

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES STÉROÏDES TISSULAIRES CHEZ *SCYLLIORHINUS CANICULUS* (LINNÉ)

par Jean-Marie GASTAUD

PRELIMINAIRES.

Ce travail aura pour objet la caractérisation des stéroïdes du tissu musculaire de *Scylliorhinus caniculus* (LINNÉ).

Au cours de ces dernières années, de nombreuses recherches ont été consacrées à la biologie et à la chimie des stéroïdes chez les animaux marins (Plancton, Crustacés, Poissons) ainsi que sur les produits intermédiaires qui se forment ou qui interviennent lors du métabolisme des stérols.

FIESER signale qu'en 1898 HAMMARSTEN isole de la bile de *Scymnus borealis* un acide biliaire particulier qui est un ester sulfurique de certains stérols : « le Scymnol ». Ce produit se rencontre également chez certains Elasmobranches et semble être le constituant majeur de la bile chez ces espèces, ce qui permet à WINDAUS, BERGMANN et KÖNIG (1930) de croire qu'il s'agit d'un cas curieux du métabolisme des stérols formant un chaînon entre le cholestérol et les acides biliaires, HASHWOOD (1960) arrive à une conclusion identique. FAGERLUND et IDLER (1960) remarquent que *Saxidomus giganteus* réalise après injection du cholestérol marqué l'insaturation de sa chaîne latérale au niveau des carbones 22 et 25.

Dans l'insaponifiable des Copépodes planctoniques, nous avons signalé en 1961 la présence de stéroïdes dont la composition chimique semblait correspondre à celle des hormones des Vertébrés.

La présence de stéroïdes au niveau de certains organes ou dans le sang des Poissons a été démontrée dans de nombreuses publications. C'est ainsi qu'en 1934 VARS, TAYLOR et PFIFFNER extraient une hormone active à partir de l'interrénal de *Galeus vulgaris* LINNÉ. FONTAINE et HATEY (1954) montrent la présence de 17-hydroxycorticostéroïdes dans le sang de *Salmo salar* L. Dans le sang également, CHESTER, PHILLIPS et HOLMES (1958) isolent de la corticostérone chez la Raie et de l'hydrocortisone chez *Scylliorhinus* ; tandis que dans le plasma du saumon (*Oncorhynchus nerka*), PHILLIPS, HOLMES et BONDY (1959) identifient un adrénocorticostéroïde. Au niveau du lobe antérieur de l'hypophyse de baleine, PAPHOFF et CHOH HAO LI caractérisent une hormone ayant une activité sur la croissance. Le tissu interrénal de *Fundulus heteroclitus* L. possède un système enzymatique capable de convertir *in vitro* la progestérone marquée en cortisol, cortisone et aldostérone ; néanmoins, le mécanisme de cette biosynthèse d'après PHILLIPS et MULROW (1959) reste encore inconnu. En observant les variations du taux de corticostéroïdes sanguins chez certains Elasmobranches, PHILLIPS (1959) note la prédominance de cortisol et une faible teneur en corticostérone ; ces deux substances ayant été préalablement identifiées chez les Téléostéens. L'auteur isole par ailleurs, mais ne peut les identifier au point de vue chimique, quatre autres stéroïdes porteurs d'une chaîne latérale réductrice, d'un groupement 3 cétone et d'une double liaison Δ^4 . Le taux de cortisone, cortisol et hydroxy-17-progestérone plasmatique des saumons mâles à l'époque du frai est plus faible que celui des femelles chez lesquelles il augmente considérablement après la ponte (IDLER, RONALD et SCHMIDT, 1959). Ces auteurs isolent en 1960, dans le plasma de saumons mâles après le frai, une 11-cétotestos-

térone dont la concentration est de l'ordre de 12 µg pour 100 ml. Comparant son activité sur la croissance de la crête des poulets, IDLER, SCHMIDT et BIELY (1961) constatent que sa potentialité est 58 p. 100 plus élevée que celle du propionate de testostérone. Par ailleurs, ce stéroïde a été considéré par d'autres observateurs comme étant de la cortisone. Par des méthodes biologiques, WOODHEAD (1960) montre que l'hypophyse de *Gadus morrhua* L. (= *Gadus callarias* L.), immature ou non, sécrète une hormone adrénocorticotrope dont l'activité serait de 3,5 µ/ACTH par mg. Chez d'autres Téléostéens, NANDI et BERN (1960) signalent la présence d'une substance adrénocorticotrope au niveau de l'interrénal. RACE et HSIAO MAY WU, en 1961, observent trois zones dans la surrénale de baleine. Les capsules externe et moyenne contiennent une faible proportion d'aldostérone ; les 17-hydroxycorticostéroïdes, bien que répartis sur l'ensemble du cortex, ont une concentration légèrement plus élevée au niveau de l'enveloppe moyenne ; il en est de même des 17-cétostéroïdes dont le taux est sensiblement plus élevé dans la zone corticale interne. EULER et FÄNGE (1961) remarquent un excès de noradrénaline au niveau de plusieurs organes chez *Squalus acanthias* L. et d'adrénaline chez *Gadus callarias* L.

L'existence d'hormones œstrogènes est également connue. En 1958 et 1960 WOTIZ et coll. démontrent la présence d'œstrone, de progestérone et d'œstradiol-17-β dans les ovaires de *Squalus suckleyi* ; en 1960, LISK identifie ce produit dans les œufs d'*Homarus americanus*. Des ovaires d'un Dipneuste (*Protopterus annecteus* OWEN), DEAN et JONES extraient de l'œstriol, de l'œstrone, et une faible quantité d'œstradiol-17-β et de progestérone dont ils étudient ensuite l'activité biologique sans toutefois pouvoir les identifier par des méthodes chimiques. GALLIEN et CHALUMEAU (1960) trouvent 4 µg d'œstrogènes pour 100 ml de sang chez les femelles adultes de *Xenopus laevis* DAUDIN. CEDARD et NOMURA (1961) constatent que la teneur en œstrogènes du sang d'*Anguilla anguilla* L., *Conger conger* L. et *Murena helena* L. est habituellement plus faible chez les mâles que chez les femelles, sauf, comme l'indiquent les auteurs, chez les congres de la Méditerranée. Chez *Salmo salar* L. en eau douce, CEDARD, FONTAINE et NOMURA remarquent des fluctuations importantes dans la teneur en œstrogènes du sang pendant le cycle d'activité génitale.

Cette revue des travaux antérieurs démontre la présence d'hormones au niveau de quelques organes mais plus particulièrement dans le sang des animaux marins. Néanmoins, aucune référence n'a été trouvée concernant l'identification ou le dosage de ces produits dans le tissu musculaire des Elasmobranches. Il a donc paru intéressant de rechercher au niveau de celui-ci l'existence éventuelle de stéroïdes comme VAGUE et GARRIGUE (1957) l'avaient signalé dans le tissu adipeux humain.

Toutefois, l'application au tissu musculaire des méthodes généralement utilisées en clinique pour les dosages hormonaux ne doit pas être interprétée comme une identification des stéroïdes, ni comme une assimilation avec ceux que l'on dose dans l'urine ou dans le sang. Ces résultats ne sont qu'une orientation dans un but chimique et exigent dans la suite des analyses plus poussées actuellement en cours.

Matériel et techniques.

Le matériel étudié a été récolté au cours de la campagne du navire océanographique « Président-Théodore-Tissier » au nord de l'Irlande et dans le secteur des îles Hébrides, pendant les mois d'août et de septembre 1959.

Après avoir enlevé la peau et les viscères, le tissu musculaire est essoré entre des feuilles de papier filtre ; les traces de sang éliminées, on découpe ce tissu en lamelles qui sont ensuite grossièrement broyées dans un mixer préalablement refroidi.

Cette bouillie est conservée dans de l'éthanol à 95° exempt de substances réductrices, placée ensuite au frigidaire à 0°C pendant deux ou trois mois.

Extraction des lipides.

500 g de broyat filtré sont répartis dans des sachets de gaze puis mis en contact avec un litre d'alcool éthylique absolu. On porte à douce ébullition pendant 24 heures sous réfrigérant à reflux.

Cette opération est suivie d'une seconde extraction de même durée par un volume égal d'oxyde d'éthyle.

L'alcool dans lequel les tissus furent conservés est distillé sous vide ; la phase hydro-alcoolique extraite ensuite trois fois par le mélange chloroforme - éther de pétrole (3 : 1 V/V). Les solvants sont séchés sur chlorure de calcium ou sulfate de soude anhydres et évaporés sous vide dans un évaporateur rotatif Eral à basse température ; le vide est maintenu jusqu'à refroidissement des liquides afin d'éviter les oxydations. Les dernières traces de solvant sont chassées par un jet de gaz inerte et le résidu sec amené à poids constant.

Du résidu total d'extraction, on élimine les substances non lipidiques (glucides et protides) par la méthode de M. FAURE. Le résidu est repris par trois volumes d'éther et un volume d'eau distillée. Le mélange est transvasé dans une ampoule à décantation. Après agitation, on ajoute trois volumes d'acétone et un volume d'une solution aqueuse de chlorure de sodium à 18 p. 100. La phase éthéro-acétonique et le précipité interfacial sont lavés par le mélange acétone-éther, puis, après déshydratation et évaporation, le résidu est repris par du chloroforme pour éliminer le chlorure de sodium. Ce résidu sec constitue les lipides totaux. Le pourcentage de ceux-ci dans les tissus analysés varie entre 10,4 et 12 p. 100.

Saponification et extraction de l'insaponifiable.

Le résidu lipidique repris par 20 à 25 ml d'éthanol absolu est saponifié par la potasse en pastilles (400 mg par gramme de matière grasse), dissoute dans le minimum d'eau distillée. Le mélange est traité sous atmosphère d'azote pendant 1 h 30 mn à chaud et pendant le même temps à froid.

Le contenu du ballon est transvasé dans une ampoule à décantation ; par addition d'un volume déterminé d'eau bidistillée on amène l'alcool au titre de 55 à 60°, ce qui évite les émulsions. On ajoute ensuite deux volumes d'éther de pétrole fraîchement distillé (p. e \geq 50°), après agitation on sépare la couche aqueuse ; l'éther est décanté puis l'opération est recommencée deux fois avec de l'éther de pétrole et trois fois avec de l'oxyde d'éthyle exempt de peroxydes. La phase aqueuse est ensuite franchement acidifiée par l'acide chlorhydrique concentré et conservée une nuit au frigidaire à 0°. Les acides gras ainsi libérés forment une pellicule à la surface du liquide et sont séparés par filtration sur Buchner. La phase aqueuse est extraite deux fois par l'éther sulfurique. Les phases éthérées réunies sont lavées à l'eau distillée. L'éther est séché sur sulfate de soude puis évaporé sous vide. Cette fraction constitue l'insaponifiable dont le pourcentage par rapport aux lipides est compris entre 2,01 et 2,18 p. 100.

Fractionnement de l'insaponifiable.

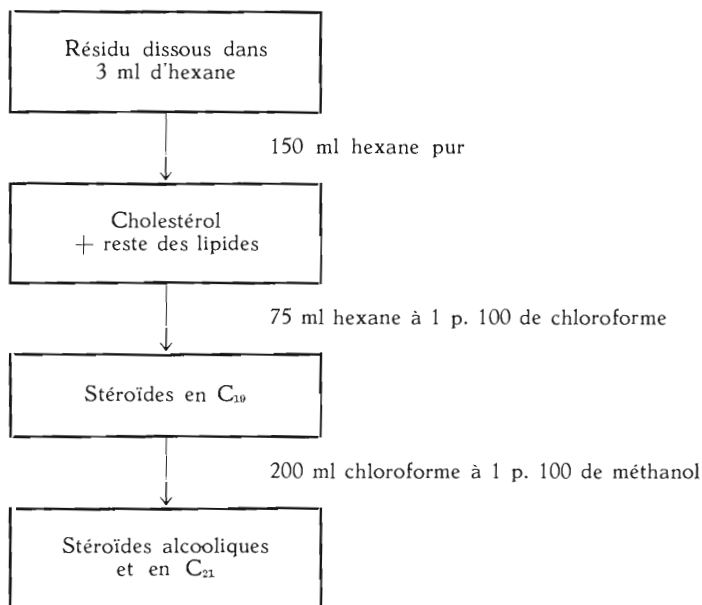
Le résidu, dissous dans 100 ml d'éther de pétrole est introduit dans une allonge cylindrique fermée à l'une de ses extrémités par un robinet et à l'autre par un bouchon rodé. On ajoute un demi-volume d'une solution aqueuse de bicarbonate de soude à 9 p. 100. L'allonge est placée sur un extracteur rotatif à vitesse constante pendant trente minutes. La solution aqueuse est décantée puis remplacée par un égal volume de solution normale d'hydroxyde de sodium. Cette opération est recommencée une seconde fois. La fraction alcaline contient les phénolstéroïdes. Les phases éthérées sont lavées à l'eau distillée jusqu'à neutralité, séchées et évaporées sous vide. Le résidu renferme le cholestérol, et les stéroïdes neutres.

Séparation des stéroïdes par chromatographie sur colonne.

Dans une colonne à chromatographie de 15 mm de diamètre intérieur et de 500 mm de hauteur, munie à sa base d'une plaque filtrante de porosité 3 et terminée par un robinet, on place 15 g de Florisil 60/100 mesh, puis une couche de sable de un centimètre de hauteur, enfin un tampon de laine de verre. La colonne est lavée avec 100 ml d'hexane pur. Le résidu précédent repris par quelques millilitres du même solvant est placé au sommet de la colonne. Après fixation sur l'absorbant, on fait d'abord passer 150 ml d'hexane pur, puis 75 ml d'hexane contenant 1 p. 100 de chloroforme, enfin 200 ml de chloroforme à 1 p. 100 de méthanol. Chaque fraction est recueillie séparément et

éaporée sous vide. Tous les solvants utilisés pour cette opération sont préalablement purifiés suivant les méthodes classiques, déshydratés et distillés sur colonne à fractionnements. Leur critère de pureté est vérifié par détermination des points d'ébullition sous pression normale et par spectrophotométrie dans l'ultra-violet.

Résumé de la technique chromatographique :



Tous les examens colorimétriques ou dans l'ultra-violet ont été réalisés à l'aide du spectrophotomètre UNICAM SP 500.

Résultats.

Identification des stérols.

Dans la première fraction, nous avons caractérisé puis dosé, d'une part le cholestérol total par la méthode de LIBERMANN-BURCHARD, d'autre part le cholestérol libre par formation d'un complexe digitonique.

Chez les sujets examinés, la teneur en cholestérol total est comprise entre 8,4 et 9,6 p. 100 ; le cholestérol libre entre 2,5 et 3 p. 100.

Ces deux réactions ne sont pas spécifiques du cholestérol, d'autres stérols étant susceptibles de réagir positivement aussi. Toutefois, la réaction de LIBERMANN-BURCHARD n'est positive qu'à l'égard des stérols non saturés, et ne sont précipitables par la digitonine que les composés ayant une fonction hydroxyle libre. Ainsi, on peut admettre que dans l'insaponifiable le cholestérol est accompagné d'autres stérols. Nous avons essayé de caractériser les produits possédant des chromophores Libermann positifs. Une partie aliquote de l'insaponifiable est dissoute dans 3 ml de benzène pur. La chromatographie est faite par partage sur colonne renfermant 5 g d'alumine d'activité II de Brockmann. Les éluats sont recueillis à l'aide d'un collecteur automatique de fractions délivrant des volumes de liquide de 1,6 ml (tableau 1).

Tous les tubes sont évaporés sous azote et le résidu sec est repris par 5 ml de chloroforme pur. On ajoute 2 ml d'anhydride acétique et V gouttes d'acide sulfurique concentré. Le mélange est placé 10 minutes dans un thermostat à 37° et la lecture est faite au colorimètre.

Sur la figure 1, on remarque qu'un premier groupe de chromophores est élué par le mélange benzène + acétate d'éthyle à 0,5 p. 100. Un second groupe est entraîné par ce même mélange

Solvants	Vol. en ml.	N° des tubes	Phases
Benzène pur	100	1 à 38	A
Benzène + Acétate d'éthyle 0,5 p. 100 .	50	39 à 56	B
Benzène + Acétate d'éthyle 1 p. 100	50	57 à 79	C
Benzène + Acétate d'éthyle 2 p. 100	50	80 à 101	D
Benzène + Acétate d'éthyle 5 p. 100	50	102 à 130	E
Benzène + Acétate d'éthyle 1 : 1 (v/v)	50	131 à 147	F
Éthanol pur .	50	148 à 250	G

TABL. 1 — Fractionnement des chromophores Libermann positifs.

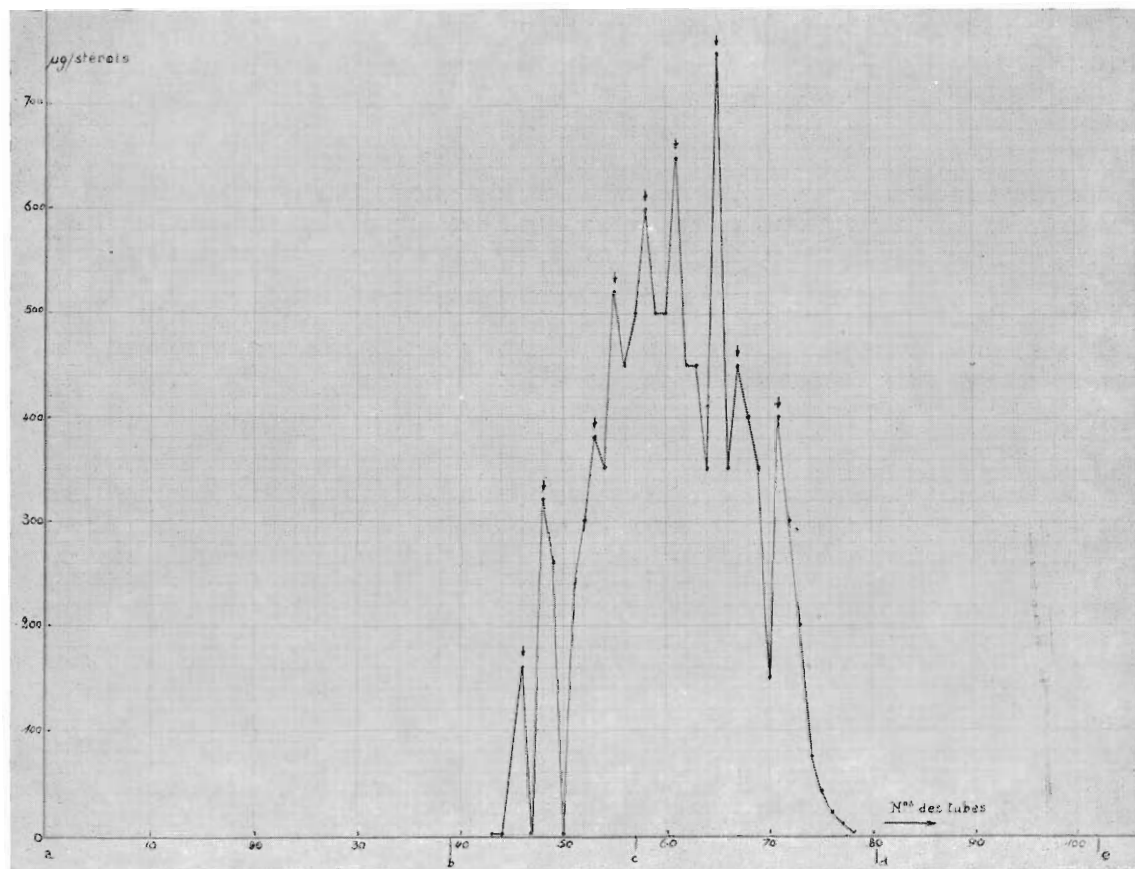


FIG. 1. — Séparation des chromogènes Libermann positifs par chromatographie sur alumine, en abscisse numéros des tubes, en ordonnée teneur en stérois totaux (en µg).

à 1 p. 100 d'acétate d'éthyle. En revanche, le benzène pur ou renfermant des volumes croissants d'acétate d'éthyle n'élue aucune fraction supplémentaire. Par cette méthode, on a pu déterminer plusieurs vagues montrant les variations importantes de la teneur en stérois totaux de l'insaponifiable.

A la suite de ces résultats, nous avons effectué une chromatographie en couche mince d'après la méthode indiquée par STAHL (1958). Chaque fonction est évaporée puis reprise par 0,5 ml de benzène pur. A l'aide d'une micropipette, on dépose sur la plaque supportant une couche de gel de silice, quelques μ ml de la solution. Après séchage à l'air, la plaque est introduite dans une cuve en verre dont le fond est garni d'une couche d'environ 0,5 cm de hauteur du mélange : benzène-acétate d'éthyle-méthanol (45 : 4 : 1 V/V) ; la cuve est bouchée, puis on laisse migrer le solvant pendant 45 minutes. La plaque est retirée et séchée dans un courant d'air froid, ensuite on pulvérise le réactif suivant : dinitro-2,4-phénylhydrazine 250 mg , dissous dans 25 ml du mélange : éthanol-acide sulfurique pur-eau distillée (50 : 50 : 20 V/V). La plaque est maintenue 10 à 15 minutes à 50° C.

Après ce temps nous avons observé pour chaque fraction les taches suivantes.

Extrait n° 1 : un spot violet à fluorescence rouge $R_f = 0,68$.

Extrait n° 2 : deux spots bleus à fluorescence rouge $R_f = 0,68$,
un spot orange sans fluorescence $R_f = 0,95$,
trois spots vert émeraude voisins au front du solvant.

Extrait n° 3 : un spot bleu à fluorescence rouge $R_f = 0,68$,
un spot à fluorescence orange $R_f = 0,95$,
un spot à fluorescence verte $R_f = 0,98$.

Extrait n° 4 : un spot à fluorescence jaune $R_f = 0,25$.

Extrait n° 5 : celui-ci a provoqué une traînée brunâtre due certainement à des traces de lipides, dont les bords étaient colorés en rouge orangé mais dont l'interprétation était impossible.

Squalène.

L'addition de quelques gouttes d'une solution concentrée de trichlorure d'antimoine dans le chloroforme (réaction de DELABY, SABETAY et JANOT, 1934) à l'éluat chromatographique n° 1 développe rapidement une coloration rouge violacée identique à celle d'une solution diluée de squalène pur.

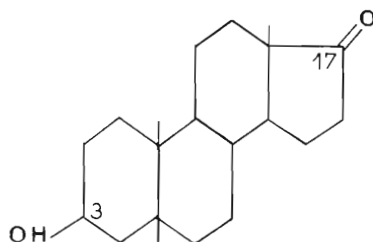
Stéroïdes.

Les méthodes colorimétriques utilisées ne permettent que l'identification de certaines fonctions chimiques dans les limites d'application de chacune d'elles.

Cétostéroïdes en C₁₉.

En présence de m-dinitrobenzène et d'une solution de potasse dans l'éthanol, la réaction de ZIMMERMANN permet d'identifier et de doser les substances dont le carbone 17 porte une fonction cétone (17 - CS). Cette méthode a été effectuée à 4° C pendant trois heures sur 0,5 ml de l'éluat 2 suivant les modalités techniques indiquées par HENRY. Après ce temps, il se développe une coloration rouge pourpre avec un maximum d'absorption à 520 μ , résultat comparable à celui obtenu avec une solution étalon de déhydroépiandrostérone pure (fig. 2).

Le pourcentage en 17-CS de l'insaponifiable est compris entre 0,18 et 0,21 p. 100.



Cette réaction n'est caractéristique que des 17-cétostéroïdes lorsque le maximum est à 520 μ ; tandis que la méthode de PINCUS au trichlorure d'antimoine dans un mélange d'acide acétique et d'anhydride acétique permet de caractériser les 17-CS saturés, possédant la structure ci-dessus.

Après chauffage, ce réactif développe une coloration bleue dont le maximum d'absorption est à 607-610 μ , comparable à la solution étalon d'androstérone pure (fig. 3).

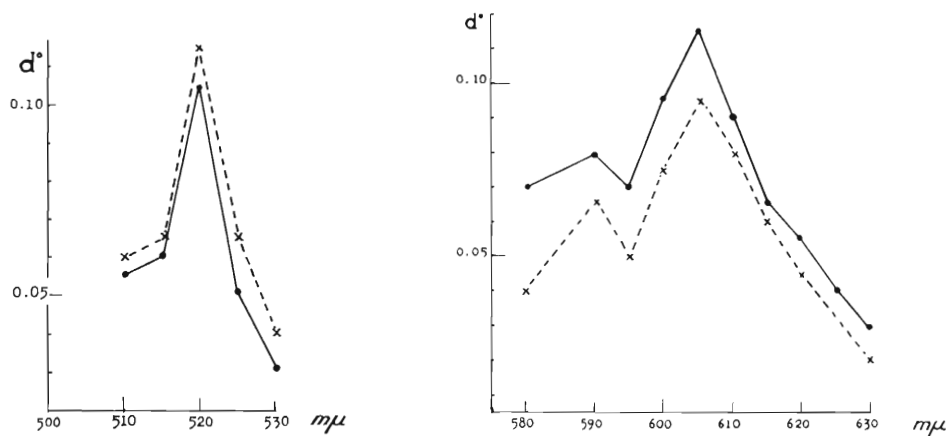


FIG. 2 et 3. — A gauche, Réaction de ZIMMERMANN (17-CS) ; en pointillé : étalon, déhydroisoandrostérone. A droite, Réaction de PINCUS (17-CS saturés) ; en pointillé : étalon, androstérone.

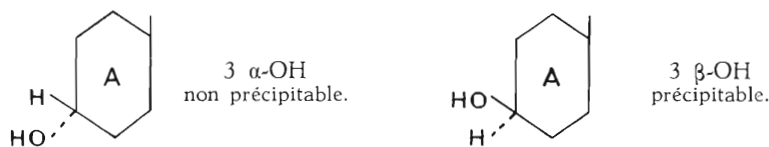
Séparation par le réactif T de Girard.

A titre de contrôle, nous avons réalisé sur une partie aliquote de la solution chromatographique une division en stéroïdes cétoniques et non cétoniques d'après la technique de BUTLER et MARRIAN (1938). L'extrait sec repris par l'éthanol est additionné d'un poids déterminé de réactif. Le mélange est traité au bain-marie à 90° C pendant vingt minutes en milieu acétique. Après refroidissement, on ajoute un volume d'eau distillée, puis la liqueur est neutralisée et extraite par l'éther qui est ensuite évaporé. Le résidu constitue la fraction non cétonique négative à l'égard de la réaction de ZIMMERMANN, positive à la réaction de LIBERMANN.

La phase aqueuse précédente est franchement acidifiée par l'acide chlorhydrique concentré afin de régénérer l'hydrazone formée. Après deux heures de repos, on extrait cette phase par l'oxyde d'éthyle; celui-ci est évaporé à sec et le résidu constitue la fraction cétonique qui donne dans ce cas une réaction de ZIMMERMANN fortement positive, ce qui permet d'admettre la présence d'une fonction cétone sur le carbone 17.

Précipitation par la digitonine.

Après élimination du cholestérol, nous avons essayé de préciser la structure des stéroïdes par formation de complexe digitonique d'après la méthode de BUTT, HENLY et MORRIS (1948). Cette précipitation sélective permet de séparer les stéroïdes porteurs d'un hydroxyle en position β sur le carbone 3 suivant le schéma :



Les pourcentages des deux fractions par rapport à l'insaponifiable sont respectivement de 0,12 p. 100 pour la fraction α et de 0,205 p. 100 pour la fraction β .

Stéroïdes en C_{21} .

Plusieurs méthodes permettent d'identifier et de doser ce groupe de stéroïdes. Nous avons utilisé en premier lieu la technique de GORNALL et MAC DONALD suivant deux modalités différentes et dont le principe est la condensation de la dinitro-2,4-phénylhydrazine avec les groupements cétone

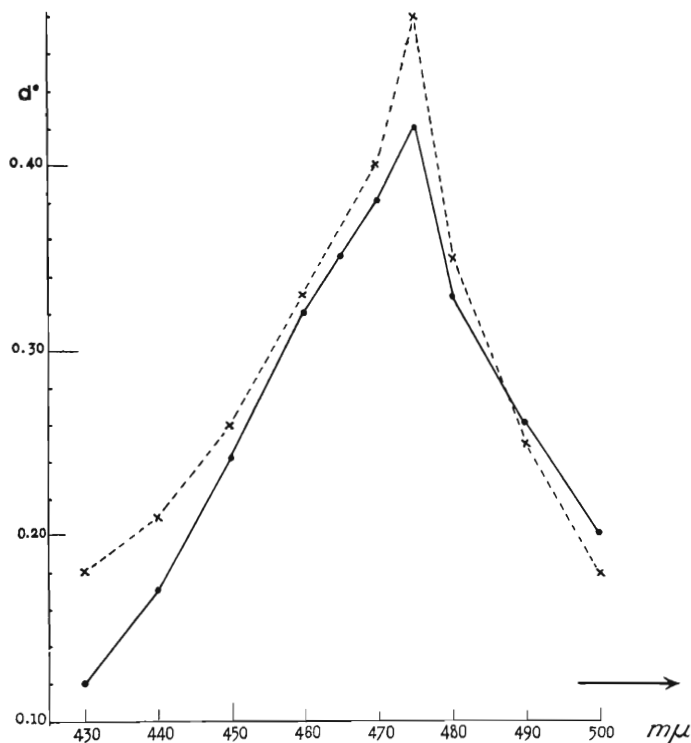


FIG. 4. — Réaction de GORNALL et MAC DONALD après chauffage à $59^{\circ} C$ pendant 90 mn ; en pointillé : étalon, acétate de cortisone.

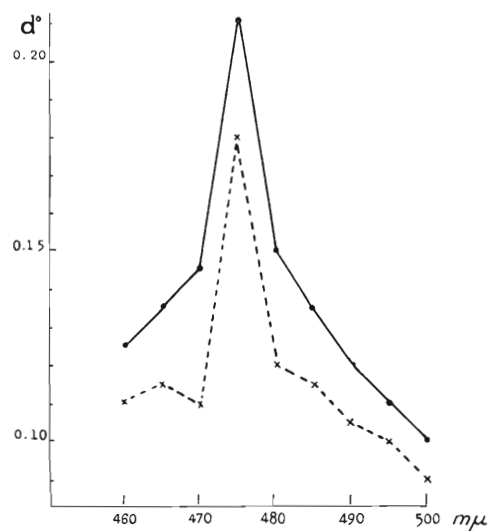


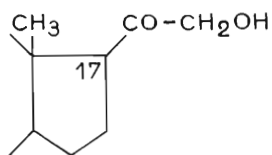
FIG. 5. — Réaction de GORNALL et MAC DONALD à froid après 5 mn ; en pointillé : étalon, acétate de cortisone.

pour donner des hydrazones fortement colorées en milieu alcalin. Cette réaction a d'abord été réalisée par chauffage à $59^{\circ} \pm 0,5$ pendant 90 minutes. Après addition d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 4N, le mélange prend une teinte rouge cerise, qui est ensuite diluée à l'aide de méthanol pur et examinée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de $474 m\mu$ (fig. 4), en comparaison avec des gammes étalon traitées de façon identique, le zéro du galvanomètre étant réglé sur un tube témoin. Ceci nous a permis de caractériser dans la fraction chromatographique 3 des substances possédant une fonction cétone en trois, une double liaison Δ^4 et un groupement 20,21- α -cétol ou α -glycol. Le pourcentage dans l'insaponifiable varie entre 0,43 et 0,45 p. 100.

La seconde modalité consiste à effectuer cette réaction à $20^{\circ} C$ pendant cinq minutes au maximum. Celle-ci permet d'identifier également les structures précédentes mais aussi de constater la présence de substances biologiquement actives (fig. 5).

Ces premiers résultats ont été vérifiés ensuite par chromatographie sur papier et par réaction colo-

rimétrique. Chacune de ces méthodes utilise le bleu de tétrazolium, réactif spécifique des groupes α -cétoliques de la chaîne latérale en 17 (schéma ci-dessous) douée de propriétés réductrices :



a) Chromatographie sur papier. L'effluent III est préalablement purifié par passage sur colonne d'après la méthode de BUSH et SANDBERG (1953). Le résidu, dissous dans un mélange d'acétate d'éthyle-éther de pétrole V/V, est déposé au sommet d'une colonne contenant 2 g de gel de silice. Les impuretés sont entraînées par 10 ml du même mélange, puis les stéroïdes élués par 15 ml de méthanol + acétate d'éthyle (1 : 1 V/V). Cette fraction est évaporée à sec sous vide et reprise par quelques ml d'éthanol absolu. A l'aide d'une micropipette on dépose sur une feuille de papier Whatmann n° 1 quelques μ ml de la solution alcoolique. Le chromatogramme est traité par voie descendante dans le système : toluène- acétate d'éthyle-eau distillée (9 : 1 : 5 V/V). On dépose simultanément sur la même feuille quelques μ ml de solution témoin de cortisone ou de corticostérone. Après séchage à l'air, les bandes de papier sont trempées dans le mélange suivant : 1 partie de bleu de tétrazolium à 1 p. 100 dans l'eau distillée, 2 parties de solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 2N, puis séchées entre des feuilles de papier filtre. Les taches bleu violacé apparaissent immédiatement, ce qui laisse prévoir l'existence de substances possédant une fonction 20,21- α -cétolique.

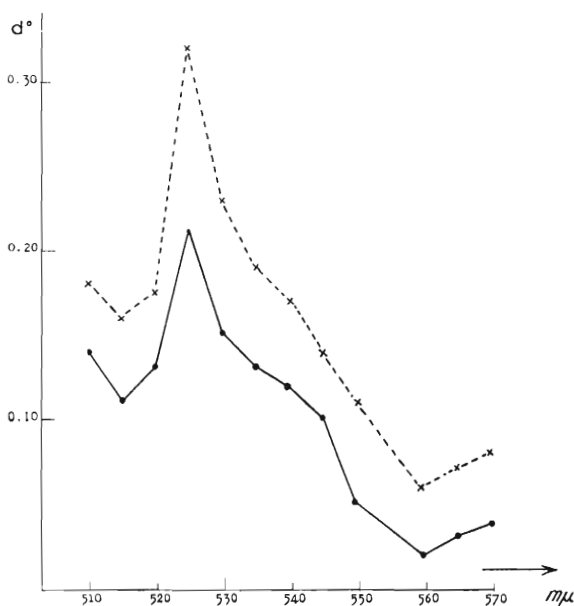


FIG. 6. — Réaction de KINGSLEY et GETCHELL (bleu de tétrazolium); en pointillé: étalon, acétate de cortisone.

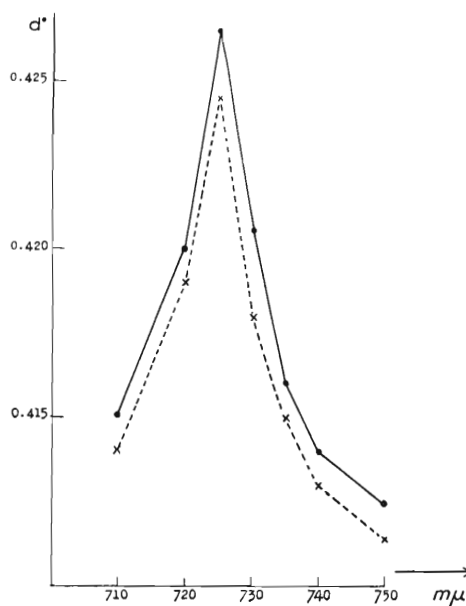


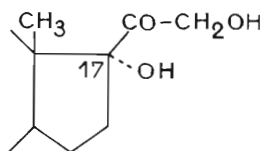
FIG. 7. — Réaction de HEARD et SOBEL; en pointillé: étalon, désoxycorticostérone.

b) Méthode colorimétrique. Ce résultat est ensuite vérifié par la méthode KINGSLEY et GETCHELL (1961). Au résidu sec, dissous dans 2 ml d'éthanol absolu, on ajoute un égal volume d'une solution alcoolique de bleu de tétrazolium à 100 mg/400 ml, et 1 ml d'hydroxyde de soude 0,03N dans l'alcool. On prépare également une solution étalon d'acétate de cortisone. Après mélange, on

laisse au repos quinze minutes, puis on verse dans tous les tubes 0,2 ml d'acide chlorhydrique à 3,6 p. 100 dans l'alcool. L'examen spectrophotométrique a montré pour l'essai un maximum d'absorption à 525 m μ (fig. 6), identique à l'étalon.

Le réactif de Folin (acide phosphomolybdotungstique) est réduit par les corticostéroïdes porteurs d'une chaîne latérale α -cétolique. À un moindre degré, le groupement Δ^4 -3 CO possède également cette propriété. C'est le principe de la méthode de HEARD et SOBEL (1946). Toutefois, il est nécessaire que la fonction cétone en 20 soit voisine d'une fonction alcool primaire ou conjuguée à une double liaison. Cette réaction, appliquée à une partie aliquote de l'éluat trois, montre, après chauffage, une coloration bleue intense avec un maximum d'absorption à 725 m μ , comparable à la solution témoin de désoxycorticostérone (fig. 7).

Réaction de PORTER et SILBERT (1950). La condensation de la phénylhydrazine en présence d'alcool et d'acide sulfurique donne une coloration jaune, spécifique des corticostéroïdes porteurs en 17 d'une chaîne dihydroxyacétonique correspondant au schéma ci-dessous :



(17,21 - dihydroxy - 20 - cétostéroïdes), avec un maximum à 410 m μ . Cette réaction a été négative à l'égard de la fraction éluante trois. En revanche, on remarque un maximum entre 340 et 370 m μ .

Le tableau 2 résume les résultats obtenus par les méthodes précédentes.

Méthodes	Groupements fonctionnels	max. m μ	Résultats
LIBERMANN	Nature stéroïdique et groupement Δ^4 -3 OH		+
ZIMMERMANN	17 - CS	520	+
PINCUS	17 - CS saturés	610	+
GORNALL et MAC DONALD (à chaud)	Δ^4 - 3CO et 20,21 - α -cétol ou α -glycol	475	+
GORNALL et MAC DONALD (à froid)	Δ^4 - 3CO	475	+
KINGSLEY et GETCHELL	chaîne latérale réductrice 20,21 - α -cétolique	525	+
HEARD et SOBEL	α -cétol et α -6 insaturé, 3 cétone	725	+
PORTER et SILBERT	17,21 - dihydroxy-20 cétostéroïdes	420	—
PORTER et SILBERT	Δ^4 - 3CO	340 370	+

TABL. 2. — Réactions colorées des stéroïdes.

Détermination spectrophotométrique dans l'ultra-violet.

Les éluats 2 et 3 sont évaporés sous gaz inerte et repris par quelques ml d'hexane pur puis rechromatographiés sur colonne d'alumine dans les systèmes suivants indiqués par VAGUE et GARRIGUE :

Fraction A - hexane pur 40 ml.
 Fraction B - hexane + chloroforme (95 : 5 V/V) 20 ml.
 Fraction C - hexane + chloroforme (80 : 20 V/V) 70 ml.
 Fraction D - chloroforme pur 60 ml.

Chaque fraction est reprise par l'éthanol absolu. On établit ensuite la courbe du spectre entre 230 et 280 $m\mu$, ce qui permet de constater une forte absorption entre 233 et 240 $m\mu$, et une autre nettement plus faible entre 265 et 270 $m\mu$ (fig. 8).

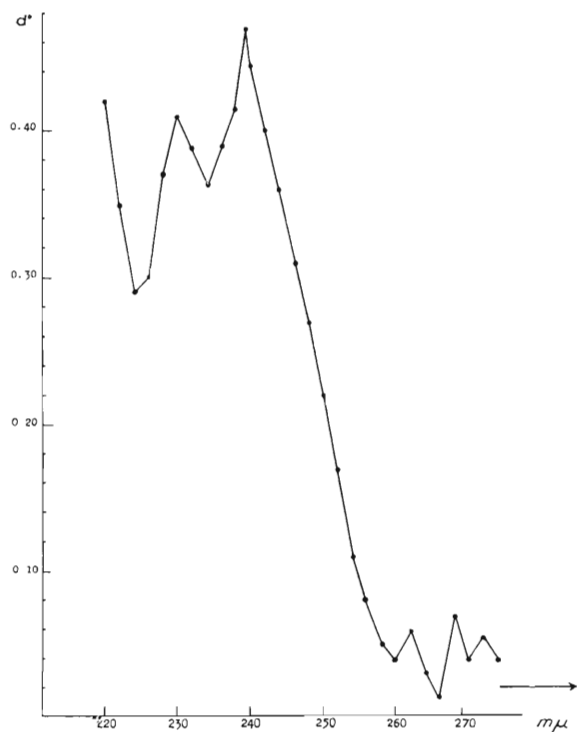


FIG. 8. — Spectre ultra-violet des fractions 2 et 3 de l'insaponifiable, après chromatographie sur colonne.

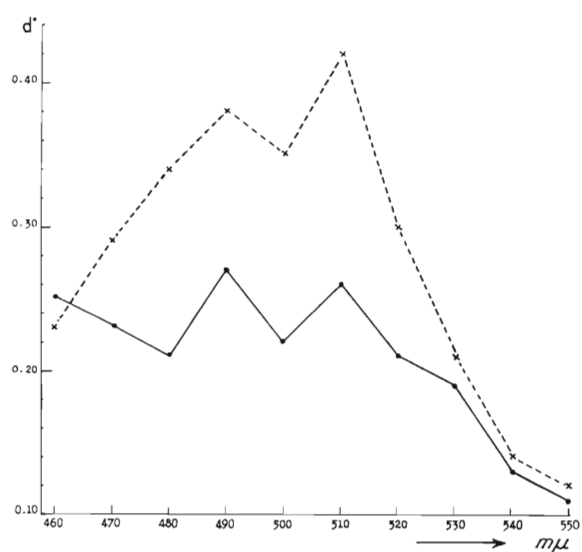


FIG. 9. — Identification des œstrogènes par le gaïacol sulfonate de potassium. En pointillé : étalon, œstradiol cristallisé.

Identification et dosage des œstrogènes.

Après extraction des phénolstéroïdes par l'hydroxyde de sodium N, la séparation et la purification de l'oestrone, de l'oestradiol et de l'oestriol ont été effectuées par la méthode de L. CEDARD (1960). Le premier de ces œstrogènes a été caractérisé par fluorimétrie suivant EBERLEIN et coll. (1958). Les deux autres furent dosés par colorimétrie à l'aide d'une solution aqueuse de gaïacol sulfonate de potassium en milieu sulfurique.

La figure 9 montre un premier maximum à 490 $m\mu$, caractéristique de l'œstradiol, et un second pic à 510 $m\mu$ caractéristique de l'œstrone.

Le pourcentage par rapport à l'insaponifiable est de 0,18 p. 100 d'œstrone et 0,014 p. 100 d'œstradiol.

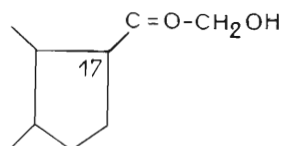
Conclusion

L'insaponifiable des corps gras renferme toujours à côté des caroténoïdes et des hydrocarbures, des stérols qui sont des alcools secondaires saturés ou non. Parmi ceux-ci on trouve, chez les Poissons cartilagineux, le squalène, qui, suivant KARRER, pourrait représenter un des chaînons de la synthèse du cholestérol, que l'on considère actuellement comme un intermédiaire dans la biogénèse des stéroïdes. L'huile de foie de squalé renferme dans son insaponifiable jusqu'à 22,5 p. 100 de ce produit. Sa teneur et celle des acides gras diminuent lorsque la concentration en squalène augmente chez *Centrophrus granulosus* et chez le Pélerin (RANDOIN et SOUDAN, 1944-46). Néanmoins, à côté du cholestérol, l'insaponifiable contient d'autres stérols susceptibles de donner des résultats positifs sur la technique de LIBERMANN-BURCHARD. Chez les Invertébrés marins par exemple, on a identifié du spongesterol (*Suberites domuncula*), du 24-déhydrocholestérol (*Balanus glandula*), du 24-méthylcholestérol chez les Mollusques (FAGERLUND et IDLER, 1956) qui, d'après ces auteurs, est le principal stérol des Mollusques comestibles. Ainsi, plusieurs groupes de stérols peuvent exister dans les lipides, ce qui a pu être mis en évidence dans le tissu musculaire par la chromatographie de partage.

Les stéroïdes en C₁₉, dépourvus de chaîne latérale en 17, portent sur ce carbone une fonction cétone. Sous ce terme, on englobe les stéroïdes génitaux et ceux d'origine corticosurrénale ou inter-rénale, doués d'activités androgéniques et œstrogéniques. Ce groupe d'hormones semble avoir été étudié chez les Poissons. Si les résultats d'essais biologiques furent attribués à la testostérone, élaborée par les cellules interstitielles des testicules, la nature chimique de ces stéroïdes est en grande partie inconnue. Au niveau de la surrénale de *Physeter catodon*, RACE et HSIA MAY WU signalent la présence de 17-cétostéroïdes. Dans le tissu musculaire de *Scylliorhinus caniculus*, on remarque également des substances qui réagissent positivement aux réactifs classiques (Pincus et Zimmermann), pouvant ainsi être rapprochées des résultats précédents.

On entend par corticoïdes, les hormones élaborées par la corticosurrénale chez les Mammifères et par l'inter-rénal chez les Elasmobranches. Ce groupe de stéroïdes a le cholestérol comme précurseur et possède une chaîne latérale en C₁₇. Ils ont été particulièrement bien étudiés chez les Téléostéens comme chez les Elasmobranches. La cortisone, l'hydrocortisone, l'aldostérone, les 17-hydroxycorticostéroïdes, la 11-déhydrocorticostérone, ainsi que des substances similaires comprenant une fonction $\Delta^1 - 3 \text{CO}$ ont été identifiées dans le sang ou le plasma. Néanmoins, si les structures chimiques de ces stéroïdes caractérisés aussi bien chez les Téléostéens que chez les Elasmobranches peuvent se comparer, leur action physiologique est difficilement comparable, car les premiers possèdent des organes génitaux nettement différenciés (canaux de Müller ou de Wolff), où l'on retrouve des aspects histologiques sensiblement identiques à ceux des Vertébrés supérieurs. De plus, on remarque un développement des caractères sexuels secondaires (*Myxopterygiums*) liés aux activités génitales. Ces raisons permettent déjà de séparer ces deux classes d'animaux marins.

Les résultats que nous avons obtenus, laissent prévoir l'existence de produits similaires au niveau du tissu musculaire. La chaîne latérale douée de propriétés réductrices 20.21- α -cétoïque a été identifiée par chromatographie et colorimétrie au bleu de tétrazolium; tandis que par la méthode de HEARD et SOBEL on a caractérisé les corticostéroïdes réducteurs. La réaction négative à l'égard de la phénylhydrazine (PORTER et SILBERT) semble due à l'absence de stéroïdes ayant un hydroxyle en 17. La formule des produits caractérisés dans les lipides du tissu musculaire pourrait dans ce cas correspondre au schéma ci-dessous :



Le groupement $\Delta^1 - 3 \text{CO}$ a été caractérisé d'une part par la méthode de GORNALL et MAC DONALD, d'autre part par celle de PORTER et SILBERT, si toutefois on considère le déplacement du

maximum vers les basses longueurs d'onde. Ces résultats sont confirmés par la suite à l'aide d'examen spectrophotométriques dans l'ultra-violet où l'on remarque une forte absorption dans les bandes de 232 - 243 μ .

Les phénolstéroïdes doués de propriétés œstrogéniques ne sont pas simplement élaborés par les follicules, mais aussi par le placenta, les testicules et la corticosurrénale chez les Mammifères, ou l'interrénal chez les Elasmobranches. Leurs caractéristiques chimiques sont l'insaturation du cycle A porteur d'une fonction phénol. Plusieurs observations ont montré leur présence soit dans les œufs de Crustacés, soit dans le sang de différentes espèces de Poissons. L'œstrone, l'œstriol, l'œstradiol 17- β , ont pu ainsi être identifiés et dosés, de même que de faibles quantités de progestérone. Dans les lipides du tissu musculaire nous avons également caractérisé ces composés.

De l'ensemble de ces résultats, il semble qu'il existe dans les lipides du tissu musculaire de *Scylliorhinus caniculus* L. des stéroïdes dont la teneur en corticostéroïdes est sensiblement plus élevée que celle des 17-cetostéroïdes. Les œstrogènes ont, au contraire, un taux relativement bas. La présence de ces composés peut être mise en parallèle avec celle des composés que l'on rencontre généralement dans les lipides des autres animaux.

(Musée océanographique et Service scientifique des Laboratoires Theramex, Monaco).

BIBLIOGRAPHIE

- BLOCK (R.J.), DURRUM (E.L.) et ZWEIG (G.), 1958. — A manual of paper chromatography and paper electrophoresis. — New York, Academic Press inc., 710 p.
- CEDARD (L.). 1960. — Dosage fluorimétrique des œstrogènes sanguins après fractionnement chromatographique. — *Path. Biol.*, **8** (9-10) : 901-15.
- CEDARD (L.) et NOMURA (T.), 1961. — Dosage fluorimétrique après chromatographie de partage des œstrogènes dans le sang de certains Téléostéens. — *Bull. Inst. océanogr.*, Monaco, n° 1 196 : 1-12.
- CEDARD (L.), FONTAINE (M.) et NOMURA (T.), 1961. — Sur la teneur en œstrogènes du sang de Saumon adulte (*Salmo salar* L.). — *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **252** : 2656-7.
- CHESTER (J. I.), PHILLIPS (J. G.) et HOLMES (W. N.), 1958. — Comparative physiology of the Adrenal cortex. — *Comp. Endocrinol.* : 582-610.
- DEAN (D. F.) et JONES (J.), 1959. — Sex steroids in the Lungfish (*Protopterus annecteus* OWEN). — *J. Endocrinol.*, **18** (4) : 366-71.
- EBERLEIN (W. R.), BONGIOVANNI (A. M.) et FRANCIS (C. M.), 1958. — A simplified method for the routine measurement of urinary estriol. — *J. Clin. Endocrinol.*, **18** : 1274-7.
- ENGEL (L. L.) et LANGER (L. J.), 1961. — Biochemistry of steroid Hormones. — *Ann. Rev. Biochem.*, **30** : 499-524.
- EULER (U. S. V.) et FANGE (R.), 1961. — Catecholamines in Nerves and Organs of *Myxine glutinosa*, *Squalus acanthias* and *Gadus callarias*. — *Gen. comp. Endocrinol.*, **1** (3) : 191-4.
- FAGERLUND (U.H.M.), IDLER (D.R.), 1956. — Marine sterols. II. 24-methylenecholesterol in Mollusc. — *J. org. Chem.*, **21** : 372-3.
- FAGERLUND (U. H. M.), IDLER (D. R.), 1960. — Marine sterols. VIII. In vivo transformations of the sterol side chain by a clam. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **39** : 505-9.
- FIESER (L. F.) et FIESER (M.), 1959. — Steroïds. — New York, Reinhold Pub. Corpor., 945 p.
- FONTAINE (M.) et HATEY (J.), 1954. — Sur la teneur en 17-hydroxycorticostéroïdes du plasma de Saumon (*Salmo salar*). — *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **239** : 319-21.
- GALLIEN (L.) et CHALUMEAU (M.T.), 1960. — Mise en évidence de stéroïdes œstrogènes dans l'ovaire juvénile de *Xenopus laevis* DAUDIN et cycle des œstrogènes au cours de la ponte. — *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **251** : 460-2.
- GASTAUD (J. M.), 1961. — Contribution à la biochimie des éléments planctoniques. Etude de l'insaponifiable des lipides et de la fraction stérolique. — *Comm. int. Explor. Sci. Mer Médit., R. et P.V.*, **16** (3) : 251-3.

- GILLAM (A. E.) et STERN (E. S.), 1958. — An introduction to Electronic Absorption Spectroscopy in organic chemistry. — London, Edward Arnold Ltd., 2^e édit., 326 p.
- GORNALL (A. G.) et MAC DONALD (P. M.), 1953. — Quantitative determination of the steroid hormones with 2,4-dinitro-phénylhydrazin. — *J. biol. Chem.*, **201** : 279-97.
- HASHWOOD (G. A. D.), 1960. — Steroids in marine organisms. — *Ann. New York Acad. Sci.*, **90** : 877-83.
- HEARD (D. H.), SOBEL (H.) et VENNING (H.), 1946. — The neutral Lipid-soluble reducing Substances of urine as an Index of Adrenal cortical Function. — *J. biol. Chem.*, **165** : 699-710.
- IDLER (D. R.) et FAGERLUND (U. H. M.), 1955. — Marine sterols. I. Isolation of 24-méthylènecholesterol from Molluscs. — *J. Am. chem. Soc.*, **77** : 4142-4.
- IDLER (D. R.), RONALD (A. P.) et SCHMIDT (P. J.), 1959. — Biochemical studies on sockeyes salmon during spawning migration. VII. Steroids hormones in plasma. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **37** (10) : 1227-38.
- IDLER (D. R.), SHMIDT (P. J.) et BIELY (J.), 1961. — The androgenic activity of 11-ketotestosterone: A steroid in salmon plasma. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **39** (2) : 317-20.
- IDLER (D. R.), SCHMIDT (P. J.) et RONALD (A. P.), 1960. — Isolation and identification of 11-ketotestosterone in salmon plasma. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **38** (10) : 1053-7.
- JAYLE (M. F.), 1962. — Analyse des stéroïdes hormonaux. — Paris, Masson et Cie, t. I., 271 p., 122 fig., 20 tabl.; t. II, 491 p., 87 fig., 35 tabl.
- KINGSLEY (G. R.) et GETCHELL (G.), 1961. — A simple Method for the Determination of Urinary Adrenocortical Steroids (α -ketols). — *Anal. biochem.*, **2** (1) : 1-14.
- LEBEAU (P.) et JANOT (M.-M.), 1955-56. — Traité de pharmacie chimique. — Paris, Masson et Cie, t. III, Chimie organique, 1193 p.
- LISK (R. D.), 1960. — Estradiol -17 β in the eggs of the American lobster *Homarus americanus*. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **39**, 659-62.
- LOISELEUR (J.), 1954. — Techniques de laboratoire. I. Chimie physique et chimie biologique. — Paris, Masson et Cie, 930 p., 203 fig.
- MORTON (R. A.), 1942. — The Application of Absorption Spectra to the Study of Vitamins, Hormones and Coenzymes. — London, Adams Hilger Ltd., 226 p., 73 fig.
- NANDI (J.) et BERN (H. A.), 1960. — Corticosteroid production by interrenal tissue of Teleosts fish. — *Endocrinology*, **66** (2) : 295-303.
- PAPHOFF (H.) et CHOH HAO LI, 1958. — The isolation and characterization of growth hormone from anterior lobes of whale pituitaries. — *J. biol. Chem.*, **231** : 367-77.
- PHILLIPS (J. G.), 1959. — Adrenocorticosteroids in fish. — *Proceed. Soc. Endocrinol.*, 74^e réunion.
- PHILLIPS (J. G.) et MULROW (P.), 1959. — Corticosteroids production in vitro by Interrenal Tissue of Killfish (*Fundulus heteroclitus* L.). — *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, **101** (2) : 263-6.
- PHILLIPS (J. G.), HOLMES (W. N.) et BONDY (P. K.), 1959. — Adrenocorticosteroids in Salmon plasma (*Oncorhynchus neka*). — *Endocrinology*, **65** (5) : 811-8.
- RACE (G. J.) et HSIAO MAY WU, 1961. — Adrenal cortex fonctionnal zonation in the whale (*Physeter catodon*). — *Endocrinology*, **68** (1) : 156-8.
- RANDINO (L.) et SOUDAN (F.), 1944-46. — L'insaponifiable des huiles de foie de squal est-il ou n'est-il pas toxique? — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **14** (1-4) : 157-60.
- SAINTON (P.), SIMMONET (H.) et BROUHA (L.), 1952. — Endocrinologie clinique, thérapeutique et expérimentale. — Paris, Masson et Cie, t. I, 835 p., 175 fig.
- STAHL (R.), 1958. — Dünnschicht Chromatographie, eine adsorptionschromatographische Schnellmethode unter besonderer Berücksichtigung der Untersuchung von Lipiden. — *Fetten, Seifen, Anstrichmittel*, **60** : 1027-51.
- SUNDERMANN (W. F.) et SUNDERMANN (W. F. Jr.), 1960. — Lipids and the Steroids Hormones in Clinical Medicine. — Philadelphia, Lipincott and C^o, 207 p., 65 fig., 36 tabl.
- VAGUE (J.) et GARRIGUE (J. C.), 1957. — Les stéroïdes du tissu adipeux humain. Etat actuel du problème. — *Semaine des hôpitaux* (6) : 637-51.
- VARS (H. M.), TAYLOR (A. R.) et PFIFFNER (J.), 1934. — Extraction studies of the adrenal cortical hormone yield from glands of various Shark (*Galeus vulgaris* F.). — *J. biol. Chem.*, **106** : 639-44.
- VOGEL (A. I.), 1957. — Practical organic chemistry. — New-York, Longmans Green and C^o, 3^e édit., 1188 p., 46 tabl.
- WOLFF (G.) et WOLFF (J. P.), 1953. — Méthodes d'analyse et de contrôle industriel des matières grasses. — Paris, Dunod, II, 262 p., 17 fig.
- WOODHEAD (A. D.), 1960. — The présence of adrenocorticotrophic hormone in the pituitary of the arctic Cod : *Gadus morrhua* L. — *J. Endocrinol.*, **21** (3) : 295-301.
- WOTIZ (H. H.), BOTTICELLI (C. R.), HISAW (F. L. Jr.) et RINGLER (I.), 1958. — Identification of estradiol -17 β from dogfish ova (*Squalus suckly*). — *J. biol. Chem.*, **231** (2) : 589-92.
- WOTIZ (H. H.), BOTTICELLI (C. R.), HISAW (F. L. Jr.) et OLSEN (A. G.), 1960. — Estradiol -17 β , estrone and progesterone in the ovaries of dogfish (*Squalus suckly*). — *Proc. nat. Acad. Sci. New York*, **46** (4) : 580-3.