

ASPECT QUANTITATIF DE LA SYNTHESE DES CORTICOSTEROÏDES PAR LA SURRENALE EMBRYONNAIRE DE LAPIN CULTIVEE *IN VITRO*

J. CHOURAQUI et J.-P. WENIGER

Laboratoire de Zoologie et d'Embryologie expérimentale de l'Université Louis Pasteur, 12 rue de l'Université, 67000 Strasbourg; Groupe de Laboratoires du C.N.R.S., rue du Loess, 67200 Strasbourg, France

(Received 13 March 1973)

SUMMARY

Adrenals from 22-day-old rabbit foetuses were cultivated *in vitro* in the presence of [¹⁴C]-sodium acetate, which was converted to [¹⁴C]-labelled corticosteroids. These were purified by thin layer chromatography, derivative formation and recrystallization to constant specific activity. The addition of tritiated hormones at the beginning of the analysis allowed the determination of a recovery percentage for each hormone. By relating the constant specific activity value for the [¹⁴C]-label to the recovery percentage, levels of hormone synthesis could be determined. The formation of cortisol and aldosterone was the highest; corticosterone, cortisone and 11-dehydrocorticosterone were synthesized in lesser amounts.

INTRODUCTION

LE PROBLÈME de l'abondance relative des différents corticostéroïdes sécrétés par la surrénales embryonnaire de Mammifère a déjà fait l'objet de maints travaux. Dans toutes les espèces étudiées, qu'il s'agisse de l'Homme[1], du Mouton[2, 3], du Chien[4] ou du Macaque[5], la sécrétion de cortisol est apparue la plus importante.

Dans des travaux antérieurs, nous avions montré que la surrénales embryonnaire de Lapin synthétisait de la cortisone, du cortisol, de la corticostéron, de la 11-déhydrocorticostéron et de l'aldostéron à partir d'acétate de sodium [¹⁴C][6, 7]. Le présent travail aborde le côté quantitatif de cette synthèse. Nous avons choisi le stade de 22 jours comme étant intermédiaire entre les stades de 20 et 26 jours ayant servi pour l'analyse qualitative.

MATERIEL ET METHODES

Le principe de la méthode est le suivant. Les surrénales sont cultivées *in vitro* en présence d'acétate de Na [¹⁴C], qu'elles transforment en corticostéroïdes. Ceux-ci sont purifiés par chromatographie et recristallisés à activité spécifique constante. L'addition d'hormones tritiées au début de l'analyse permettra de déterminer par comparaison les pourcentages de récupération des hormones marquées au ¹⁴C. L'activité spécifique corrigée par le pourcentage de récupération et ramenée à une même quantité d'entraîneur mesurera le taux de synthèse des hormones.

En pratique, les surrénales de 67 embryons de Lapin Bleu de Vienne âgés de 22 jours et 7±2 h ont été explantées sur le milieu de Wolff et Haffen[8]. On dépose une gouttelette de 0,02 ml (0,04 mCi) d'une solution d'acétate de Na [¹⁴C] (C. E. A., Gif-sur-Yvette; A.S. 91 mCi/mmol) dans du liquide de Tyrode à la surface de

chacun des 13 milieux utilisés et on les met à incuber pendant 24 h à 37,5°C. Ils sont conservés à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.

Les hormones recherchées sont la cortisone, le cortisol, la corticostérone, la 11-déhydrocorticostérone et l'aldostérone. On ajoute ces mêmes hormones tritiées aux milieux avant l'homogénéisation et l'extraction. Les quatre premières provenaient de l'I.R.E. (Mol) et l'aldostérone du Radiochemical Centre (Amersham). Leur pureté radiochimique, égale ou supérieure à 96%, a été contrôlée par chromatographie sur couche mince dans différents systèmes de solvants. L'extraction se fait par le mélange éther-dichlorométhane 2:1 (v/v). L'extrait lavé et séché est délipidé à froid par du méthanol à 70%, puis rechromatographié sur couche mince de gel de silice Merck GF 254 dans le système chloroforme-méthanol-eau, 188:12:1 (v/v)[9], pour séparer les 5 corticostéroïdes. Ceux-ci sont rechromatographiés deux ou trois fois sous forme de dérivés[10]. Après prélèvement de 1/25e du dernier éluat en vue de la détermination du pourcentage de récupération, on ajoute au reste 15 ou 20 mg d'entraîneur non radioactif (Tableau 1). On prélève aussi un échantillon de cristaux O, de composition radiochimique identique à celle de l'éluat. Si l'activité spécifique des cristaux O due au ^3H est supérieure à celle des cristaux 1 ou 2, cela voudra dire que l'hormone tritiée s'est altérée au cours des manipulations et il faudra corriger le pourcentage de récupération par le rapport

$$\frac{\text{A.S. } [^3\text{H}] \text{ constante}}{\text{A.S. } [^3\text{H}] \text{ Cr.O}}$$

La radioactivité due au ^3H et au ^{14}C est mesurée à l'aide d'un spectromètre à scintillation en milieu liquide Mark I (Nuclear-Chicago Corp.).

RESULTATS

Résultats qualitatifs

La synthèse de cortisol, de corticostérone, de 11-déhydrocorticostérone et d'aldostérone est démontrée par la constance de l'activité spécifique due au ^{14}C au cours des recristallisations successives (Tableau 1). En ce qui concerne la cortisone, l'activité spécifique des cristaux 3, 4 et 5 n'est constante qu'à 7,4% près. Mais si la baisse de l'activité spécifique est de 24,1% au cours des trois premières recristallisations, elle n'est plus que de 1,4% au cours des deux dernières. Par ailleurs, le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$, qui est un autre indice de la pureté radiochimique des cristaux, est constant dès la troisième recristallisation (11,5, 12,4 et 11,3). Il est donc permis de considérer l'identité de la cortisone comme établie et d'estimer à 360 d.p.m./mg la valeur constante de l'activité spécifique.

Résultats quantitatifs

Le Tableau 2, qui donne l'activité spécifique due au ^3H , montre que seule l'aldostérone s'est altérée au cours des manipulations. Son pourcentage de récupération devra donc être corrigé par le rapport $\frac{1160}{2200}$. Une contre-épreuve a consisté à chromatographier un échantillon d'aldostérone tritiée pure et à le recristalliser: l'activité spécifique accuse effectivement une baisse entre les cristaux 0 et 1.

Tableau 1. Recristallisations des corticostéroïdes. Activité spécifique due au ¹⁴C exprimée en en d.p.m./mg

	Cortisone	Cortisol	Corticostéron	11-Déhydrocorticostéron	Aldostérone
E.M. 1	3850	582	822	258	3300
Cr. 1	535	374	520	210	502
E.M. 2	1760	650	600	—	1550
Cr. 2	434	360	505	210	416
E.M. 3	820	442	545	209	2150
Cr. 3	406	359	489	213	405
E.M. 4	560	356	497	206	705
Cr. 4	366	364	516	209	363
E.M. 5	400	359	—	183	400
Cr. 5	361	355	515	214	390
E.M. 6				216	395
Cr. 6					
Moyenne	360 (estimée)	360	506	212	381
% de cons-					
tance	1,4	1,3	3,4	1,9	4,7
Moyenne				159	286
corrigée					

La cortisone et le cortisol ont été recristallisées sous forme d'androstènitrone et la corticostéron sous forme de 11-déhydrocorticostéron. Les recristallisations ont été faites dans les systèmes chloroforme-méthanol-éther de pétrole, dichlorométhane-méthanol-éther de pétrole ou acétone-chloroforme-éther de pétrole. Les valeurs constantes sont encadrées. Rappelons qu'à la suite d'Axelrod *et al.* (11) on considère que la constance est obtenue quand les trois dernières valeurs de l'activité spécifique des cristaux ne diffèrent pas de plus de 5% de la valeur moyenne. Cr.: cristaux; E.M.: eaux-mères.

La 11-déhydrocorticostéron et l'aldostérone ayant été recristallisées avec 15 mg d'entraîneur, alors que 20 mg avaient été utilisés pour la cortisone, l'hydrocortisone et la corticostéron, il faut corriger l'activité spécifique moyenne des deux premières par le rapport 3/4. La dernière ligne du tableau donne cette activité spécifique moyenne corrigée.

Tableau 2. Activité spécifique due au ³H (c.p.m./mg)

	Cortisone	Cortisol	Corticostéron	11-Déhydrocorticostéron	Aldostérone
Cr. 0	4700	915	13400	9700	2200
E.M. 1					8500
Cr. 1	4600	885	13500	9600	1470
E.M. 2					4300
Cr. 2	4600	900	13550	9500	1250
E.M. 3					5870
Cr. 3					1200
E.M. 4					1840
Cr. 4					1020
E.M. 5					1150
Cr. 5					1150
E.M. 6					1180
Cr. 6					1170

Cr: cristaux; E.M.: eaux-mères. Les valeurs constantes sont encadrées. On voit que seuls les cristaux O de l'aldostérone contenaient de l'activité contaminante. La valeur constante de l'activité spécifique est de 1160 c.p.m./mg.

Tableau 3. Pourcentages de récupération et taux de synthèse des corticostéroïdes

	Cortisone	Cortisol	Corticostérone	11-Déhydrocorticostérone	Aldostérone
Pourcentage de récupération	34,0	15,3	37,2	20,04	12,5
Activité spécifique finale (d.p.m./mg)	1060	2350	1370	775	2290
Taux de synthèse relatifs	0,45	1	0,58	0,33	0,98

L'activité spécifique finale est obtenue en corrigéant l'activité spécifique moyenne du Tableau 1 par le pourcentage de récupération.

Le Tableau 3 donne les pourcentages de récupération des hormones, ainsi que leur taux de synthèse. Le taux de synthèse est mesuré par l'activité spécifique due au ^{14}C pour un pourcentage de récupération de 100%. Il ressort de ce tableau que le cortisol et l'aldostérone, dont les taux de synthèse sont voisins, sont les deux hormones les plus abondantes. Suivent dans l'ordre la corticostérone, la cortisone et la 11-déhydrocorticostérone.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Chez un embryon d'aussi petite taille que celui de Lapin, le dosage *in utero* des corticostéroïdes dans le sang veineux surrénalien paraît difficilement réalisable et nous avons abordé le problème en déterminant des taux de synthèse *in vitro*. Mais en réalisant la culture organotypique des surrénales plutôt que l'incubation de coupes de tissu ou d'un homogénat et en choisissant un précurseur aussi universellement répandu que l'acétate de Na, nous avons tenté de nous rapprocher le plus possible des conditions existant chez l'embryon. Mais il serait hasardeux d'aller plus loin et d'affirmer que nos résultats reflètent fidèlement les rapports quantitatifs existant *in vivo* entre les différentes hormones. Il y a lieu aussi de se demander dans quelle mesure les synthèses hormonales à partir d'acétate de Na exogène recouvrent exactement celles qui se font à partir des précurseurs endogènes.

Chez le Lapin adulte, les dosages effectués par Vinson *et al.*[12] dans le sang veineux surrénalien montrent que la corticostérone est l'hormone prédominante ($155 \pm 11 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$), suivie par le cortisol (21 ± 4), la désoxycorticostérone (18 ± 3) et l'aldostérone (3 ± 1). *In vitro*, à partir des précurseurs endogènes, la synthèse de cortisol est légèrement accrue par rapport à celle de corticostérone. Chez l'embryon, dans les conditions de nos expériences, l'hormone prédominante est le cortisol, conjointement avec l'aldostérone. Ce qui frappe dans ces résultats, c'est que non seulement la corticostérone est supplantée par le cortisol mais encore par l'aldostérone. Chez l'embryon de Mouton, la seule espèce, en dehors du Lapin, où l'on dispose de données quantitatives concernant l'aldostérone, celle-ci ne représente qu'approximativement le 1/50e du cortisol dans le sang veineux surrénalien[3]. D'autres espèces devront être étudiées à cet égard.

BIBLIOGRAPHIE

1. Stark E., Gyévai A., Szalay K. et Ács Zs.: *Can. J. Physiol. Pharmac.* **43** (1965) 1.
2. Chester Jones I., Jarrett I. G., Vinson G. P. et Potter K.: *Endocrinology* **29** (1964) 211.
3. Alexander D. P., Britton H. G., James V. H. T., Nixon D. A., Parker R. A., Wintour E. M. et Wright R. D.: *Endocrinology* **40** (1968) 1.

4. Jackson B. T. et Piasecki G. J.: *Endocrinology* **85** (1969) 875.
5. Kittinger G. W. et Beamer N. B.: *Endocrinology* **89** (1971) 86.
6. Chouraqui J. et Weniger J.-P.: *C.R. Acad. Sci.* **269**, Série D (1969) 1993.
7. Chouraqui J. et Weniger J.-P.: *C.R. Acad. Sci.* **275**, Série D (1972) 999.
8. Wolff Et. et Haffen K.: *J. exp. Zool.* **119** (1952) 381.
9. Bennett R. D. et Heftmann E.: *J. Chromatog.* **9** (1962) 348.
10. Chouraqui J. et Weniger J.-P.: *Acta endocr., (Copenh.)* **65** (1970) 650.
11. Axelrod L. R., Matthijsen C., Goldzieher J. W. et Pulliam J. E.: *Acta endocr., (Copenh.) Suppl.* **99** (1965).
12. Vinson G. P., Whitehouse J. B., Allison D. J. et Powis D. A.: *J. steroid Biochem.* **2** (1971) 299.