

## Essai d'identification des corticostéroïdes sécrétés par la surrénale embryonnaire de Veau cultivée in vitro

Le problème de l'identification des corticostéroïdes sécrétés par la surrénale embryonnaire de Mammifère a déjà fait l'objet de plusieurs travaux, tous basés sur la réaction de réduction du bleu de tétrazolium. C'est ainsi que STARK et al.<sup>1</sup> ont identifié la cortisone, l'hydrocortisone et la corticostérone dans les milieux de culture de surrénales foetales humaines et BLOCH et BENIRSCHKE<sup>2</sup>, l'hydrocortisone et la corticostérone dans les milieux d'incubation de surrénales embryonnaires de Tatou (*Dasyurus novemcinctus*). Mais HAGER<sup>3</sup> n'a pu déceler aucune des 6 hormones suivantes dans des homogénats de surrénales embryonnaires de Veau: cortisone, hydrocortisone, corticostérone, 11-désoxycorticostérone, 11-désoxy-17 $\alpha$ -hydroxycorticostérone et aldostérone. Nous avons repris ce travail avec une méthode plus sensible.

**Matériel et méthode.** Les surrénales de 2 embryons de Veau, mesurant l'un 20 cm (environ 3 mois et demi), l'autre 29 cm (environ 4 mois et demi), ont été découpées en fragments, qui ont été cultivés in vitro selon la méthode de WOLFF et HAFEN<sup>4</sup>, sur 10 milieux, en présence de 1 mC d'acétate de Na <sup>14</sup>C-1 et pendant 24 h. Les milieux sont réunis, dilués à 100 ml avec de l'eau, additionnés de 200  $\mu$ g de chacun des entraîneurs non radioactifs suivants: cortisone, hydrocortisone, corticostérone, 11-déhydrocorticostérone, 11-désoxycorticostérone, 11-désoxy-17 $\alpha$ -hydroxycorticostérone et aldostérone, liquéfiés au bain-marie bouillant, puis extraits par l'éther. L'extrait éthéré, lavé et séché, est dissous dans 50 ml de méthanol à 70%, qu'on délipse avec de l'éther de pétrole. La phase méthanolique, qui contient les corticostéroïdes, est évaporée au tiers de son volume et l'eau restante, extraite par l'éther. L'extrait ainsi obtenu est chromatographié sur couche mince de gel de silice Merck GF 254 dans le système acétone-benzène 1:2, en même temps que les 7 hormones de référence. Après développement de la plaque,

les entraîneurs et substances de référence sont repérés aux rayons UV; un lecteur de radiochromatogrammes Berthold enregistre la distribution de l'activité le long de la couche mince.

**Résultats.** Dans le système acétone-benzène 1:2, les 7 hormones se séparent, sauf la 11-déhydrocorticostérone et la 11-désoxy-17 $\alpha$ -hydroxycorticostérone, qui migrent ensemble (Figure 1). Les 6 bandes correspondant aux 7 entraîneurs se trouvaient dans une large zone de radio-

<sup>1</sup> E. STARK, A. GYÉVAI, K. SZALAY et Zs. ACS, Can. J. Physiol. Pharmac. 43, 1 (1965).

<sup>2</sup> E. BLOCH et K. BENIRSCHKE, Endocrinology 76, 43 (1965).

<sup>3</sup> G. HAGER, Zentbl. VetMed. Reihe A, 12, 115 (1965).

<sup>4</sup> Et. WOLFF et K. HAFEN, J. exp. Zool. 119, 381 (1952).

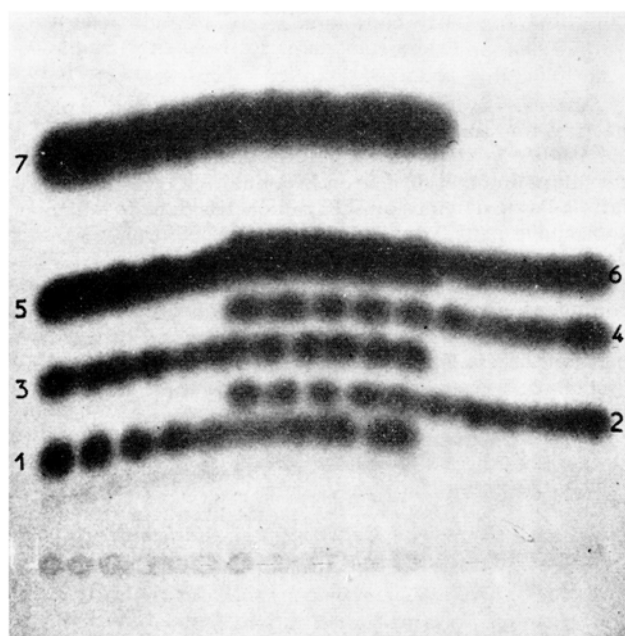


Fig. 1. Chromatographie des 7 corticostéroïdes biologiquement actifs dans le système acétone-benzène 1:2. 1, aldostérone; 2, hydrocortisone; 3, cortisone; 4, corticostérone; 5, 11-déhydrocorticostérone; 6, 11-désoxy-17 $\alpha$ -hydroxycorticostérone; 7, 11-désoxycorticostérone.

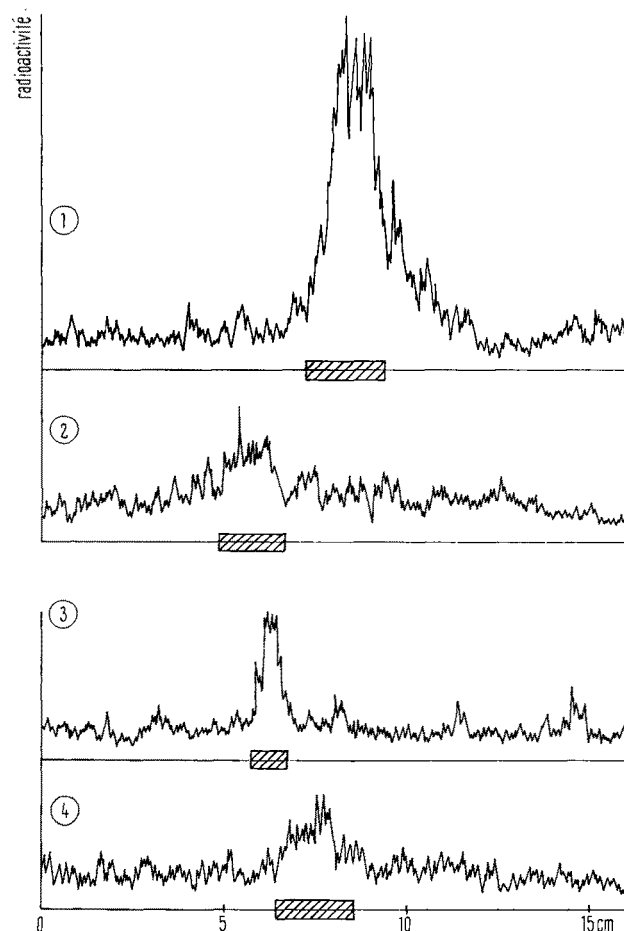


Fig. 2. Exemples d'identification de corticostéroïdes par radiochromatographie fonctionnelle. 1 et 2, cas de la désoxycorticostérone; 3 et 4, cas de la déhydrocorticostérone. Les 2 composés ont subi la série des transformations suivantes: acétylation, hydrolyse et réduction. Le 1er radiochromatogramme se rapporte à la désoxycorticostérone régénérée à partir de l'acétate, le 2è, au produit de réduction par NaBH<sub>4</sub>, le 3è, à la déhydrocorticostérone régénérée à partir de l'acétate et le 4è, au produit de réduction par NaBH<sub>4</sub>, le 4è, au produit de réduction par NaBH<sub>4</sub>, le 4è, au produit de réduction par NaBH<sub>4</sub>, le 4è, au produit de réduction par NaBH<sub>4</sub>. A chaque produit de transformation correspond un pic de radioactivité unique. Les rectangles hachurés figurent les entraîneurs.

activité. Afin de vérifier si une partie au moins de l'activité était liée à la molécule des entraîneurs, nous avons appliqué la radiochromatographie fonctionnelle (cf. MATHIS et OURISSON<sup>5</sup>). (La bande No. 5, correspondant à la fois à la 11-déhydrocorticostérone et à la 11-désoxy-17 $\alpha$ -hydroxycorticostérone, a été divisée en 2 moitiés, la 11-déhydrocorticostérone recherchée dans l'une et la 11-désoxy-17 $\alpha$ -hydroxycorticostérone, dans l'autre.) Après 3 transformations, plus aucune activité n'accompagnait les dérivés de l'aldostérone, de la cortisone et de la 11-désoxy-17 $\alpha$ -hydroxycorticostérone. Par contre, elle resta liée aux produits de transformation de l'hydrocortisone, de la corticostérone, de la 11-déhydrocorticostérone et de la 11-désoxycorticostérone. (L'hydrocortisone a été acétylée, l'acétate hydrolysé et l'hydrocortisone régénérée oxydée par NaBiO<sub>3</sub>; la corticostérone a été acétylée, l'acétate oxydé par CrO<sub>3</sub> et l'acétate de déhydrocorticostérone obtenu hydrolysé.) La Figure 2 montre les radiochromatogrammes se rapportant, le 1er à la 11-désoxycorticostérone régénérée à partir de l'acétate, le 2e au produit de réduction par NaBH<sub>4</sub>, le 4<sup>e</sup>-prégnène-3, 20, 21-triol, le 3e à la 11-déhydrocorticostérone régénérée à partir de l'acétate et le 4e au produit de réduction par NaBH<sub>4</sub>, le 4<sup>e</sup>-prégnène-11-one-3, 20, 21-triol.

**Conclusion.** Nous pouvons donc affirmer la présence d'hydrocortisone, de corticostérone, de 11-déhydrocorti-

costérone et de 11-désoxycorticostérone radioactives dans l'extrait chromatographié et conclure à la sécrétion de ces 4 hormones par la surrénale embryonnaire de Veau cultivée in vitro.

**Summary.** Pieces of foetal bovine adrenals were cultured in vitro in the presence of <sup>14</sup>C-1 sodium acetate. The following radioactive corticosteroids were sought: aldosterone, cortisone, hydrocortisone, corticosterone, 11-dehydrocorticosterone, 11-deoxycorticosterone and 11-deoxy-17 $\alpha$ -hydroxycorticosterone. Four of them have been identified by thin-layer radiochromatography and derivative formation, i.e. hydrocortisone, corticosterone, 11-dehydrocorticosterone and 11-deoxycorticosterone.

J. CHOURAQUI et J.-P. WENIGER

*Laboratoire de Zoologie et d'Embryologie expérimentale de la Faculté des Sciences, 67 Strasbourg et Centre de Recherches nucléaires, Applications biologiques, 67 Strasbourg-Cronenbourg (France), 18 octobre 1967.*

<sup>5</sup> C. MATHIS et G. OURISSON, J. Chromat. 12, 94 (1963).

## In vivo Perfusion of the Human Ovary with 4-<sup>14</sup>C-Dehydroepiandrosterone and 7 $\alpha$ -<sup>3</sup>H- Dehydroepiandrosterone <sup>35</sup>S-Sulfate. Biosynthesis of Steroid Hormones in Human Gonads, V

Only recently, the in vivo perfusion of human testes with suitable precursors revealed the direct transformation of sulfoconjugated dehydroepiandrosterone (DHEA) to sulfoconjugated androgens and estrogens<sup>1-3</sup>. On the other hand, the contribution of sulfoconjugated DHEA to the biogenesis of free androgens and estrogens remained insignificant. The present communication deals with similar investigations on the biosynthesis of C<sub>19</sub>- and C<sub>18</sub>-steroids by the human ovary.

In a 37-year-old female patient undergoing ovariectomy due to breast cancer, the left ovary was perfused via the Ramus tubarius-Vena ovarica with radiochemically pure substrate, consisting of 91.5  $\mu$ g 4-<sup>14</sup>C-DHEA with 10,130,000 cpm <sup>14</sup>C and 75.3  $\mu$ g Na-7 $\alpha$ -<sup>3</sup>H-DHEA <sup>35</sup>S-sulfate with 8,104,000 cpm <sup>3</sup>H and 536,000 cpm <sup>35</sup>S (<sup>3</sup>H/<sup>35</sup>S = r = 15.1). Ovarian vein blood was collected for 40 min, yielding 212.0 ml of heparinized plasma. After exhaustive extraction of free steroids with 3  $\times$  2 Vol chloroform the pre-extracted plasma was treated with 2  $\times$  10 Vol acetone-ethanol (1:1 v/v). For isolation of the various conjugate fractions in the filtrate column chromatography on DEAE-Sephadex A-50 and subsequent thin-layer chromatography of resulting steroid sulfatides and sulfates on silica gel G in chloroform-methanol-ammonia (15:5:0.2 v/v) proved to be efficient<sup>4</sup>. While 2/3 of the combined sulfoconjugates were subjected to solvolysis in ethyl acetate/sulfuric acid<sup>5</sup>, individual sulfoconjugates in the remaining aliquot were separated by thin-layer chromatography in chloroform-methanol-ammonia (10:10:0.2 v/v) and by paper chromatography on M & N paper 2214 FF in hexane-isopropyl ether-*t*-butanol-water-ammonia (2:5:3:9:1 v/v)<sup>6</sup>. Several of the isolated steroid sulfates were submitted to additional

purification by consecutive chromatography in the foregoing 2 systems, aliquots being solvolysed in order to establish the <sup>14</sup>C-content of the steroid moiety and to characterize the liberated compound. From the different fractions of free and liberated steroids estrogens were removed by routine procedures<sup>7</sup>, separated by repeated thin-layer chromatography<sup>8</sup> and quantitated by gas-liquid chromatography of the acetates<sup>9</sup>. Neutral steroids were resolved by repeated thin-layer chromatography in different solvent systems<sup>10</sup> and assayed by the 2,4-dinitrophenylhydrazine method<sup>10</sup> or the OERTEL-EIK-NES reaction<sup>11</sup>. Radioactive zones on chromatograms were localized in a Berthold TL Scanner Mod. 2720, while <sup>14</sup>C-, <sup>3</sup>H- and <sup>35</sup>S-activity in aliquots of all fractions were

<sup>1</sup> P. Knapstein, F. Wendlberger, P. Menzel and G. W. Oertel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 990 (1967).

<sup>2</sup> G. W. Oertel, F. Wendlberger, P. Menzel, L. Treiber and P. Knapstein, Europ. J. Steroids, in press (1968).

<sup>3</sup> P. Knapstein, F. Wendlberger, P. Menzel, L. Treiber and G. W. Oertel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1066 (1967).

<sup>4</sup> G. W. Oertel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 336, 236 (1964).

<sup>5</sup> S. Burstein and S. Lieberman, J. biol. Chem. 233, 331 (1958).

<sup>6</sup> E. E. Baulieu, C. Corpechot and R. Emiliozzi, Steroids 2, 429 (1963).

<sup>7</sup> L. L. Engel and I. T. Nathanson, J. biol. Chem. 185, 255 (1950).

<sup>8</sup> G. W. Oertel, P. Knapstein and L. Treiber, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 221 (1966).

<sup>9</sup> G. W. Oertel and L. Treiber, Europ. J. Biochem., in press (1968).

<sup>10</sup> L. Treiber and G. W. Oertel, Z. klin. Chem. Biochem. 5, 83 (1967).

<sup>11</sup> G. W. Oertel and K. B. Eik-Nes, Analyt. Chem. 31, 98 (1959).