

remains on the ear surface and in the superficial layers of the skin for several hours.

(6) When TBGF labelled with C<sup>14</sup> in the 6-benzyl group is applied topically or administered intraperitoneally together with equal amounts of TBGF bearing the H<sup>3</sup> label in the furanose moiety, essentially identical C<sup>14</sup> and H<sup>3</sup> concentrations can be found in the heart blood taken at intervals of up to 24 h post-treatment.

A detailed description of this work will be published elsewhere.

**Zusammenfassung.** Mit Hilfe von radioaktiv markierten Präparaten (6-Benzyl-C<sup>14</sup> bzw. 6-Furanose-H<sup>3</sup>) wird gezeigt, dass auf die Haut appliziertes Äthyl-3,5,6-tri-O-benzylglucofuranosid (Glyvenol®) bei der Maus gut resorbiert wird.

R. JAQUES, H. KEBERLE,  
L. RIESTERER and K. SCHMID

*Research Laboratories*

*of the Pharmaceutical Department of Ciba Limited,  
4000 Basel 7 (Switzerland), 10 June 1969*

## Effet de quelques stéroïdes sur l'incorporation de la proline-<sup>14</sup>C au niveau de l'os, chez le rat castré

La proline, acide aminé métabolisable, participe à la biosynthèse du collagène<sup>1</sup> après avoir été transformée en hydroxyproline<sup>2-4</sup> et son incorporation revêt une importance toute particulière dans le cas de l'os dont la matrice est presque totalement constituée de collagène (94% environ).

Ce phénomène a fait l'objet de nombreux travaux montrant en particulier l'effet stimulant de certaines hormones stéroïdes androgènes<sup>5,6</sup> ou cestrogènes<sup>7-10</sup>. La question peut se poser de savoir si cet effet est lié à l'action hormonale de ces stéroïdes ou s'il en est indépendant. C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'aborder ce problème en étudiant l'incorporation de proline-<sup>14</sup>C dans le fémur de rats castrés, sous l'effet d'une injection préalable soit de stéroïdes anabolisants, soit d'une association dans laquelle l'addition à l'un d'entre eux de stéroïdes modificateurs, supprime l'activité hormonale et potentialise l'activité anabolisante<sup>11</sup>.

**Protocole expérimental.** Cette expérimentation est réalisée sur des rats mâles Wistar-Sherman CF, âgés de 7 semaines, pesant 180 à 200 g et répartis en lots de 6 animaux chacun. Les rats subissent une castration puis sont maintenus à un régime normal ad libitum et pesés à intervalles réguliers.

Les stéroïdes étudiés sont: le propionate de testostérone (I), le phénylethynodiolate (II), le décanoate (III) et l'undécylate (IV) de la nor-19 androstène-4-one-3, et une association (V) contenant par millilitre de solution injectable 80 mg de produit IV, 1,3 mg de propionyl-3 nicotinoyloyl-17β cestratriène-1,3,5(10) et 80 mg d'heptyloyl-17α pregnène-4-dione-3,20.

Ces produits sont administrés par voie i.m., en solution huileuse, à des doses correspondant à 4 mg/kg de testostérone pour I et à 6 mg/kg de nor-19-androstène-4-one-3 pour II, III, IV et V. La proline-<sup>14</sup>C utilisée provient du C.E.A. (Saclay). Son activité spécifique est de 83 mCi/mM.

Le protocole adopté est le suivant: (1) *Traitements par les stéroïdes.* Les injections sont pratiquées par voie i.m. entre le 1er et le 12<sup>e</sup> jour suivant la castration, selon la durée d'action envisagée. (2) *Injection de proline-<sup>14</sup>C.* Elle est pratiquée par voie i.p. (50 µCi/kg), le 12<sup>e</sup> jour suivant la castration<sup>12</sup>. Les animaux sont alors maintenus en cages individuelles, sans nourriture, avec eau de boisson ad libitum. (3) *Prélèvements, extractions, mesures.* Les animaux sont sacrifiés par décapitation 17 h après injection de la proline-<sup>14</sup>C<sup>13</sup>. Les fémurs sont prélevés par dissection, débarrassés de tout tissu adhérent puis pesés. L'os est finement haché, décalcifié par traitement à l'EDTA durant 48 h, puis traité selon la méthode décrite par HURYCH et CHVAPIL<sup>14</sup>. L'extrait trichloracétique contient le collagène et les acides nucléiques<sup>15,16</sup>. La fraction insoluble en milieu acide est séparée par centrifugation, lavée à l'alcool puis à l'alcool-éther. La radio-activité de ces deux fractions est mesurée à l'aide d'un flow-counter

(Tracerlab). L'azote protéique est mesuré dans l'extrait trichloracétique par microdosage colorimétrique<sup>17</sup>. L'hydroxyproline est dosée selon la méthode de PROCKOP et UDENFRIEND<sup>18</sup>.

**Résultats.** Chez les rats témoins, la proportion de <sup>14</sup>C retrouvée au total dans le fémur représente environ 0,25% de la dose radio-active administrée. Exprimée par gramme de tissu frais, la radio-activité de l'extrait trichloracétique est très nettement plus élevée pour l'os que pour d'autres tissus, pourtant riches en collagène, tels la peau, le tendon de la queue ou le foie (Tableau 1). Elle représente plus de 90% de la radio-activité totale de l'os (Figure).

Tableau I. Radioactivité (cpm/g de tissu frais) mesurée après extraction trichloracétique chez des rats témoins castrés 12 jours après injection de proline-<sup>14</sup>C

Tissus	cpm/g tissu
Peau	1 394 ± 196 <sup>a</sup>
Tendon	1 373 ± 492
Foie	716 ± 48
Os	10 730 ± 320

<sup>a</sup> Voir note du Tableau III.

<sup>1</sup> G. A. M. FINERMAN, S. DOWNING et L. E. ROSENBERG, Biochim. biophys. Acta 135, 1008 (1967).

<sup>2</sup> M. R. STETTEN, J. biol. Chem. 181, 31 (1949).

<sup>3</sup> N. M. GREEN et D. A. LOWTHER, Biochem. J. 71, 55 (1959).

<sup>4</sup> B. PETERKOFSKY et S. UDENFRIEND, J. biol. Chem. 238, 3966 (1963).

<sup>5</sup> J. KOWALEWSKI et R. T. MORRISON, Can. J. Biochem. Phys. 35, 771 (1957).

<sup>6</sup> K. B. WIANCKO et K. KOWALEWSKI, Acta Endocrin. 36, 310 (1961).

<sup>7</sup> K. Y. T. KAO, W. E. HITT, A. T. BUSH et T. H. McGAVACK, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 117, 86 (1964).

<sup>8</sup> M. R. URIST, A. M. BUDY et F. C. MCLEAN, J. Bone Jt Surg. 32 A, 143 (1950).

<sup>9</sup> E. W. KELLY, Arch. Path. 74, 550 (1962).

<sup>10</sup> D. H. HENNEMAN et N. J. RARITAN, Endocrinology 83, 678 (1968).

<sup>11</sup> E. C. SAVINI, Thérapie 21, 753 (1966).

<sup>12</sup> Délai au bout duquel les taux d'incorporation donnent, chez les animaux témoins, les valeurs les plus homogènes.

<sup>13</sup> Ce temps, choisi en fonction d'essais préliminaires, correspond à un délai suffisant pour que la fixation de l'acide aminé au niveau de l'os soit indépendante de toute variation de concentration sanguine et donne chez les animaux témoins les valeurs les plus homogènes.

<sup>14</sup> J. HURYCH et M. CHVAPIL, Biochim. biophys. Acta 65, 170 (1962).

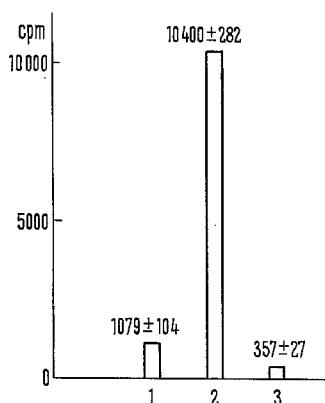
<sup>15</sup> S. M. FITCH, M. L. R. HARKNESS et R. D. HARKNESS, Nature 176, 163 (1955).

<sup>16</sup> J. MCLENNAN et M. KARASEK, Biochim. biophys. Acta 117, 184 (1966).

<sup>17</sup> R. LECOQ, *Manuel d'analyses médicales et de biologie clinique* (Editions Doin, Paris 1967), Tome I, p. 303.

<sup>18</sup> D. J. PROCKOP et S. UDENFRIEND, Analyt. Biochem. 1, 228 (1960).

Dans le Tableau II sont rassemblées les valeurs trouvées sur les différents extraits obtenus à partir de fémurs provenant de rats témoins ou traités par les différents stéroïdes étudiés. Nous constatons que sur les 5 produits



Distribution de la radioactivité dans les différentes fractions du collagène extraits de l'os chez le rat témoin. 1) Solution de chlorure de sodium 0,2M: protéines solubles; 2) solution acide trichloroacétique à 5%: collagène acido-soluble; 3) résidu insoluble.

Tableau II. Variation de la radioactivité de la fraction acido-soluble de l'os en fonction du traitement

Delai (jours)	Radioactivité (moyenne) en coups/min par g de tissu frais				
	I	II	III	IV	V
2	11 460 ± 154 <sup>a</sup>	10 773 ± 475	9 800 ± 826	10 560 ± 192	10 540 ± 680
4	10 900 ± 1090	10 467 ± 1003	11 067 ± 688	13 370 ± 1070	15 520 ± 1060
5	10 920 ± 2980	10 985 ± 613	11 494 ± 359	11 840 ± 665	13 600 ± 1073
8	10 650 ± 985	11 328 ± 433	11 950 ± 981	11 420 ± 502	12 800 ± 810
Témoins			10 400 ± 282		

<sup>a</sup> Voir note du Tableau III.

étudiés, seuls l'undécylate de nor-19 androsténolone (IV) et l'association de stéroïdes (V) provoquent une augmentation significative ( $0,01 < p < 0,05$ ) du taux de  $^{14}\text{C}$  incorporé (au 4<sup>e</sup> jour: 28% pour IV, 43% pour V).

Les résultats rassemblés dans le Tableau III montrent que l'activité spécifique exprimée en cpm par mg d'azote protéique est du même ordre que celle des témoins pour le produit IV alors qu'elle est nettement plus élevée dans le cas du produit V. Les résultats sont identiques lorsque l'activité spécifique est exprimée par rapport au taux d'hydroxyproline.

*Discussion et conclusion.* La presque totalité de la radio-activité présente dans le fémur de rat, 17 h après injection de proline- $^{14}\text{C}$ , se retrouve dans l'extrait trichloracétique. Dans le cas particulier de l'os, et compte tenu des lavages successifs (EDTA puis solution saline) qu'il subit, la seule protéine acido-soluble présente dans cet extrait est le collagène.

Des essais préliminaires nous avaient permis de constater que chez le rat témoin castré, le taux de proline- $^{14}\text{C}$  incorporée ne varie pratiquement pas entre la 10<sup>e</sup> et la 24<sup>e</sup> h suivant son injection. Les résultats obtenus montrent que pour un temps intermédiaire (17 h), le taux de proline incorporée peut être augmenté sous l'effet de certains stéroïdes étudiés.

L'undécylate de nor-19 androsténolone (IV) augmente, 4 jours après l'injection, le taux de radio-activité de la fraction acido-soluble mais cette augmentation n'est pas accompagnée d'une variation de l'activité spécifique rap-

portée à l'azote protéique du milieu. Elle est en effet concomitante d'une augmentation de l'azote protéique. L'action du produit V diffère de la précédente à deux titres: d'une part, quantitativement puisque l'augmentation du taux de radio-activité, par rapport aux témoins, est presque double de celle obtenue avec IV, d'autre part, qualitativement parce que l'activité spécifique du collagène acido-soluble se trouve augmentée.

Ces résultats montrent que les deux produits (IV et V) stimulent la biosynthèse du collagène chez le rat castré. Dans le cas de IV, cette stimulation se traduit par une augmentation modérée de l'azote protéique acido-soluble et de la quantité de proline- $^{14}\text{C}$  incorporée. Dans le cas du produit V, où IV est associé à d'autres stéroïdes, cette stimulation est plus importante et semble plutôt concerner le renouvellement du collagène osseux puisque l'activité spécifique augmente sans qu'il y ait nécessairement variation de l'azote protéique. Dans l'un et l'autre cas, l'effet constaté se manifeste au 4<sup>e</sup> jour suivant l'injection, ce délai étant en rapport avec l'effet retard de IV.

Ces résultats confirment donc ceux obtenus au cours de l'étude pharmacologique<sup>11</sup>, selon lesquels l'adjonction à l'undécylate de nor-19 androsténolone de stéroïdes annulant l'effet hormonal, entraîne une accentuation de son action sur la biosynthèse protéique.

Tableau III. Détermination de l'activité spécifique (cpm/mg azote protéique) de la fraction acido-soluble de l'os

Lots	Azote total (mg/g tissu frais)	cpm de l'extrait (g tissu frais)	Activité spécifique cpm/mg azote protéique
Témoins	13,1 ± 2,4	10 410 ± 2170 <sup>a</sup>	727 ± 79,6
Produit IV	17,5 ± 1,2	13 520 ± 1170	768 ± 58,5
Produit V	14,2 ± 2,4	15 760 ± 1610	1113 ± 116

Comparaison 4 jours après l'injection des produits IV et V.

$$^a \text{ Ecart à la moyenne } \sqrt{\frac{(M - x^2)}{n(n-1)}}.$$

*Summary.* The comparative study of some steroids in castrated rats has shown 19-norandrostenedione undecylate to stimulate the incorporation of proline- $^{14}\text{C}$  in bone and the association of this substance with other steroids reducing its hormonal action to produce an increase in its effect on bone collagen formation.

A. UZAN et C. DUCAMP-CHARPENTIER

Recherche et Pharmacie S.A.R.L.,  
Service de Biochimie Analytique et Pharmacologique,  
F-92-Gennevilliers (France), 8 avril 1969.