la progestérone a été fournie par la méthode citée au début, par sa concentration comparativement forte dans le sang veineux des ovaires²⁸ (variable suivant le cycle), du placenta²⁹ et des surrénales³⁰.

L'organisme produit également d'autres substances *progestatives* qui cependant, vu leurs faibles quantités et leurs faibles activités spécifiques sont d'importance physiologique moindre: Ainsi par exemple la cortexone, hormone des surrénales, pour laquelle un passage à la progestérone a été démontré dans des homogénats de rein, enfin les deux 20-dihydro progestérones XVII et XVIII découvertes par ZANDER. Ces deux substances ont été obtenues par exemple à partir du sang périphérique, de follicules mûrs, de corps jaunes, de tissu adipeux et du sang veineux de placenta^{29,31}; la substance XVII de même à partir du sang veineux de surrénales³² et récemment par nous à partir de tissu surrénalien³³. Elles doivent être considérées comme des métabolites, puisqu'elles sont pratiquement inactives dans le test de CLAUBERG, mais montrent des activités respectives de 0,4 et 2,0 fois celle de la progestérone dans le test local de HOOKER-FORBES. Un grand nombre de tels métabolites, 20 α - ou 20 β -hydroxylés,

provenant des hormones de structure pregnénique ou de leurs précurseurs a été isolé³³, la combinaison XIX, par exemple, à partir de l'urine. Des déshydrogénases des 20-hydroxystéroïdes, qui utilisent de préférence TPN ou TPNH comme cofacteurs pour la transformation réversible, ont été identifiées dans beaucoup de tissus^{33,34}. On a également trouvé dans des microorganismes des enzymes correspondants, dont certains sont cristallisables³⁵; ils peuvent servir au dosage enzymatique quantitatif des 20-céto stéroïdes.

A cause de leur grand intérêt théorique nous citerons ici exceptionnellement deux nouveaux *progestagènes synthétiques*: l'allyloestrénol³⁶, un 19-norstéroïde qui ne porte plus d'oxygène en C-3, et la 9 β ,10 α -rétro-progestérone³⁷, qui diffère par ces deux centres d'isomérisation de la progestérone. La rétro-progestérone est remarquablement plus active que l'hormone naturelle, spécialement sous forme de son dérivé 6-déhydro ou 6-déhydro 17 α -acétoxyolé.

Hormones androgènes. La Figure 4 montre les chemins de la biosynthèse qui conduisent aux hormones androgènes. L'hormone la plus abondante dans les testicules et qui en outre représente l'androgène naturel le plus actif chez l'homme est la testostérone (XXIV), suivie par l'androstènedione (XXIII)²⁷. Ces deux substances ont été isolées, il y a longtemps déjà, en plus forte concentration du sang veineux testiculaire que du sang artériel⁴. Par contre, s'il a souvent été possible d'isoler de l'androstènedione (ainsi que son dérivé 11 β -hydroxylé XXVIII et l'androsténolone = déhydro-épi-androstérone XXII) du sang veineux des surrénales, la testostérone ne l'a été que très rarement. La formation de la testostérone

²² H. KAPPELER et R. SCHWYZER, *Exper.* 16, 415 (1960); *Helv. chim. Acta* 43, 1453 (1960).

²³ M. VOGT, dans 18, p. 85.

²⁴ G. SAYERS, *Adv. Abstr. Symposium Lectures, 1st Internat. Congr. Endocrinol. Copenhagen* (1960), p. 25.

²⁵ B. HURLOCK et P. TALALAY, *J. biol. Chem.* 233, 886 (1958); P. TALALAY et H. G. WILLIAMS-ASHMAN, dans 24, p. 161; *Rec. Progr. Hormone Res.* 16, 1 (1960).

²⁶ P. TALALAY et H. R. LEVY, *CIBA Found. Study Group No. 2*, 53 (1959). - F. S. KAWAHARA et P. TALALAY, *J. biol. Chem.* 235, PC 1 (1960).

²⁷ R. NEHER et A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* 43, 1628 (1960).

²⁸ D. G. EDGAR et al., *Nature* 170, 543 (1952); *J. Endocrinol.* 16, 378 (1957).

²⁹ J. ZANDER, T. R. FORBES, A. M. VON MÜNSTERMANN et R. NEHER, *J. clin. Endocrinol. Metab.* 18, 337 (1958).

³⁰ W. E. BALFOUR et al., *Nature* 180, 1480 (1957). - R. V. SHORT, dans 18, p. 80.

³¹ R. V. SHORT, *CIBA Found. Colloq. Endocrinol.* 11, 362 (1957); *J. Endocrinol.* 16, 415 (1958).

³² W. E. BALFOUR et al., *Nature* 183, 467 (1959). - Voir par contre: R. V. SHORT, dans 18, p. 74.

³³ R. NEHER et A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* 43, 1171 (1960).

³⁴ W. G. WIEST, *Adv. Abstr. Short Commun. 1st Internat. Congr. Endocrinol. Copenhagen* (1960), 965.

³⁵ H. J. HÜBENER et al., *Naturwiss.* 46, 112 (1959); *Biochem. Z.* 333, 88, 95 (1960); *Angew. Chemie* 73, 44 (1961). - A. L. NUSSBAUM et al., *Chem. & Ind.* 1960, 836. - F. CARVAJAL et al., *J. org. Chem.* 24, 695 (1959).

³⁶ S. A. SZPILFÖGEL et al., *Chem. & Ind.* 1959, 905.

³⁷ E. H. REERINK et al., *Nature* 186, 168 (1960). - H. G. L. SCHÖLER et al., dans 34, p. 917; *Acta Endocrinol.* 35, 188 (1960).

semble impossible dans les surrénales normales, mais bien dans les tumeurs surrénales. Tandis que la conversion de la pregnénolone (XV) en androstènedione se poursuit aussi bien dans les gonades que dans les surrénales, le passage de l'androstènedione à la testostérone dans les tissus endocriniens est, par contre, caractéristique des testicules et des ovaires. Inversement, les dérivés XXVIII et XXIX de l'androstènedione, oxygénés en position 11, sont des produits spécifiques du métabolisme des surrénales mais ne montrent qu'une très faible activité androgène.

Le fait que le passage de la pregnénolone à l'androstènedione dans les gonades et dans les surrénales (et probablement aussi dans le placenta) suit deux chemins différents résulte particulièrement des travaux de DORFMAN³⁸⁻⁴⁰, ainsi que de NEHER et WETTSTEIN^{18, 27, 41, 42}. Dans les gonades, et ceci dans les testicules aussi bien que dans les ovaires, c'est le chemin passant par la progestérone et la 17 α -hydroxy-progestérone (XXI) qui prime, dans les surrénales par contre le passage par la 17 α -hydroxy-pregnenolone (XX) et l'androsténolone (XXII). Notons en marge que pour les surrénales une autre voie de synthèse indépendante des stéroïdes C₂₁ et passant directement du cholestérol à l'androsténolone a été indiquée^{43, 44}, mais ceci ne semble pas se confirmer⁴.

Passons aux résultats des travaux récents concernant les différents chemins de synthèse: La première réaction consiste en une 17 α -hydroxylation de la pregnénolone ou de la progestérone; elle est donc identique à la première étape de la biosynthèse des glucocorti-

coïdes. Que l'incubation de coupes de testicules ou d'ovaires ou des homogénats produise de la 17 α -hydroxy-progestérone (XXI) à partir de la progestérone, puis ensuite de l'androstènedione et de la testostérone, à été démontré, il y a 5 ans déjà et en utilisant des éléments radioactifs, par différents groupes de chercheurs (SAMUELS; LYNN; DORFMAN; LIEBERMAN^{4, 38}). Il a aussi été possible, plus tard, de démontrer cette 17 α -hydroxylation par des fractions de placenta humain⁴⁵ et par des préparations de surrénales de porc *in vitro*⁴⁶, enfin pour l'homme *in vivo*⁴⁷. En accord avec ces faits la 17 α -hydroxy-progestérone a été isolée des testicules par nous-mêmes²⁷, des ovaires par ZANDER⁴⁸ et il y a 20 ans déjà par PFIFFNER de même que par REICHSTEIN des surrénales. On a pu l'isoler également du sang veineux surrénalien humain^{49, 50}. La 17 α -hydroxy-progestérone, un androgène très faible, est de même pratiquement inactive dans le test progestatif de

³⁸ R. I. DORFMAN, Proc. Fourth Internat. Congr. Biochem. Vienna 4, 175 (1959).

³⁹ M. GOLDSTEIN, M. GUT et R. I. DORFMAN, Biochim. biophys. Acta 38, 190 (1960).

⁴⁰ R. I. DORFMAN, dans ³⁴, p. 211.

⁴¹ F. W. KAHNT, R. NEHER, K. SCHMID et A. WETTSTEIN, Exper. 17, 19 (1961).

⁴² R. NEHER et A. WETTSTEIN, dans ³⁴, p. 693.

⁴³ R. I. DORFMAN, CIBA Found. Colloq. Endocrin. 12, 62 (1958).

⁴⁴ O. HECHTER, dans ⁸, p. 309.

⁴⁵ B. LITTLE et A. SHAW, dans ³⁴, p. 713.

⁴⁶ B. G. RAO et R. D. H. HEARD, Arch. Biochem. Biophys. 66, 504 (1957).

⁴⁷ S. SOLOMON, S. LIEBERMAN et al., J. biol. Chem. 233, 1084 (1958).

⁴⁸ J. ZANDER, J. biol. Chem. 232, 117 (1958).

⁴⁹ M. E. LOMBARDO et al., Endocrinol. 65, 426 (1959).

⁵⁰ R. V. SHORT, dans ¹⁸, p. 59.

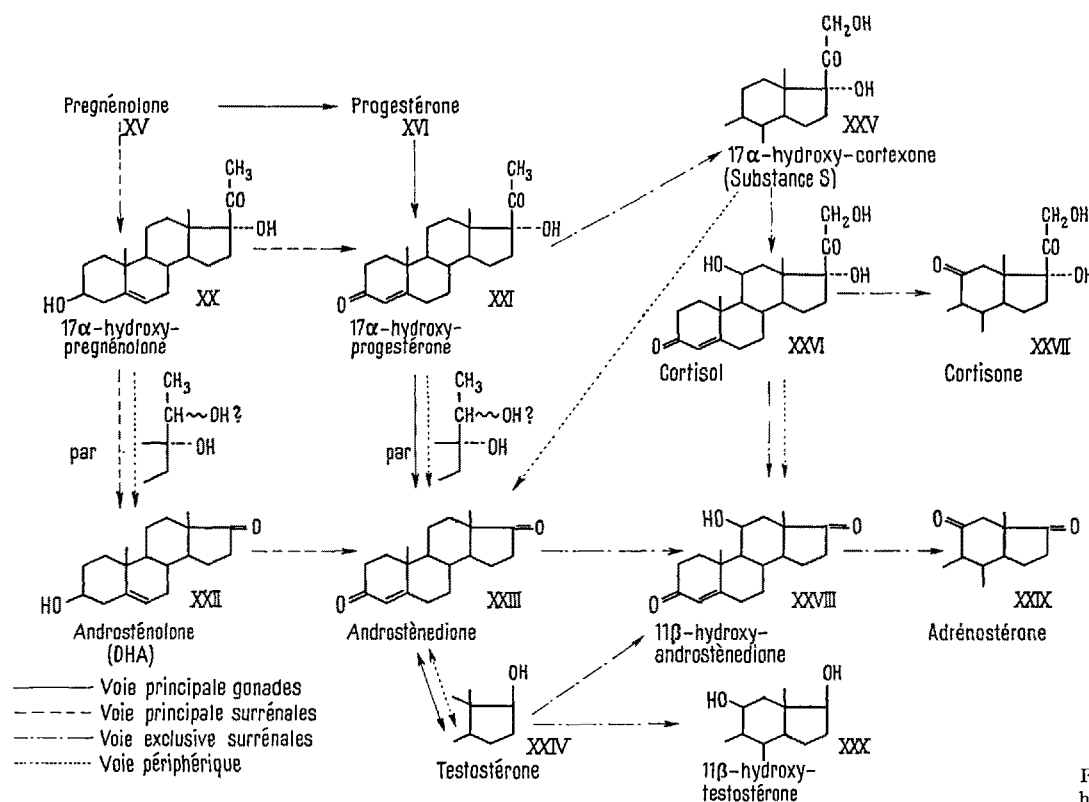


Fig. 4. Biosynthèse des hormones androgènes.

CLAUBERG, mais trouve une application thérapeutique comme progestagène sous forme de 17-esters.

Comme déjà esquissé la 17 α -hydroxylation se fait dans les surrénales de préférence déjà au stade de la pregnénolone. En effet la 17 α -hydroxy-pregnénolone (XX) a été obtenue du sang veineux surrénalien⁵¹, et des homogénats de tissus adénomateux de surrénales ont transformé la pregnénolone en androsténolone en passant probablement par XX³⁹. Il nous⁴¹ a été possible ces derniers temps de réaliser cette 17 α -hydroxylation *in vitro* non seulement avec des homogénats surrénaliens, de préférence avec la solution surnageante, mais aussi avec des homogénats de testicules. Les deux préparations - pour les surrénales de préférence le résidu cellulaire - étaient d'ailleurs aussi capables de dégrader la 17 α -hydroxy-pregnénolone en androsténolone. De plus nous avons isolé la 17 α -hydroxy-pregnénolone des surrénales mais non des testicules, tandis qu'au contraire l'androsténolone a été obtenue des testicules mais pas des surrénales normales¹⁶. Tous ces résultats semblent indiquer que la voie qui préfère les Δ^5 -stéroïdes se poursuit non seulement dans les surrénales humaines (et ceci dans les glandes saines en principe jusqu'au stade de la 17 α -hydroxy-pregnénolone, dans les néoplasmes de préférence jusqu'à l'androsténolone), mais que les testicules possèdent également à un degré restreint cette capacité attribuée autrefois exclusivement aux surrénales.

Le pas suivant dans la biogénèse des androgènes, la *dégradation de la chaîne latérale* de XXI à XXIII ou de XX à XXII, s'effectue sous l'influence de 17,20-desmolases qui ont été décelées de forte activité dans les testicules mais d'activité plus faible dans les ovaires et les surrénales⁴. Le système enzymatique utilise de l'oxygène et TPNH comme cofacteur. La réaction n'est pas liée aux tissus endocriniens, mais se passe aussi à la périphérie, particulièrement dans le foie (LIEBERMAN). Comme produits intermédiaires on a proposé des 17 α ,20 ξ -glycols. Un indice dans ce sens nous a été fourni par l'isolement d'une quantité appréciable de 17 α ,20 α -dihydroxy- Δ^4 -pregnène-3-one à partir de surrénales de porc³³ ainsi que de la même combinaison, à côté de très petites quantités de son 20 β -épimère, à partir de testicules de porc²⁷. Les deux isomères ont également été obtenus par incubation de la 17 α -hydroxy-progesterone avec des coupes d'ovaires humains⁵², le dernier il y a fort longtemps déjà par perfusion du même précurseur dans la surrénale bovine⁵³. La dégradation de la 17 α -hydroxy-progesterone en androstènedione avec des homogénats de testicules produit en plus de l'acide acétique (LYNN).

Toute une série de microorganismes, par exemple *Penicillia*⁵⁴, sont aussi capables de dégrader la chaîne latérale. A partir de la progesterone quelques-uns produisent, à côté de l'androstènedione, de la testostérone ou les deux dérivés correspondants deshydrogénés en position 1. (Pour le mécanisme de réaction voir⁵⁵.)

LIEBERMAN⁵⁶ a démontré que le passage de la 17 α -hydroxy-pregnénolone à l'androsténolone a réellement lieu *in vivo*. Nous avons déjà parlé de la même transformation par les homogénats de surrénales et de testicules effectuée dans nos laboratoires. Les produits intermédiaires possibles, le 17 α ,20 α -diol et le 17 α ,20 β -diol, sont connus dans ce cas aussi; ils se forment par incubation du précurseur avec des tissus musculaires de lapin⁵⁷.

Pour les liens entre les deux voies de synthèse, la transformation de XX en XXI ainsi que XXII en XXIII, il n'y a rien de nouveau à signaler. Ces transformations se passent, comme celle déjà citée de la pregnénolone en progesterone, sous l'influence de la 3 β -hydroxy-déhydrogénase puis de celle de l'isomérase. HÖKFELT⁵⁸ a transformé dernièrement la 17 α -hydroxy-pregnénolone ainsi que la pregnénolone en 17 α -hydroxy-progesterone et plus loin en XXV et XXVI au moyen de coupes de surrénales animales et humaines; en plus petite quantité il se formait également XXII. Pour la transformation de l'androsténolone en androstènedione on peut citer à nouveau les travaux de TALALAY^{25,26}. A part les enzymes des surrénales⁵⁹, ceux des testicules et du foie⁶⁰ sont également capables d'effectuer cette réaction.

Parmi les produits finaux on peut considérer l'*androsténolone* et l'*androstènedione* comme les principaux androgènes de la surrénale humaine^{50,56a}. L'*androsténolone* est formée au dernier stade à la périphérie. On l'a trouvée dans le sang veineux des surrénales^{49,50,61}, dans des tumeurs surrénaliennes, de plus naturellement en grande quantité dans les urines et, comme déjà dit, dans les testicules, mais jamais dans les surrénales saines. L'*androstènedione* a été isolée de tissus des glandes surrénales, des testicules^{27,62} et des ovaires⁴⁸, de même, comme déjà cité, des sangs veineux correspondants. Elle est réduite de façon réversible en *testostérone* dans les gonades, particulièrement dans les testicules, en outre dans le foie et dans les reins, mais pas dans les surrénales. Cette réaction semble être produite par deux enzymes différents dépendants l'un de DPN, l'autre de TPN⁶⁰ (voir⁴). A partir de testicules

⁵¹ H. CARSTENSEN, G. W. OERTEL et K. EIK-NES, J. biol. Chem. 234, 2570 (1959).

⁵² T. SANDOR et A. LANTHIER, Canad. J. Biochem. 38, 1167 (1960).

⁵³ R. I. DORFMAN et F. UNGAR, Metabolism of Steroid Hormones (Burgess Publ. Co., Minneapolis 1953), p. 31.

⁵⁴ E. VISCHER et A. WETTSTEIN, Adv. Enzymol. 20, 262 (1958). - D. H. PETERSON, dans 38, p. 93.

⁵⁵ G. S. FONKEN et al., J. Amer. chem. Soc. 82, 5507 (1960).

⁵⁶ (a) S. LIEBERMAN et R. V. WIELE, dans 18, p. 153. - (b) S. SOLOMON, A. C. CARTER et S. LIEBERMAN, J. biol. Chem. 235, 351 (1960).

⁵⁷ P. Z. THOMAS, E. FORCHIELLI et R. I. DORFMAN, J. biol. Chem. 235, 2797 (1960).

⁵⁸ M. B. LIPSETT et B. HÖKFELT, Exper., en impression.

⁵⁹ I. M. P. DAWSON et al., Biochem. Soc., 400th Meeting, Nov. 18 (1960).

⁶⁰ CH. D. KOCHAKIAN, dans 18, p. 196.

⁶¹ I. E. BUSH et V. B. MAHESH, J. Endocrin. 13, 1 (1959).

⁶² H. R. LINDNER, Nature 183, 1605 (1959).

de taureau nous avons isolé à côté de la testostérone «normale» 1/20 de sa quantité en 17-épi-testostérone. Il est intéressant de noter que dans ce tissu la relation androstènedione/testostérone baisse fortement avec l'âge⁶³. La transformation réciproque des deux androgènes par des enzymes tissulaires a aussi son équivalent microbiologique.

Dernièrement un chemin de la biosynthèse de la testostérone à partir de la progestérone a été postulé, qui ne passerait pas par la 17 α -hydroxy-progestérone et l'androstènedione⁶⁴. Quant à cette conclusion qui se base sur la comparaison de radioactivités spécifiques, il sied d'en appeler aux restrictions de principe déjà citées. Elle est d'ailleurs en contradiction avec les anciens résultats de SAMUELS⁴.

Nous ne pouvons pas entrer dans le détail de la biosynthèse des *androgènes oxygénés en 11*, spécifiques des surrénales, telle qu'elle ressort du schéma 4 des formules. Il est à remarquer, toutefois, que la dégradation de la chaîne latérale peut également s'effectuer à la périphérie (dans le foie) pour la 17 α -hydroxy-cortexone (XXV) ou le cortisol. La 11 β -hydroxy-androstènedione (XXVIII) a été isolée autrefois par nous des surrénales mais pas des testicules, l'adrénostérone décelée dans les testicules²⁷, dans les surrénales animales mais pas dans celles de l'homme (voir encore^{38,50}). La transformation de la testostérone en XXVIII, XXIX et XXX a été obtenue par des tissus tumoraux de testicules⁴³. En analogie avec la série 11-désoxy nous³³ avons réussi à isoler la 11 β -hydroxy-17-épi-testostérone, et ceci à partir des surrénales, mais sans obtenir ici la combinaison «normale» en 17.

La production des androgènes dans les surrénales est réglée par l'ACTH, la production dans les gonades par la gonadotropine de l'hypophyse ou du placenta^{14,38}. Réciproquement les hormones sexuelles contrôlent à un certain degré la sécrétion de la gonadotropine⁶⁵. Nous reviendrons aux inhibiteurs surrénaux, qui freinent également la biosynthèse des androgènes dans les surrénales, lorsque nous aborderons les corticoïdes.

Hormones œstrogènes. Dans la discussion concernant la biosynthèse des hormones œstrogènes (résumés voir⁶⁶⁻⁷⁰) nous toucherons seules les substances qui ne sont aromatisées que dans le noyau A, c'est-à-dire l'œstrone, les œstradiols et les œstriols, laissant de côté l'équiline et l'équilénine qui se forment probablement par une autre voie. Le premier groupe est formé dans le tissu ovarien, et ceci en quantité variable aux différents stades du cycle, dans les tissus placentaires et testiculaires et sporadiquement dans le tissu surrénalien^{50,71}. Tandis que la formation à partir d'acide acétique a été

⁶³ H. R. LINDNER et T. MANN, J. Endocrin. 21, 341 (1960).

⁶⁴ H. FORCHIELLI, M. GUT et R. I. DORFMAN, Federation Meeting (Printemps 1961).

⁶⁵ F. A. KINCL et R. I. DORFMAN, in ³⁴, p. 855.

⁶⁶ E. DICZFALUSY et CH. LAURITZEN, *Östrogene beim Menschen* (Springer, Berlin 1961), p. 79.

⁶⁷ H. BREUER, Z. Vitamin-Hormon-Fermentforsch. 11, 200 (1960).

⁶⁸ W. DIRSCHERL, dans AMMON et DIRSCHERL, *Fermente, Hormone, Vitamine* (Thieme, Stuttgart 1960), 3. Aufl., vol. II, p. 223.

⁶⁹ L. L. ENGEL, dans G. PRINCUS et E. P. VOLLMER, *Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer* (Academic Press, New York 1960), p. 116.

⁷⁰ PH. A. KATZMAN, E. A. DOISY et al., Ann. Rev. Biochem. 28, 269 (1959).

⁷¹ S. R. STITCH, dans ³⁴, p. 701.

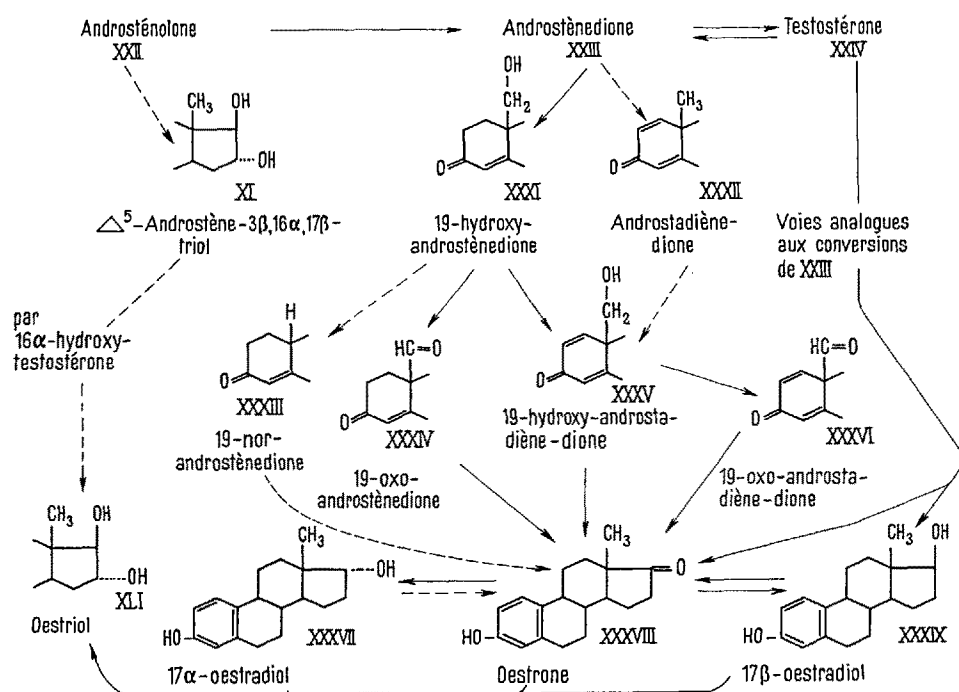


Fig. 5. Biosynthèse d'hormones œstrogènes.

prouvée fréquemment *in vitro*, dans la perfusion et *in vivo*, la question de savoir si le chemin passe principalement par le cholestérol, les combinaisons du prégnène et les androgènes est à discuter. Il est à noter à ce sujet que la transformation du cholestérol signé en œstrone de haute radioactivité a été prouvée chez la femme enceinte⁷², que la progestérone et l'œstrone se forment de manière analogue à partir d'acide acétique chez la jument gravide en passant probablement par le cholestérol⁷³ et que la testostérone est transformée, *in vivo* et *in vitro*, en œstrone et en œstradiol avec un meilleur rendement que l'acide acétique (DORFMAN). Les corticostéroïdes, tels que la cortisone, *in vivo*, donnent également des œstrogènes, particulièrement ceux ayant une position 11 oxygénée⁶⁶. Dernièrement DORFMAN⁷⁴ a proposé un chemin de synthèse conduisant de l'acide acétique aux œstrogènes en évitant le cholestérol et les stéroïdes C₁₉.

Si une preuve absolue des voies biologiques normales n'est pas encore donnée, il semble néanmoins que la transformation des androgènes en œstrogènes soit un cheminement important de la biogénèse; dans tous les cas c'est le seul qui, aujourd'hui, soit représentable par formules, ainsi que nous le montrons dans la Figure 5. Avec des microsomes de placenta humain et TPNH, RYAN⁷⁵ a pu transformer l'androstènedione ou la testostérone avec des rendements allant jusqu'à 60% en œstrone (XXXVIII) ou en œstradiol (XXXIX) (voir aussi⁷⁶); DORFMAN⁷⁴ a même observé un rendement de 80% pour la première réaction. Ces réactions ont également pu être réalisées avec des préparations d'ovaires^{76,77}, où l'hormone folliculostimuline (FSH) améliorait l'aromatisation⁷⁸, soit encore avec des préparations de corps jaunes⁷⁹, de testicules⁷⁶ et d'un carcinome surrénalien⁷⁶. Ces transformations ont également été observées *in vivo*, chez l'homme et la jument gravide. Elles ne semblent pas nécessairement liées aux tissus endocriniens nommés, car on les a aussi observées chez des femmes ovariectomisées et adrénaléctomisées. Que l'androsténolone également puisse servir de produit de départ de l'œstrone résulte d'essais *in vivo* chez l'homme, ainsi que d'essais avec des préparations de placenta *in vitro*^{75,80}, qui donnèrent une conversion de 70%⁷⁴.

Pour la reconnaissance des chemins de réaction les travaux de MEYER⁸¹, datant déjà de 1955, ont montré la voie à suivre; ils ont indiqué que les homogénats surrénaux transforment l'androstènedione et l'androsténolone en 19-hydroxy-androstène-dione (XXXI). Cette combinaison perdait d'une part facilement du formaldéhyde par scission en milieu légèrement alcalin, selon la méthode de Ehrenstein, pour former la 19-nor-androstène-dione (XXXIII); d'autre part, elle livrait la 19-oxo-androstènedione (XXXIV) par déshydrogénation. MEYER a tout de suite reconnu que XXXI est un produit intermédiaire approprié pour l'aromatisation, puisqu'il était transformé mieux et

plus rapidement en œstrone que l'androstènedione dans le placenta. Toute une série de stéroïdes a été hydroxylée en position 19 par des enzymes de surrénales aussi bien que de microorganismes, mais ce n'est que dernièrement qu'il a été possible, après incubation de l'androstènedione avec des microsomes de placenta humain, de déceler son dérivé 19-hydroxy à côté de l'œstrone et de ce fait de trouver pour la première fois une 19-hydroxylase dans un autre tissu animal que dans les surrénales⁸⁰. Même si l'on admet que l'aromatisation se fait par perte de formaldéhyde ou de CO₂ à partir d'un β-carbinol vinylogue ou d'un tel céto-acide, combinée avec une déshydrogénation à un stade propice, il reste encore quantité de chemins de réactions et de produits intermédiaires parmi lesquels nous avons choisi les plus importants dans la Figure 5.

Une première lumière a été engendrée par de nouveaux essais avec des préparations de placenta humain pour la conversion de produits intermédiaires possibles en œstrogènes. D'après RYAN⁸² XXXI possède une activité de substrat légèrement plus forte que XXIII et XXIV, tandis que XXXII, le 17β-ol correspondant, ainsi que XXXIII ne possèdent que 1/4-1/5 de cette activité⁸³. Dans des essais de DORFMAN également^{74,84} XXXII et le 17β-ol correspondant à XXXIII n'ont fourni que des rendements de 20 et 5% en œstrone; les chemins passant par XXXII et XXXIII ne devraient donc jouer qu'un rôle secondaire. Cette constatation est étonnante, puisque XXXII a été trouvé comme métabolite de la progestérone dans les excréments de vaches en gestation⁸⁵ et a pu être transformé en œstrone, non seulement par des tissus placentaires, mais aussi d'ovaires et de surrénales. De plus, pour la transformation de XXXIII en œstrogène un même rendement que pour la testostérone a été observé dans un cas de carcinome. Avec des microorganismes^{86,87} il a aussi été possible de faire cette transformation et ceci avec des rendements allant jusqu'à 80%.

⁷² H. WERBIN et al., J. Amer. chem. Soc. **79**, 1012 (1957).

⁷³ K. SAVARD, R. I. DORFMAN et al., J. biol. Chem. **231**, 765 (1958).

⁷⁴ R. I. DORFMAN, dans **38**, p. 229.

⁷⁵ K. J. RYAN, Biochim. biophys. Acta **27**, 658 (1958); Fed. Proc. **17**, 138 (1958); J. biol. Chem. **234**, 268 (1959).

⁷⁶ B. BAGGETT et al., Endocrinol. **64**, 600 (1959).

⁷⁷ B. BAGGETT et al., J. biol. Chem. **221**, 931 (1956). - H. H. WOTIZ et M. GUT, J. biol. Chem. **222**, 487 (1956). - N. HOLLANDER et V. P. HOLLANDER, Cancer Res. **19**, 290 (1959).

⁷⁸ N. HOLLANDER et V. P. HOLLANDER, J. biol. Chem. **233**, 1097 (1958).

⁷⁹ M. L. SWEAT et al., Biochim. biophys. Acta **40**, 289 (1960).

⁸⁰ J. E. LONGCHAMPT, C. GUAL, M. EHRENSTEIN et R. I. DORFMAN, Endocrinol. **66**, 416 (1960).

⁸¹ A. S. MEYER, Exper. **11**, 99 (1955).

⁸² K. J. RYAN, dans **34**, p. 697; Acta endocrin. Suppl. **51**, 697 (1960).

⁸³ A. S. MEYER, Biochim. biophys. Acta **17**, 441 (1955).

⁸⁴ M. HAYANO, R. I. DORFMAN et al., Acta endocrin. Suppl. **51**, 699 (1960).

⁸⁵ W. R. MILLER et C. W. TURNER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **90**, 142 (1955).

⁸⁶ H. R. LEVY et P. TALALAY, J. Amer. chem. Soc. **79**, 2658 (1957).

⁸⁷ S. KUSHINSKY, J. biol. Chem. **230**, 31 (1958). - R. C. MEEKS et al., Chem. & Ind. **1958**, 391.

DORFMAN a de plus trouvé que la substance XXXIV donne les mêmes taux de conversion que XXXI. C'est ainsi qu'aujourd'hui et d'après les essais *in vitro* les voies indiquées par des flèches pleines sont les plus importantes. Elles comprennent une 19-hydroxylation primaire, suivie d'une déshydrogénation soit du carbinol angulaire en aldéhyde, soit de la liaison des atomes de carbone 1,2, suivie, si cela est nécessaire, d'une nouvelle déshydrogénation ou d'une oxydation aux emplacements indiqués, pour finir par l'élimination du C-19.

Les transformations réversibles de l'œstrone en 17 β -et 17 α -œstradiol par des 17-déhydrogénases spécifiques ont été observées *in vivo* mais aussi *in vitro* avec des cellules ou des préparations diverses de tissus également nonendocriniens tels que de foie, de reins, et de sang⁸⁸. Le 17 α -œstradiol semble être le produit final chez le bœuf.

L'œstriol (XLI) et ses épimères ont été obtenus par exemple avec des tissus humains d'ovaires, de placenta et plus particulièrement de foie à partir de l'œstrone, du 17 β -œstradiol et des combinaisons correspondantes 16 α -hydroxy ou 16-oxo⁸⁹. Un chemin de rechange de la biosynthèse passe sûrement de l'androsténolone au Δ^5 -androstène-3 β ,16 α ,17 β -triol (XL) et de celui-ci probablement par la 16 α -hydroxy-testostérone. Ces deux substances ont en effet été transformées, avec des rendements très appréciables, par des microsomes de

placenta et TPNH, en œstriol, voire en 16 α -hydroxy-œstrone⁹⁰. Que les stéroïdes 16 α -hydroxylés jouent un grand rôle dans le métabolisme du placenta est démontré par notre récente réussite d'isolement de la 16 α -hydroxy-testostérone comme stéroïde le plus important après l'œstriol dans le placenta humain⁹¹. Pour les combinaisons anti-œstrogènes voir⁵.

Hormones cortico-surrénales classiques. Dans la Figure 6 nous avons représenté les 12 étapes possibles de la biosynthèse des hormones de la surrénale (résumés 4, 44, 92-96), qui par hydroxylations successives de la progestérone en position 17 α , 21 et 11 β conduisent aux 7 produits de réaction. Les combinaisons indiquées à gauche et en bas, la cortéxone (XLII), la 17 α -hydroxy-cortéxone (XXV), la corticostérone (XLIII) et le cortisol (XXVI) représentent 4 des 6 hormones surrénales classiques. Leurs propriétés de glucocorticoïdes augmentent dans la succession indiquée, tandis que leurs propriétés de minéralocorticoïdes diminuent dans

⁸⁸ W. VELLE et S. ERICHSEN, Acta endocrin. 33, 277 (1960).

⁸⁹ G. F. MARRIAN, dans 38, p. 208.

⁹⁰ K. J. RYAN, J. biol. Chem. 234, 2006 (1959).

⁹¹ R. NEHER et A. WETTSTEIN, résultats nouveaux.

⁹² A. WETTSTEIN, Monatsschr. Kinderheilk. 108, 164 (1960).

⁹³ A. WETTSTEIN, dans 38, p. 233.

⁹⁴ G. PINCUS, dans 38, p. 61.

⁹⁵ J. K. GRANT, dans 18, p. 24.

⁹⁶ CH. TAMM, dans 68, p. 476, 512.

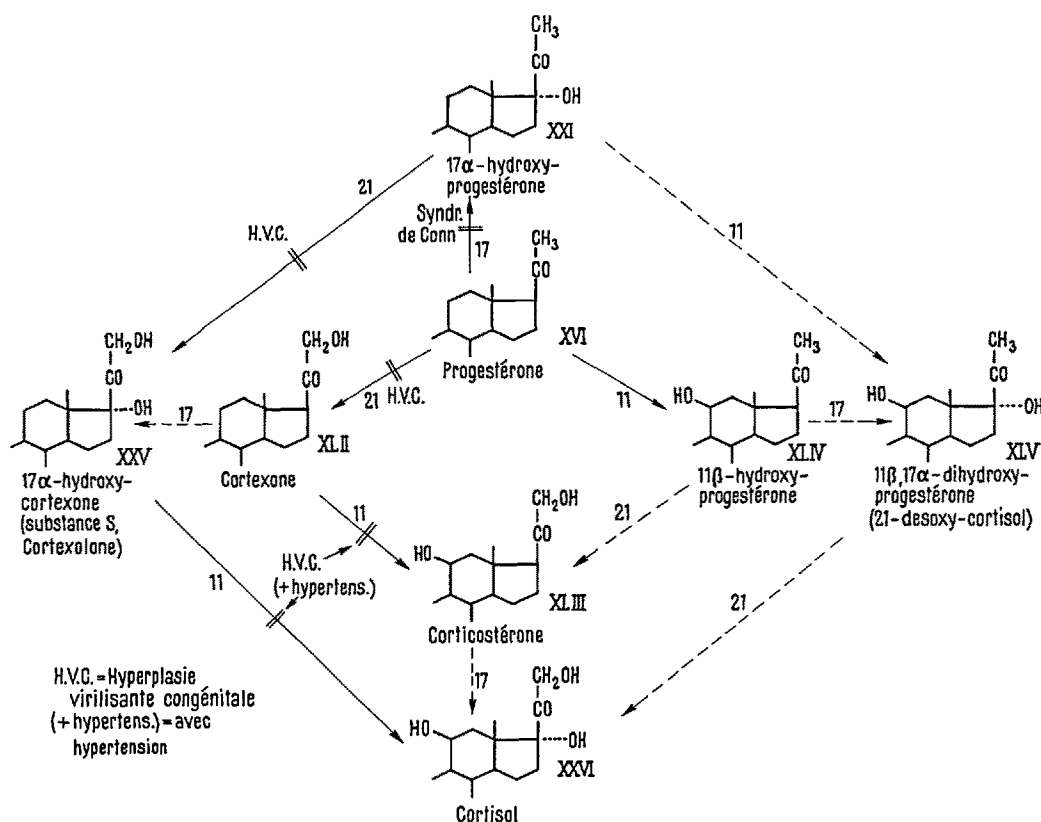


Fig. 6. Biosynthèse des hormones corticoïdes classiques.

En ce qui concerne ces transformations principales, mais seulement celles-ci, il se trouve que les surrénales accomplissent ces hydroxylations dans l'ordre des positions 17α , 21 et 11β , tandis qu'un tel substituant déjà présent dans la molécule empêche l'introduction d'un substituant placé avant lui dans la séquence indiquée. Les substitutions interdites par cette règle représentent les *réactions secondaires* (indiquées en pointillé). Ainsi HEARD¹¹¹ a obtenu régulièrement du cortisol à partir de la cortexone au moyen de coupes de surrénales de différentes espèces. Ses résultats ont été mis en doute⁴⁴, mais nous avons nous-mêmes isolé le dérivé 6β -hydroxylé de la substance S du mélange d'incubation de la cortexone avec des homogénats surrénaux¹¹². Ces résultats soutiennent la possibilité d'une 17α -hydroxylation comme seconde étape ou étape terminale dans la suite des réactions indiquées. Le renversement des séquences préférentielles n'est pas controversé dans l'hydroxylation de la 11β -hydroxy-progestérone qui, en effet, a fourni de la corticostérone et du cortisol^{44,113}. On a aussi démontré que la combinaison XLV est hydroxylable en position 21¹¹⁴. La supposition que les voies de la biosynthèse indiquées dans la partie droite de notre schéma soient véritablement des chemins de rechange menant au cortisol est consolidée de manière intéressante par l'isolement, qui nous a tout dernièrement été possible, de la 11β -hydroxy-progestérone¹¹⁵ ainsi que des dérivés 20-dihydrogénés de cette combinaison et de XLV³³ dans les surrénales de porc.

Pour les chemins de rechange de la biosynthèse des corticoïdes, qui ne passent pas par le cholestérol, nous nous en rapportons à la littérature^{4,95}.

Il est intéressant de noter l'interruption des différentes réactions d'hydroxylation dans certaines *maladies*⁹². Dans l'aldostéronisme primaire de CONN, il semble que la tumeur surrénalienne présente une déficuosité de la 17α -hydroxylation¹¹⁶, de telle sorte que la biosynthèse est déviée des glucocorticoïdes vers les minéralocorticoïdes et particulièrement vers l'aldostérone. (Pour le métabolisme des stéroïdes, également dans d'autres tumeurs endocriniennes voir¹¹⁷). Dans l'hyperplasie virilisante congénitale^{118,119}, un syndrome surrénogénital, il faut faire la différence entre d'une part la forme compensée et la forme entraînant une perte de sel, d'autre part la forme hypertensive. L'image des premières maladies montre un défaut dans la 21-hydroxylation (voir aussi¹²⁰) de telle sorte que la progestérone et la 17α -hydroxy-progestérone s'accumulent dans les surrénales, et de grandes quantités de leurs métabolites, le pregnanediol et le pregnane- 3α , 17α , 20α -triol sont éliminés par les urines. Dans la forme hypertensive le système de la 11β -hydroxylase est déficient, ce qui conduit au blocage au stade de la cortexone et de la 17α -hydroxy-cortexone avec une élimination accrue de ses dérivés tétrahydrogénés. Une virilisation est commune à toutes ces formes, provoquée par la déviation de la biosynthèse vers les hormones

androgènes, augmentée encore par la surproduction d'ACTH dont la formation n'est plus freinée par le cortisol.

Les récents *antagonistes* des corticostéroïdes⁵ sont de grande portée pratique. Dans notre domaine les substances qui nous intéressent sont celles qui ne touchent pas les effets périphériques, mais qui, de façon analogue aux maladies citées, bloquent la genèse des stéroïdes sélectivement dans les surrénales. L'amphénone B (3,3-bis-(*p*-aminophényl)-butanone-(2)) freine toutes les 3 réactions hydroxylantes ainsi que la transformation du Δ^5 - 3β -hydroxy- en Δ^4 -3-céto-stéroïdes¹²¹. La métopirone® (2-méthyl-1,2-bis(3-pyridyl)-propanone-(1))¹²², un analogue pyridique de bien moindre toxicité, freine de préférence la 11β -hydroxylation¹²³, de telle sorte qu'il se forme une image semblable à celle rencontrée dans l'hyperplasie virilisante congénitale avec hypertension. La métopirone® revêt un emploi diagnostique dans les maladies de l'hypophyse¹²⁴, ainsi qu'un emploi thérapeutique (en association avec un inhibiteur de l'ACTH, tel qu'un glucocorticoïde) pour l'élimination de sodium. Ces tout derniers temps des substances ont été développées qui freinent sélectivement la 17α -hydroxylation¹²⁵.

La *régulation* de la sécrétion des glucocorticoïdes dépend de l'ACTH^{18,23}, dont la production est elle-même sous l'influence d'un mécanisme «feed back» négatif dirigé par les corticoïdes. Dernièrement un freinage supplémentaire direct de l'action stimulante de l'ACTH sur la biogénèse des stéroïdes surrénaux par la corticostérone a été démontré¹²⁶.

Aldostérone. Pour la biosynthèse de l'aldostérone nous pouvons être bref puisque ce sujet a été abordé déjà plusieurs fois par l'auteur^{92,93,97,127}. Dans la Figure 7 on remarque les mêmes 4 combinaisons centrales que pour la biogénèse des hormones classiques des surrénales; cela veut dire qu'ici aussi nous avons affaire à des 21- et

¹¹¹ R. D. H. HEARD et al., *Rec. Progr. Hormone Res.* 12, 45 (1956).

¹¹² R. NEHER et A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* 39, 2062 (1956).

¹¹³ J. EICHORN et O. HECHTER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 97, 614 (1958).

¹¹⁴ K. J. RYAN et L. L. ENGEL, *J. biol. Chem.* 225, 103 (1957).

¹¹⁵ R. NEHER et A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* 43, 623 (1960).

¹¹⁶ P. J. AYRES, J. F. TAIT et al., dans MULLER et O'CONNOR, *Internat. Sympos. on Aldosterone* (Churchill, London 1958), p. 73.

¹¹⁷ R. I. DORFMAN, dans ⁹⁹, p. 445.

¹¹⁸ W. R. EBERLEIN et A. M. BONGIOVANNI, *Metabolism* 9, 326 (1960).

¹¹⁹ TH. F. GALLAGHER, dans ⁹⁸, p. 143.

¹²⁰ J. W. JAILER et al., *J. clin. Invest.* 39, 904 (1960); *Clinical Endocrinology* (Grune & Stratton, New York 1960), vol. 1, p. 354.

¹²¹ G. ROSENFELD et W. D. BASCOM, *J. biol. Chem.* 222, 565 (1956).

¹²² W. L. BENCZE et M. J. ALLEN, *J. med. pharm. Chem.* 1, 395 (1959).

¹²³ G. W. LIDDLE et al., *J. clin. Endocrin.* 18, 906 (1958). – J. S. JENKINS, G. W. THORN et al., *Science* 128, 478 (1958). – J. ROCHE et al., *Bull. Soc. Chim. biol.* 42, 913 (1960). – D. K. FUKUSHIMA, T. F. GALLAGHER et al., *J. clin. Endocrin.* 20, 1234 (1960).

¹²⁴ E. R. FROESCH, A. LABHART, R. NEHER, A. PRADER et W. ZIEGLER, *Schweiz. Med. Wschr.* 89, 1232 (1959).

¹²⁵ J. J. CHART et H. SHEPPARD, *Endocrine Soc., Program 43rd Meet.* New York, June 1961, p. 20.

¹²⁶ F. G. PÉRON et al., dans ⁹⁴, p. 707.

¹²⁷ A. WETTSTEIN, *Exp. Ann. Biochim. Méd.* 19, 171 (1957).

11-hydroxylations. La nouveauté réside pour l'aldostérone dans le fait qu'au lieu d'une 17 α -hydroxylation nous avons une hydroxylation en position 18, et que ce groupe hydroxyle est ensuite déshydrogéné à un stade propice en aldéhyde. La figure montre les 20 réactions possibles, qui se combinent en 12 voies différentes pour passer de la progestérone à l'aldostérone; elles englobent au total 10 produits intermédiaires.

Après notre première démonstration de la transformation de la cortexone en 18-hydroxy-cortexone (XLVIII)¹²⁸ et en aldostérone (LIII)¹²⁹ avec des homogénats de surrénales, d'autres chercheurs^{102,130-133} ont réussi à transformer en plus la progestérone, la 11 β -hydroxy-progestérone et la corticostérone en aldostérone par des méthodes *in vitro* et ceci avec des rendements comparables entre les différents précurseurs (voir aussi^{134, 135}). Des résultats semblables ont été obtenus dans la perfusion *in vivo*.

Parmi les substances intermédiaires possibles, la formation de la 18-hydroxy-cortexone, déjà connue, a aussi été observée à partir de précurseurs endogènes dans l'incubation de surrénales¹³⁶. Puis on a produit la 18-hydroxy-corticostérone (LII) à partir de la progestérone^{137,138}. Cette combinaison extraordinairement instable avait été obtenue par synthèse totale dans nos laboratoires et nous l'avions transformée en aldostérone

par des homogénats de surrénales¹³⁹. Ainsi le deuxième échelon de la biosynthèse de l'aldostérone à partir de la corticostérone était démontré. Dans l'incubation de la progestérone ou de la cortexone avec des homogénats de surrénales une substance qui pourrait être la 18-oxo-cortexone (IL) a été décelée¹⁴⁰ récemment.

Comme l'inventaire des faits obtenus présente encore de grandes lacunes, nous poursuivons actuellement par

¹²⁸ F. W. KAHNT, R. NEHER et A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* **38**, 1237 (1955).

¹²⁹ A. WETTSTEIN, F. W. KAHNT et R. NEHER, *CIBA Found. Colloq. Endocrin.* **3**, 170 (1955).

¹³⁰ P. J. AYRES, J. F. TAIT, S. A. S. TAIT et al., *Acta endocrinol.* **33**, 27 (1960); *Biochem. J.* **70**, 230 (1958).

¹³¹ C. J. P. GIROUD, J. STACHENKO et P. PILETTA, dans ¹¹⁶, p. 56.

¹³² P. J. MULROW et G. L. COHN, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **101**, 731 (1959).

¹³³ E. ROSENBERG, R. I. DOREMAN et al., *Endocrinol.* **58**, 708 (1956).

¹³⁴ J. J. BARLOW, D. A. HOLUB et J. W. JAILER, *Clin. Res.* **8**, 373 (1960).

¹³⁵ S. ULICK et S. SOLOMON, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 249 (1960).

¹³⁶ F. G. PÉRON, *Endocrinol.* **66**, 458 (1960), et publication sous presse. - M. K. BIRMINGHAM et P. J. WARD, *J. biol. Chem.*, sous presse.

¹³⁷ S. ULICK et K. KUSH, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 6421 (1960).

¹³⁸ Pour le rôle de LII dans la biogénèse, voir: R. NEHER et A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* **43**, 623 (1960).

¹³⁹ J. SCHMIDLIN et A. WETTSTEIN, *Conférence Congrès des Biochimistes Allemands-Français-Suisses, Zürich* (Octobre 1960).

¹⁴⁰ O. V. DOMINGUEZ, D. W. URRY et L. T. SAMUELS, *Fed. Proc.* **20**, 180 (1961).

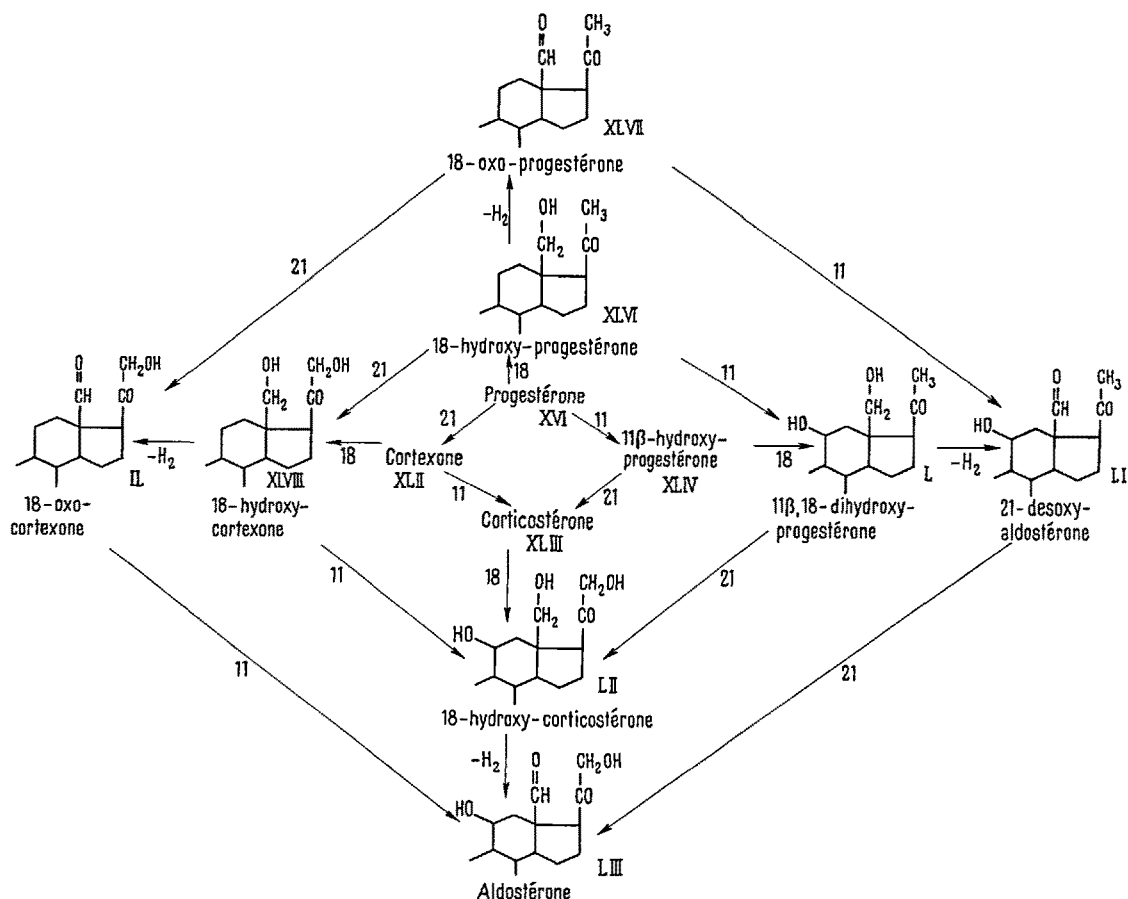


Fig. 7. Biosynthèse de l'aldostérone.

l'expérience et systématiquement l'investigation des différents stades encore obscures de la synthèse. Une condition essentielle, exigée pour ces recherches, était la *préparation synthétique* des produits intermédiaires hypothétiques, tout d'abord pour apprendre à connaître leurs propriétés et pouvoir les déceler dans les mélanges biologiques; pour avoir ensuite la possibilité de les utiliser, eux qui se trouvent en si infimes quantités dans les préparations de surrénales, pour l'étude de leurs transformations biologiques subséquentes dans les voies de la biogénèse. Au début de nos nouvelles recherches certains des produits intermédiaires étaient encore inconnus comme substances chimiques. Entre-temps nous les avons cependant préparés par synthèse, à l'exception de la 18-oxo-cortexone (II). Il s'agit de la 18-oxo-progestérone (XLVII)¹⁴¹, de la 11 β ,18-dihydroxy-progestérone (L)¹⁴² et de la 21-désoxy-alдостérone (LI)¹⁴¹.

Le problème qui se posa ensuite fut de développer une *méthode de séparation* appropriée. Les meilleurs résultats furent obtenus par un «screening» dans la chromatographie sur papier en utilisant comme substances de repère les produits de transformation déjà connus, tels que les substances 17 α -hydroxylées, ainsi que la gamme complète des 11-oxo-dérivés présumés comme métabolites. Parmi ces derniers 4 durent tout d'abord être synthétisés (11-oxo-18-hydroxy-progestérone; 11,18-dioxo-progestérone; 11-oxo-18-hydroxy-cortexone et 11,18-dioxo-cortexone). Nous avons pu constater que la combinaison de 2 à 3 systèmes chromatographiques suffisait pour différencier toutes les substances nommées.

Dans le groupe des substances de *faible polarité*, qui comprend principalement des progestérone mono-oxygénées, les valeurs R_f sont en général suffisamment différentes (voir Figure 8), particulièrement celles de la 18-hydroxy et de la 18-oxo-progestérone qui nous intéressent spécialement. Il est à remarquer que la pro-

mière, qui ne se différencie pas de la 17 α -hydroxy-progestérone dans le premier système de solvants, se transforme quantitativement dans la chromatographie avec le système Bush B₃ en un artéfact de polarité beaucoup plus faible, ce qui permet une identification sans équivoque.

La Figure 9 illustre les conditions établies dans le groupe des substances de *polarité moyenne*, principalement des progestérone di-oxygénées. Ici saute aux yeux la différenciation propice de la 11 β ,18-dihydroxy-progestérone et de la 21-désoxy-alдостérone, deux nouveaux produits intermédiaires qu'il nous a ainsi été possible de déceler pour la première fois.

Grâce au développement de ces moyens diagnostiques, il fut possible, enfin, d'aborder le problème principal. Tout d'abord nous avons incubé une progestérone, marquée au tritium et hautement purifiée, avec des homénats de surrénales et analysé les extraits. Le résultat d'un essai typique est démontré dans le radiogramme de la Figure 10. L'abscisse indique la distance parcourue sur le papier et l'ordonnée le compte des impulsions par minute. Le compteur indiqua un maximum important coïncidant avec l'emplacement de la 18-oxo-progestérone synthétique, chromatographiée simultanément. A sa gauche se trouve un autre maximum moins important, qui provient vraisemblablement de la 11-oxo-progestérone.

La Figure 11 montre un maximum significatif à l'endroit de la 21-désoxy-alдостérone, séparé proprement de la large bande de haute radioactivité située à gauche, qui comprend principalement la corticostérone et la 17 α -hydroxy-cortexone.

Nous avons ensuite dilué les 18-oxo-progestérone et 21-désoxy-alдостérone décelées avec les produits cor-

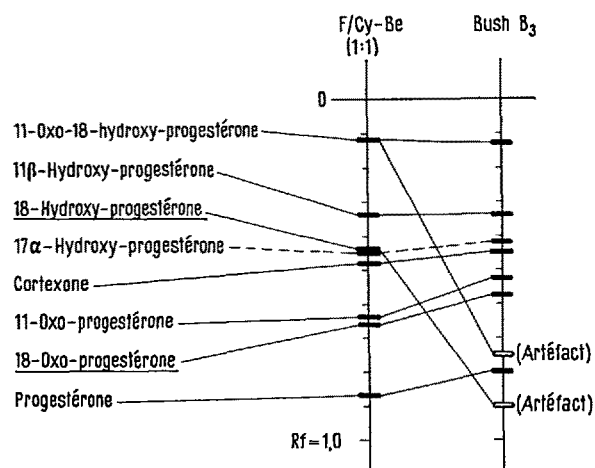


Fig. 8. Séparation par chromatographie sur papier des stéroïdes présumés de polarité faible.

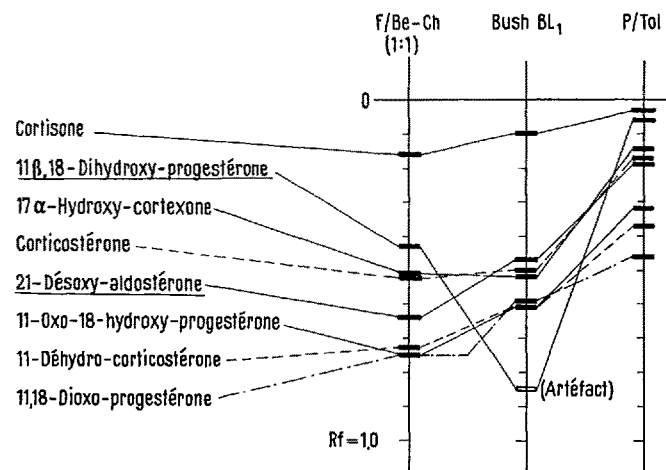


Fig. 9. Séparation par chromatographie sur papier des stéroïdes présumés de polarité moyenne.

¹⁴¹ A. WETTSTEIN et al., résultats nouveaux.

¹⁴² J. SCHMIDLIN et A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* 42, 2636 (1959).

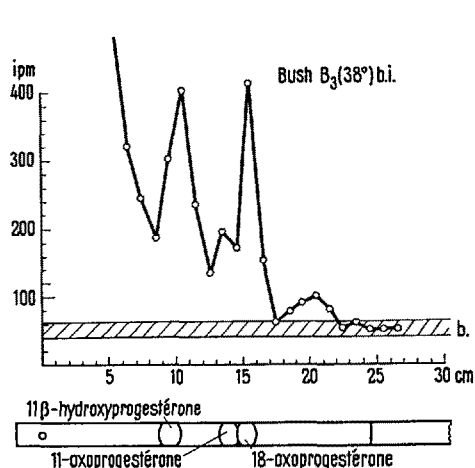


Fig. 10

respondants synthétiques, nous les avons purifiés comme précédemment, pour obtenir finalement des substances cristallisées parfaitement pures et de radioactivité constante. Sur la base de la radioactivité mesurée le rendement biochimique déterminé fut de l'ordre de 10‰ dans les essais effectués jusqu'ici. Pour cette faible valeur existent naturellement les différentes explications déjà bien connues. Nous croyons dans tous les cas avoir montré que ces deux substances représentent des produits biosynthétiques dérivés de la progestérone. Ainsi, pour la première fois, l'aldostérone mise à part naturellement, un procédé biosynthétique a donc fourni deux substances qui possèdent le groupe aldéhyde en position 18, caractéristique de l'aldostérone¹⁴¹. Qu'elles soient des produits intermédiaires de la biogénèse de l'aldostérone doit encore être démontré par leurs transformations subséquentes.

Les antagonistes de l'aldostérone du type des spiro-lactones¹⁴³ aussi bien que ceux comprenant des substances non-stéroïdes¹⁴⁴, ne sont pas traités ici puisqu'ils n'interviennent pas dans sa biogénèse. D'autre part les bloqueurs de l'hydroxylation en position 11, qui freinent aussi la biosynthèse de l'aldostérone, ont déjà été mentionnés plus tôt. On ne connaît pas encore d'inhibiteur de l'oxygénation en position 18.

Pour la régulation de la sécrétion de l'aldostérone les conceptions ont beaucoup changé ces tout derniers temps. Selon les conceptions prévalantes jusqu'ici⁹² les facteurs hémodynamiques agiraient par des récepteurs sensibles aux variations de pression et de volume, situés dans l'oreille droite¹⁴⁵, provoquant dans l'épiphysse (glande pinéale) et la partie postérieure du diencéphale le déversement d'une substance considérée comme l'agent spécifique de la régulation de la sécrétion de l'aldostérone, la glomérulostimuline¹⁴⁶. Dernièrement on a cependant constaté que l'agent stimulant ne pouvait pas se former dans le névraxe ou l'hypophyse¹⁴⁷ et notamment pas dans l'encéphale, puisqu'une saignée

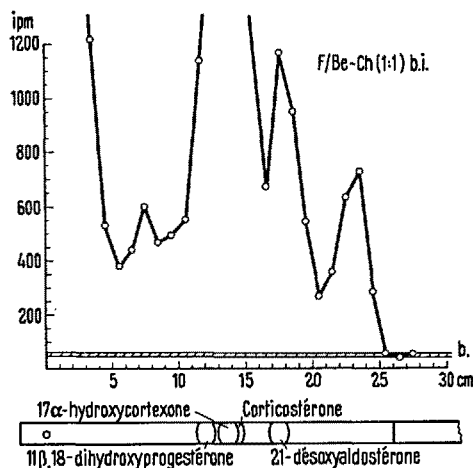


Fig. 11

provoque une augmentation de la sécrétion d'aldostérone même chez des animaux décapités¹⁴⁸. Comme d'autre part, chez l'homme, des doses d'angiotensine II¹⁴⁹ déclenchent régulièrement une forte hypersécrétion d'aldostérone^{150,151}, on en a déduit l'existence d'un facteur rénal contrôlant la sécrétion. Cette hormone stimulante semblerait être la rénine ou une substance analogue¹⁴⁸.

Summary. The different pathways of biosynthesis are described, by which steroid hormones are produced *in vivo* in the gonads, the adrenal cortex and the placenta, or *in vitro* by corresponding tissue preparations. First of all a short outline of the origin of cholesterol from acetyl coenzyme A through the 'biological isoprene unit', the pyrophosphate of Δ^3 -iso-pentenol, through squalene, lanosterol and zymosterol is given. Partial side-chain degradation of cholesterol, where ACTH plays an important role, leads to pregnenolone and further to progesterone.

The latter compounds are the starting material for the other steroid hormones. On the one hand, they are converted in the gonads and adrenals into 17 α -hydroxy derivatives, in which the side chain is completely removed by enzymes of the said and also of non-

¹⁴³ Aperçus: C. L. GANTT, N.Y. J. Med. 61, 756 (1961). - F. C. BARTTER, *Clinical Use of Aldosterone Antagonists* (Springfield 1960).

¹⁴⁴ Plusieurs publications dans Fed. Proc. 20, 409-410 (1961).

¹⁴⁵ F. C. BARTTER et D. S. GANN, *Circulation* 21, 1016 (1960).

¹⁴⁶ G. FARRELL, dans ²⁴, p. 57.

¹⁴⁷ D. A. DENTON et al., dans ASTWOOD, *Clinical Endocrinology* (Grune & Stratton, New York 1960), vol. I, p. 373.

¹⁴⁸ J. O. DAVIS et al., dans ³⁴, p. 77; *Amer. J. Physiol.* 200, 437 (1961).

¹⁴⁹ Aperçu: R. SCHWYZER et H. TURRIAN, *Vitamins and Hormones* 18, 237 (1960).

¹⁵⁰ J. GENEST et al., *Acta endocrinol.* 35, 413 (1960); dans ³⁴, p. 173; dans REUBI-BOCK-COTTIER, *Essentielle Hypertonie* (Springer, Berlin 1960), p. 143; *J. clin. Invest.* 40, 338 (1961).

¹⁵¹ J. H. LARAGH et al., *J. Amer. med. Assoc.* 174, 234 (1960); *Ann. int. Med.* 53, 259 (1960).

endocrine tissues, to form the androgens. Furthermore the adrenals produce their own typical androgens. After hydroxylation of the angular 19-methyl group, androgens are aromatised to estrogens.

On the other hand, the adrenal converts progesterone by hydroxylation in 21- and, depending on the case, also in 11- and/or 17-position into the classical adrenocortical hormones. The special feature of an 18-hydroxylation and -dehydrogenation forms part of the

biogenesis of aldosterone; a new example is given for the methods used towards its elucidation, consisting in the biosynthetic conversion of progesterone into two virtual intermediates, 18-oxo-progesterone and 21-desoxyaldosterone, which already contain the 18-aldehyde group, characteristic for aldosterone.

The regulation of the biogenesis of the different hormones is mentioned and compounds are discussed which block one or other of the biosynthetic steps.

Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Abdrücke aus hochmolekularen Polyamiden von Kristallgitterflächen als Matrizen

I. In einer Kurzmitteilung wurde vom Verfasser über die orientierte Aufwachsung (Epitaxie) des hochmolekularen Polyamids der ϵ -Aminocapronsäure (Nylon 6) auf (100) von KCl berichtet¹. Der Nachweis dieser Orientierung gelang nach einem neuentwickelten «Abdruckverfahren», das allgemein zur Feststellung von orientierten Aufwachsungen hochmolekularer Stoffe mit dem Lichtmikroskop geeignet ist, und zwar auch dann, wenn die verwachsenen Teilchen an sich unterhalb der Sichtbarkeitsgrenze des Lichtmikroskops liegen.

Nach diesem Abdruckverfahren, bei dem die Trägerfläche sozusagen als Matrice wirkt, wird der hochmolekulare Stoff als dünner Film auf die Fläche aufgebracht und vorzugsweise nach dem Ablösen des Trägers durch Aufwuchsungsversuche mit geeigneten Gastsubstanzen auf der Kontaktfläche des Filmes festgestellt, ob eine Orientierung und gegebenenfalls welcher Art eingetreten ist. Extrem dünne Filme orientieren sowohl auf der Kontaktfläche als auch auf deren Rückseite, so dass bei Anwendung derartiger Filme ein Ablösen des Filmes von der Trägerfläche zum Nachweis der Orientierung dann nicht erforderlich ist, wenn die Orientierung der Gastsubstanz auf dem Film in anderer Weise erfolgt als auf der Matrice.

Inzwischen wurden auch orientierte Abdruckfilme aus hochmolekularen Polyamiden von einer Reihe von Flächen anderer Kristallgitter erhalten, so zum Beispiel von (100) KBr, und, wie unter dem unten behandelten immunologischen Gesichtspunkt besonders bemerkenswert erscheint, von (100) des Rohrzuckers. Als Polyamide für diese Abdrücke wurden ausser dem Polyamid von ϵ -Aminocapronsäure das Polyamid aus Hexamethylen-diamin und Adipinsäure (Nylon 66) sowie Sebacinsäure (Nylon 6,10) benutzt.

Der Abdruckfilm der Figur 1 besteht aus dem erstgenannten Polyamid, die als Gastsubstanz orientiert aufgewachsenen Kristallnadeln aus Pentachlorphenol.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Aufwachsungen, über die im einzelnen an anderer Stelle berichtet werden wird², hat ergeben, dass die Orientierung der Polyamide an der Kristallfläche in Form eines Netzes von Fibrillen erfolgt (Figur 2).

Untersuchungen über die Einzelheiten des Gesetzes dieser Verwachsungen sind noch im Gange. Die von

FISCHER³ durchgeführte Aufklärung der von J. und I. WILLEMS⁴ gefundenen orientierten Aufwachsungen des Polyäthylens auf (100) von NaCl hat gezeigt, dass die Orientierung dieses Makromoleküls den gleichen geometrischen Bedingungen unterliegt, wie sie für die Epitaxie im niedermolekularen Bereich charakteristisch sind. Die bisherigen Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Aufwachsung der Polyamide stehen hiermit offensichtlich grundsätzlich in Übereinstimmung, wenn auch Einzelheiten noch der Aufklärung bedürfen. Für die Anzahl und Art der von den Polyamidfibrillen des jeweils verwachsenen Polyamids eingenommenen verschiedenen Stellungen und damit für die Form der

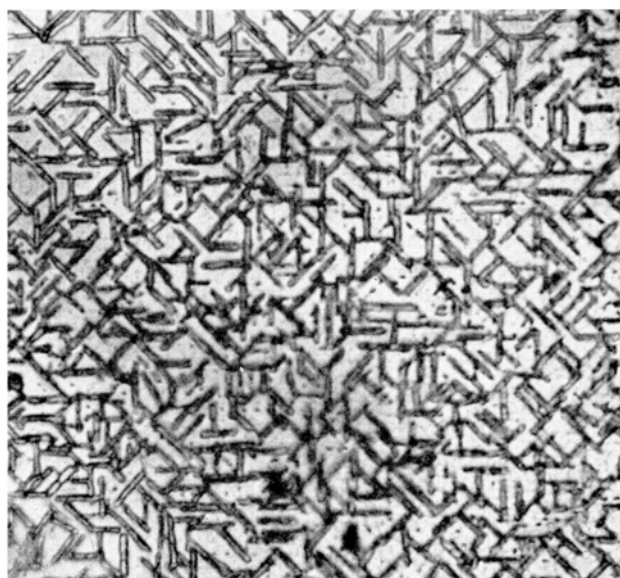


Fig. 1. Orientierte Aufwachsung von Pentachlorphenol auf einem Abdruckfilm aus Polyamid des Hexamethylen-diamins mit Adipinsäure. Abdruck von (100) KCl.

¹ J. WILLEMS, Exper. 15, 175 (1959).

² E. W. FISCHER, H. ORTH und J. WILLEMS, noch nicht veröffentlicht.

³ E. W. FISCHER, Kolloid-Z. 159, 108 (1958).

⁴ J. WILLEMS und I. WILLEMS, Exper. 13, 465 (1957). – J. WILLEMS, Faraday Soc. Discuss. 1958, Nr. 25, 111.