Zeitschrift: Mémoires de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles

Herausgeber: Société Vaudoise des Sciences Naturelles

Band: 13 (1963)

Heft: 4

Artikel: Les gonadotropines : connaissances actuelles : méthodes d'extraction : essais de dosages chimiques

Autor: Weihs, Doris-E.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-258311

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 12.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Mémoires de la Société vaudoise des Sciences naturelles
N° 83 1963 Vol. 13, Fasc. 4

Les gonadotropines

Connaissances actuelles — Méthodes d'extraction
Essais de dosages chimiques

PAR

DORIS-E. WEIHS *

Centre anticancéreux romand (Lausanne)
Service des recherches expérimentales (Dir. : Dr S. Neukomm)

I. INTRODUCTION

La recherche d'une méthode d'isolement et de dosage des hormones gonadotropes est un des problèmes, encore bien actuel, de la cancérologie expérimentale, car il est connu depuis fort longtemps qu'il existe des tumeurs des cellules germinatives capables de provoquer la sécrétion ou de sécréter elles-mêmes des hormones gonadotropes, qui sont alors éliminées dans l'urine.

C'est ZONDEK en 1929 qui démontra le premier l'excrétion urinaire de grandes quantités d'hormones gonadotropes chez des individus atteints de tumeurs du testicule. Ce fait fut largement confirmé par la suite, mais il appartenait à HAMBURGER entre 1933 et 1936 de démontrer l'existence dans ces cas de deux types d'hormones gonadotropes : la *folliculo-stimuline* et la *gonadotropine choriale.*

La distinction entre ces deux hormones peut aisément être faite par un test biologique. L'un de ces tests, le plus courant mais non le plus exact, consiste à injecter l'urine ou un extrait urinaire à des souris femelles impubères et à examiner ensuite les coupes microscopiques des ovaires.

La folliculo-stimuline (FSH) stimule la croissance de presque tous les follicules de l'ovaire, à partir du stade primordial déjà, et provoque la maturation d'un certain nombre d'entre eux.

La gonadotropine choriale (HCG), qui s'apparente à la lutéinostimuline (LH), agit sur la transformation des follicules tertiaires en corps jaunes. Elle est également responsable de la lutéinisation des éléments interstitiels de l'ovaire.

* Adresse actuelle : D.-E. Weihs, Dr ès sc., Laboratoire de la clinique universitaire d'obstétrique et de gynécologie, Hôpital cantonal, Lausanne.

On retrouve la folliculo-stimuline en plus forte quantité dans l'urine de castrats, homme ou femme, ou de la femme ménopausée, alors que la gonadotropine choriale se trouve dans l'urine des femmes enceintes.

Dans les tumeurs testiculaires, HAMBURGER a montré que la folliculo-stimuline se trouve plus fréquemment associée aux séminomes, alors que l'hormone lutéinisante est plus souvent éliminée dans les cas de chorio-épithéliomes et d'épithéliomas mixtes. Cependant, du point de vue clinique, il est important de noter que toutes les tumeurs testiculaires ne sont pas sécrétantes d'hormones gonadotropes et aussi que le type d'hormone gonadotrope excrété ne permet pas de déterminer le type histologique de tumeur testiculaire.

Jusqu'à ce jour, aucune méthode d'isolement, ni aucune méthode de dosage physico-chimique n'ont pu être élaborées, qui permettent non seulement de poser un diagnostic, mais également de suivre l'évolution de ces tumeurs. C'est la raison pour laquelle le Dr NEUKOMM nous a demandé de réexaminer l'ensemble du problème de l'isolement, de l'identification et du dosage de ces hormones. Nous avons alors élaboré un programme de travail se composant de trois parties :

1° mettre au point une extraction des gonadotropines qui puisse, par sa simplicité, satisfaire aux exigences des examens de routine clinique ;

2° trouver le mode de séparation des activités biologiques qu'on suppose être dues à deux entités chimiques ;

3° exprimer, au moyen d'un dosage chimique ou physico-chimique simple, le taux quotidien des deux substances extraites et séparées.

Ayant repris la succession d'autres chercheurs en ce domaine, et après avoir rencontré au cours de cette étude certains obstacles majeurs, il nous a paru opportun de réunir une fois de plus les connaissances acquises dans ce domaine en y incorporant les résultats de nos propres recherches effectuées entre 1957 et 1960 (cf. LI, EVANS 1948; LI 1949; LI, HARRIS 1952; LORAINE 1952; DICZFALUSY 1953; ALBERT 1956; DICZFALUSY, HEINRICHS 1956; LORAINE 1956; HAMBURGER 1957; LORAINE 1958; etc.).

II. HISTORIQUE ET GÉNÉRALITÉS

Il y a un peu plus de trente ans que, presque simultanément, plusieurs auteurs, dont ASCHHEIM et ZONDEK (1926, 1927), ont démontré que l'hypophyse contenait des substances stimulant les gonades d'animaux impubères. Les mêmes auteurs ont apporté la preuve que le sang et l'urine de femmes enceintes possédaient une

activité gonado-stimulante marquée (ASCHHEIM, ZONDEK 1927). Ainsi les bases nécessaires à l'établissement des tests de grossesse étaient données. Elles sont encore valables actuellement et rendent d'inestimables services.

En 1930, COLE et HART ont découvert l'activité gonadotrope dans le sérum de jument gravide. ASCHHEIM (1928, 1933) constate que l'urine de castrats, hommes ou femmes, contient un seul principe hormonal dont l'activité se manifeste de façon distincte et différente de celle présente dans l'urine de femmes enceintes. Dans ce cas, seule la croissance folliculaire est stimulée (HAMBURGER 1931). L'hormone responsable est d'origine hypophysaire. En 1930 également, PHILIPP annonce l'absence totale d'hormone gonadotrope dans l'hypophyse de la femme enceinte, mais cette opinion s'est avérée fausse par la suite, car la sécrétion de l'hypophyse n'est que très fortement abaissée (LYONS, SIMPSON, EVANS 1953; CROOKE, BUTT, INGRAM, ROUND 1958; PONSE 1958; CROOKE, BUTT 1959; ROSENBUSCH 1960).

L'origine hypophysaire et placentaire des gonadotropines a donc été découverte relativement tôt; mais il fallut attendre encore plusieurs années pour prouver que l'hormone hypophysaire n'était pas identique à l'hormone chorionique.

La preuve irréfutable que l'hormone chorionique était élaborée par le placenta a pu être apportée finalement par des cultures de tissus (SEEGAR-JONES, GEY, GEY 1943), des greffes intra-oculaires (STEWART 1951) et des études histochimiques (ZILLIACUS 1953).

En retraçant l'historique des gonadotropines, on est frappé par le fait que l'approche biologique de la question a été nettement prépondérante au départ. Pendant plusieurs années, on s'est demandé si les effets biologiques observés devaient être attribués à une seule substance ou à plusieurs. A l'heure actuelle, seul ARON persiste dans la théorie uniciste stricte. Travaillant sur cobayes, et non sur rats ou souris, il prétend que les deux activités biologiques ne reflètent que le taux variable d'une seule et même substance circulant dans le sang.

C'est en 1939 que la Ligue des Nations a créé et défini une *substance de référence,* c'est-à-dire le « *standard international* » ainsi que son « *unité* » pour l'hormone chorionique humaine et le sérum de jument gravide. Grâce à cela, on avait espéré suivre avec précision les différentes étapes d'isolement des gonadotropines et définir leur activité spécifique. Mais en fait, le standard est un mélange de substances qui s'est avéré peu satisfaisant pour la recherche (LORAINE 1958; ALBERT, BORTH *et al.* 1958).

Trop souvent les chercheurs, isolés ou en groupes, ont continué à travailler avec leurs propres méthodes et leurs propres unités

standards (U. R.; M. U. U.; etc.). De ce fait, toute comparaison directe entre les différents travaux est pratiquement impossible. Un des mérites d'ALBERT est précisément d'avoir reconnu cet état de choses et d'avoir créé, il y a quelques années seulement, un groupe de recherche collective auquel se sont joints des laboratoires de différents pays (ALBERT, BORTH *et al.* 1958; BENZ *et al.* 1959; etc.).

Par ailleurs, on a recherché une nouvelle substance de référence extraite de l'urine de femme ménopausique, pouvant servir de standard international. C'est ainsi qu'ALBERT proposait le «HMG - 20 A» (ALBERT 1956 b; ALBERT, PAULSEN *et al.* 1958), et JOHNSON le « HMG - J 1 » puis le « HMG - J 2 », etc. (JOHNSON 1955 a).

Une des préoccupations actuelles des biochimistes reste encore d'obtenir les gonadotropines à l'état pur. Plusieurs équipes de chercheurs se sont constituées à cet effet. Les unes procèdent à l'extraction à partir d'hypophyses humaines (LI 1958; RIGAS, PAULSEN, HELLER 1958; LI, GROESCHEL 1960) ou animales (nombreux travaux de LI; p. ex. SQUIRE, LI 1958, 1959); les autres à partir de sérum humain (ANTONIADES *et al.* 1957), de sérum de juments gravides (BOURRILLON, GOT 1957; LEGAULT 1960) ou encore à partir de l'urine humaine, d'hommes ou de femmes à différentes périodes de la vie.

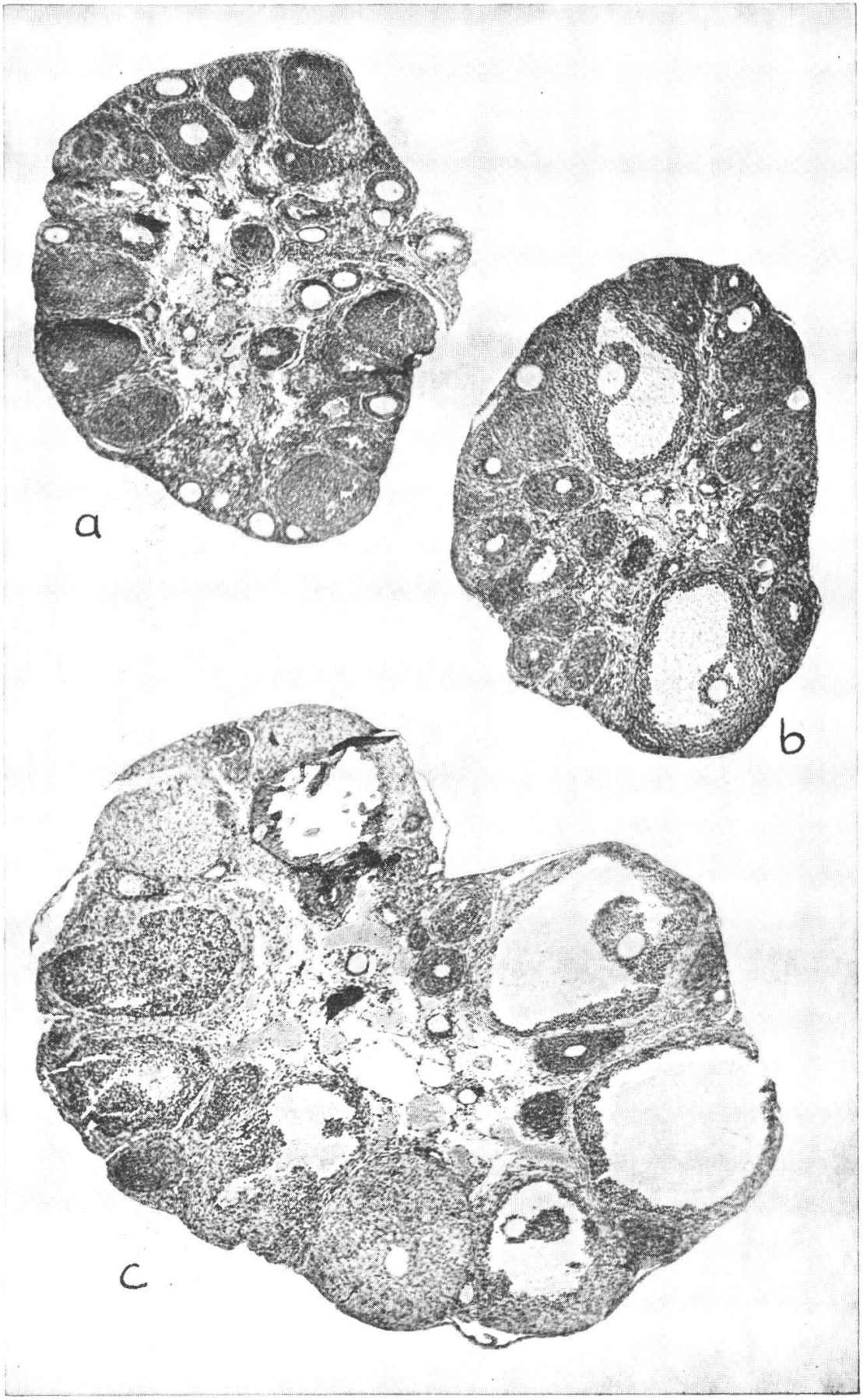
En marge des études d'identification chimique et des caractéristiques physico-chimiques des gonadotropines isolées à partir d'hypophyses, il a été possible de mettre en évidence une spécificité chimique de ces hormones selon l'espèce animale considérée.

FIG. 1. — Coupes d'ovaires de souris (x 175)

a) Témoin, âgé de 25 jours à l'autopsie.
Il n'y a pas de follicules mûrs, tout au plus quelques petits follicules III.
poids des ovaires: 3,3 mg - vagin: en diœstre.

b) Souris impubère ayant reçu des éluats d'électrophorèse de Primogonyl dans une zone ninhydrine-positive (7+8).
Réaction folliculo-stimulante physiologique: on distingue deux grands follicules III et pas de lutéinisation.
poids des ovaires: 2,6 mg - vagin: en œstre.

c) Souris impubère ayant reçu des éluats d'électrophorèse de Primogonyl dans une zone ninhydrine-positive (9+10).
Réaction mixte, forte: gros follicules III mûrs, pseudo-corps jaunes, follicules hémorragiques, thèques hypertrophiées, lutéinisées.
Poids des ovaires: 7,2 mg - vagin: en œstre avancé.



Fig, 1.

Au cours de ces dernières années nos connaissances de la chimie des protéines se sont étendues et les modes d'investigation en ce domaine améliorés. Pourtant la composition chimique exacte des gonadotropines n'est que partiellement établie et la structure de la molécule elle-même reste encore inconnue. A plus forte raison, la synthèse n'a-t-elle jamais pu être envisagée. On ne sait également que peu de chose de leur mode d'action et de leur métabolisme : sécrétées par l'hypophyse, le placenta et certaines tumeurs, elles passent dans le sang (sérum) et atteignent les ovaires ou les testicules (ZONDEK, SULMAN 1945; EVANS, SIMPSON 1950; NOWELL, CHESTER-JONES 1957; EMMENS, CLARINGBOLD, LAMOND 1957). Finalement on les retrouve dans l'urine.

A. PREMIERE PARTIE

I. ASPECT BIOLOGIQUE

Dans l'impossibilité évidente de citer tous les travaux relatifs à l'action biologique et aux effets physiologiques des gonadotropines, nous nous contenterons de rappeler les travaux directement en rapport avec les questions posées au début de nos recherches.

1) NOMENCLATURE ET ACTION DES GONADO-STIMULINES

Les greffes d'ovaires faites dans différents organes, sur des mâles et femelles normaux, castrés ou hypophysectomisés, ainsi que des expériences de parabioses, ont permis d'établir les relations étroites existant entre l'hypophyse et les gonades. La notion de double-équilibre, physiologique ou non, entre les deux stimulines, définies plus bas, et les hormones sexuelles est généralement admise.

Chez une femelle normale, on constate qu'une première stimulation physiologique, au moment de la puberté, déclenche au niveau de l'ovaire la croissance et la maturation de quelques follicules sous l'action d'une hormone folliculo-stimulante *(FSH)*. L'ovaire répond par une sécrétion d'œstrogènes, agissant sur le tractus génital (cornes utérines et vagin) et sur l'hypophyse. A ce moment, une deuxième hormone gonadotrope, lutéinisante *(LH)*, provoque l'ovulation du follicule et sa transformation en corps jaune qui, lui, sécrète la progestérone, agissant également sur le tractus génital et l'hypophyse. En cas de fécondation de l'ovule libéré, le corps jaune persiste et reste fonctionnel sous l'action synergique de l'hormone chorionique (LH) et de la prolactine *(LTH)*, hormone hypophysaire (cf. fig. 1).

Chez le mâle, la même hormone « folliculo-sitmulante » agit sur l'épithélium germinatif des canalicules séminifères. L'hormone « lutéinisante » stimule le tissu interstitiel testiculaire, source des androgènes qui agissent sur les caractères sexuels secondaires et stimulent les vésicules séminales, glandes prostatiques, etc. L'hormone hypophysaire est alors appelée *ICSH (interstitial cell stimulating hormone)*. Certains auteurs hésitent à l'identifier strictement au LH.

Les deux facteurs hormonaux précités ont connu plusieurs appellations successives (tableau 1). Leurs proportions caractéristiques varient, suivant l'origine de l'extrait (tableau 2).

TABLEAU 1

Synonymes des gonado-stimulines

I	II	Commentaires
Thélakentrine	Metakentrine	ancienne appellation (GREEP, VAN DYKE, CHOW 1942)
Facteur A Prolan A	Facteur B Prolan B	ancienne appellation, surtout allemande
h. auxogènes } pas identiques h. acmogènes }	h. crinogène	GUYÉNOT 1945, 1946
h. folliculo-stimulante	h. lutéinisante	appellation française
folliculo-stimulating hormone	luteinizing hormone	appellation anglaise (ovaire)
(gametokinetic hormone)	interstitial cell stimulating hormone	appellation anglaise (testicule)
FSH	LH ou ICSH	abréviation usuelle

Bien que l'on observe deux effets biologiques, la preuve irréfutable que l'on a affaire à deux entités chimiques, qualitativement distinctes, n'est pas apportée (EMMENS, CLARINGBOLD, LAMOND 1957); l'existence d'une seule substance à action polyvalente n'est donc pas encore absolument exclue. Sans épouser nécessairement la théorie uniciste, basée sur des raisonnements purement quantitatifs (ARON, ASCH, GAUDAN 1958; ALBERT, KELLY, SILVER, KOBI 1958), RAACKE, LORAINE, BODA et LI (1957) ont envisagé la possibilité que les activités folliculo-stimulantes et lutéinisantes du sérum de jument gravide soient inhérentes à une seule et même molécule, c'est-à-dire qu'elles soient liées à certaines fonctions ou groupements chimiques de la molécule (COLE, PENCHARZ, GOSS 1940; COLE, GOSS, BODA 1950; BOURRILLON, GOT 1957; RIGAS, PAULSEN, HELLER 1958; SEGALOFF, STEELMAN 1959). Quelle que soit la réalité, nombre de chercheurs raisonnent actuellement comme si l'on se trouvait en présence de deux substances bien définies (HAMBURGER, JOHNSEN 1957; BOURRILLON, GOT 1957; ALBERT, KELLY, KOBI 1958).

TABLEAU 2

Noms, composition et origine de certaines gonado-stimulines

Provenance	Abréviation	activité FSH	activité LH	Commentaires
Gonadotropines animales	PMS			
Sérum de jument gravide		+++	++	Proportions constantes (standard international)
Hypophyse : bœuf mouton porc etc.		variable		spécificité d'espèce (cycles ?)
Gonadotropines urinaires humaines				
Adultes (hypophyse) :	HPG	variable		
homme				admet des cycles longs difficilement décelables
femme non enceinte				nettement en fonction du cycle
Femme enceinte (placenta)	PU UFE HCG GHC	(+) hy- po- physe	+++	Proportions constantes (standard international)
Femme ménopausée (hypophyse)	UFM HMG	+++	(±)	
Castrats (hypophyse) :				
homme		+++	(±)	à la longue FSH pur
femme		+++	(±)	
Tumeurs (p. ex. : testicule)		variable	++	

2) DOSAGES ET TESTS BIOLOGIQUES

Pour le dosage clinique, quantitatif et global de l'activité gonadotrope, on se contente en général de tests rapides, approximatifs, utilisant des animaux femelles, généralement impubères, non opé-

rés, plus sensibles que les mâles. Il est moins fréquent qu'on demande une différenciation qualitative et le taux des deux facteurs FSH et ICSH séparément (Brown 1958 b).

Les tests utilisés sont simples. La plupart se basent sur l'évolution pondérale des trois organes suivants (Loraine 1957 ; Loraine 1958; Crooke 1958) :

a) le *cornes utérines* qui reflètent l'activité des gonadotropines totales (test indirect) ;

b) le *lobe ventral de la prostate de rats mâles hypophysectomisés* qui reflète l'activité de l'hormone lutéinisante (test spécifique, indirect. — Lostroh, Squire, Li 1958) ;

c) les *ovaires* qui reflètent l'activité de l'hormone folliculostimulante de façon plus ou moins spécifique (Albert, Kelly 1958 a). C'est un test direct où l'on distingue trois états :

— en dessous du seuil de réaction : pas d'effet pondéral ;
— au-dessus du seuil de réaction, aux doses submaximales : croissance vigoureuse ;
— au-dessus du seuil de réaction aux doses super-maximales : croissance asymptotique.

Notons que le niveau-limite est fonction des modifications histologiques des ovaires, puisque le poids d'un follicule kystique n'égale pas celui d'un follicule hémorragique.

Les gonadotropines chorioniques peuvent être dosées rapidement par l'hyperémie des ovaires (Aschheim 1951; Borth, Lunenfeld, Riotton, de Watteville 1956). Un autre test se base sur la superovulation des rates impubères prétraitées au sérum de jument gravide (Zarrow, Hafez, Caldwell, Pincus 1958).

Le dosage des gonadotropines hypophysaires humaines est plus délicat. Il exige une très grande sensibilité des animaux, obtenue par exemple par des injections de gonadotropines chorioniques dans le cas du dosage de l'hormone folliculo-stimulante (Steelman, Pohley 1953; Brown 1955).

Si l'hypophysectomie ne sensibilise pas la capacité de réaction des organes (Steelman, Pohley 1953), elle rend néanmoins les tests plus précis. Mais il est alors indispensable de faire une étude histologique des organes stimulés (Hamburger 1957).

Deux autres tests sont intéressants malgré leur application clinique restreinte. L'un (Gitsch 1959) se base sur la stimulation d'ovaires et de cornes utérines implantés dans la rate de rats castrés.

L'autre (Florsheim, Velcoff, Bodfish 1959) mesure l'augmentation du phosphore radio-actif dans les testicules de poussins Leghorn.

Rosemberg, Smith, Dorfmann (1957) proposent d'évaluer le test pondéral global indirect sur cornes utérines en « γ-oestrone-équivalents ».

Il est évident que des facteurs extérieurs influencent la réaction biologique au cours d'un test. On peut citer entre autres : la souche des animaux (Brown 1957), la synergie entre différentes préparations d'hormone gonadotrope (Brown, Steelman, Pohley 1953; Lamond, Claringbold 1958), la présence d'autres hormones telles que la prolactine (Brown 1956; Loraine, Diczfalusy 1958) les œstrogènes ou androgènes (Payne, Runser 1958), la présence de quinones (Ringler, Kliman 1958), l'hypophysectomie (Lamond, Emmens 1959) ou d'autres interventions chirurgicales (Mandl 1957).

Il existe de nombreuses mises au point de laboratoires adaptées aux nécessités du moment (Apostolakis, Voigt 1958). En raison de l'absence d'une substance de référence, ces tests sont périodiquement contestés et revus.

En 1956, Diczfalusy et Heinrichs ont récapitulé les différents tests biologiques à l'intention des cliniciens, tout en les rendant attentifs aux limites des dosages et aux erreurs inhérentes à leur emploi. En 1957, Borth (cf. aussi Borth, Linder, Lunenfeld 1959) se joint à ces deux auteurs, pour établir les bases statistiques sans lesquelles les tests biologiques et cliniques perdent une grande partie de leur valeur. C'est dire que la biologie seule ne donne pas les précisions désirées et qu'on doit recourir à la statistique pour apporter les corrections nécessaires (Gaddum 1953). En 1957 également, Claringbold et Lamond reconnaissent la nécessité de fixer rigoureusement les conditions expérimentales optimales.

Dans une série d'études, consacrées à la caractérisation biologique des gonadotropines, Albert et ses collaborateurs se sont toujours placés exactement dans les mêmes conditions. Ils ont établi des graphiques portant le poids des organes stimulés (ovaires et cornes utérines) en ordonnée et le logarithme de la dose (exprimée en UI, en mg ou en « unités par litre d'urine ») en abscisse. La courbe du poids de l'ovaire est toujours monophasique, celle des cornes utérines biphasique. Cependant, l'allure des courbes, ainsi que leurs pentes, sont nettement différentes suivant qu'il s'agit d'urine de femme enceinte, d'urine de femme ménopausique ou de « FSH hypophysaire » de moutons. Il est donc possible de reconnaître la provenance de l'échantillon testé et même d'en tirer quelques conclusions concernant les proportions éventuelles des hormones folliculo-stimulante et lutéinisante (cf. aussi Hamburger 1957 (fig. 2); Albert, Kelly 1958 a; 1958 b; Albert, Kelly, Kobi 1958; Albert, Derner 1960).

Dès qu'on quitte le domaine de la clinique pour suivre de près les étapes d'une extraction, vérifier le degré de pureté atteint, calculer le rendement de la méthode utilisée et surtout pour examiner la question du rapport FSH/LH, il est indispensable de tra-

vailler avec des animaux hypophysectomisés (APOSTOLAKIS, VOIGT 1958; BROWN 1959). La préférence a été donnée aux rats, en raison de leur plus grande sensibilité et de la moindre dispersion des résultats.

La comparaison des courbes d'étalonnage a permis de tirer des conclusions intéressantes : STEELMAN et POHLEY (1953) comparent le logarithme de la concentration en mg de différentes préparations au poids de l'organe stimulé (ovaires pour FSH; prostate ventrale de rats hypophysectomisés pour LH). Ils mettent principalement en évidence le degré de pureté atteint dans chaque cas. LAMOND (1958) étudie également différents produits commerciaux. (Une préparations de gonadotropines sériques et quatre préparations de gonadotropines chorioniques). La courbe, tracée en fonction du logarithme de la dose exprimée en UI, cette fois-ci, apporte un fait nouveau : l'allure de la courbe, établie avec le poids des cornes utérines est pareille pour les cinq produits testés. Il n'en est pas de même pour les courbes établies avec le poids des ovaires. On y distingue nettement deux familles. Or, il ne s'agit pas d'un comportement caractéristique des gonadotropines sériques ou chorioniques, puisque l'un des groupes, comprenant le Gestyl (PMS), l'Antuitrine S (PU) et le Primogonyl (PU), provoque une rapide et forte stimulation des ovaires.

C'est également au cours de travaux de recherche que plusieurs auteurs ont émis des doutes quant à la théorie dualiste pure. En 1950, HAMBURGER constate trois degrés de réaction en fonction de la dose injectée, en comparant ses propres résultats datant de 1935 avec ceux obtenus à la même époque dans un autre laboratoire.

Il n'est donc pas étonnant qu'un groupe de chercheurs (RAACKE, LORAINE, BODA, LI 1957) ait contesté les résultats de séparation des hormones FSH et LH obtenus par FRAHM et SCHNEIDER (1957). Dans la même publication, ce groupe a mis en garde tous les chercheurs contre des erreurs grossières d'interprétation, en rappelant et en confirmant les observations faites en 1940 (COLE, PENCHARZ, GOSS) : la nature de la réaction biologique aux gonadotropines est fonction de la dose injectée. C'est ainsi, par exemple, qu'une certaine préparation de gonadotropines sériques donne les résultats suivants :

< 1 µg : effet plus ou moins identique au ICSH hypophysaire
1 µg : effet folliculo-stimulant
> 1 µg : effet mixte, souvent ICSH prépondérant.

Le contrôle d'une série de produits provenant d'une expérience de séparation des gonadotropines peut faire croire que cette séparation a été obtenue, alors qu'en réalité les examens histologiques ne reflètent que différents seuils de réaction des gonades de l'animal ayant servi au test biologique.

TABLEAU 3

Stimulation du tractus génital de la femelle de souris impubère en fonction de la dose administrée et étude histologique des ovaires

UI * Inj.	Physex						Anteron					
	ovaires			cornes utérines		vagin	ovaires			cornes utérines		vagin
	FSH	LH	Foll. hém.	oestr.	progest.		FSH	LH	Foll. hém.	oestr.	progest.	
0,25	0	0	0	—	—	fermé	0	0	0	—	—	fermé
0,5	±	0	0	—	—	»	0	0	0	—	—	»
1	+	0	0	±	—	ouvert	± 0	0	0	—	—	»
2	+	0	0	+	—	»	+ (φ)	0	0	—	—	ouvert
4	++	± 0	0	+++	—	»	+ (φ)	0	0	+	—	»
8	++	++	+	++	—	»	+ (φ)	0	0	++	—	»
16	++	++	+	++	++	»	++	± 0	0	++	++	»
32	++	+++	+++	—	++	»	+++	++	++	—	++	»
64	++	++++ (T. I. lut.)	++	—	+++	»	++++	++	++	—	+++	»

* Injectées au total par ml et par souris

Foll. hém. = follicules hémorragiques; T. I. lut. = tissu interstitiel lutéinisé; φ = dans les limites physiologiques; oestr. = réact. oestrogénique; progest. = réaction progestative.

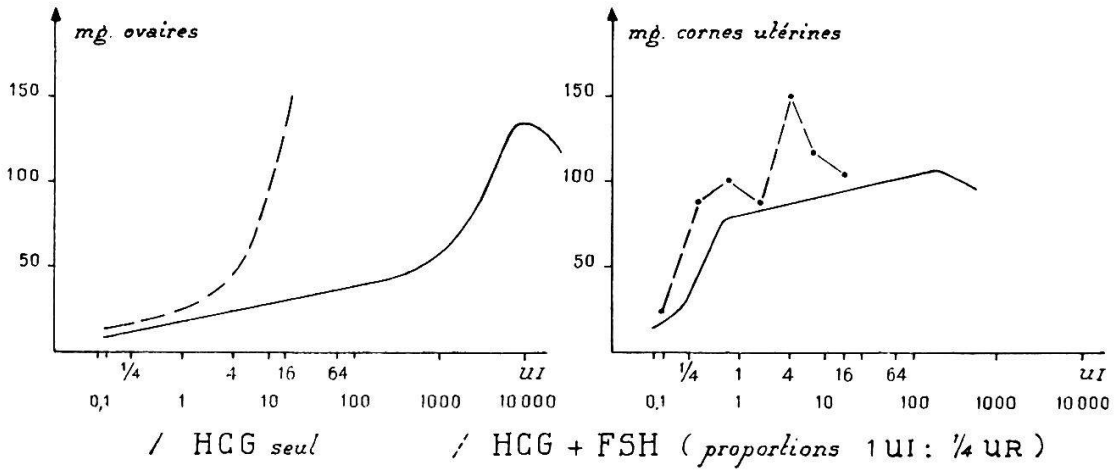


FIG. 2. — Stimulation pondérale des ovaires (monophasique) et des cornes utérines (biphasique) après administration de gonadotropines chorioniques soit seules soit associées à du FSH. (Selon HAMBURGER 1957)

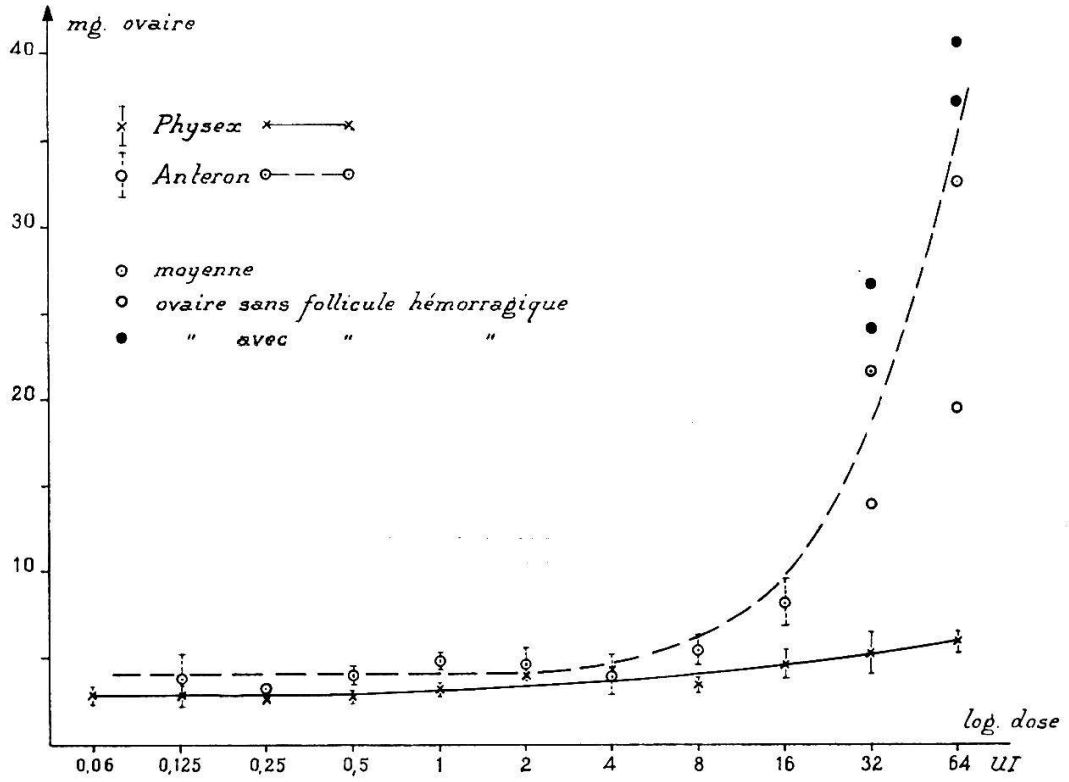


FIG. 3. — Test pondéral de l'ovaire de femelles de souris impubères recevant des doses croissantes de gonadotropines chorioniques (Physex) et sériques (Anteron).

3) CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACTION DES GONADOTROPINES

Nos expériences ultérieures exigeaient l'établissement des courbes d'étalonnage avec les produits commerciaux de notre choix (Physex, PU de LEO; Anteron, PMS de SCHERING). Ces substances sont obtenues facilement et l'on peut supposer que leur composition est relativement constante. Pour les tests biologiques nous uti-

lisons des souris. Les essais faits avec des mâles se sont avérés insatisfaisants. Nous avons donc choisi des *femelles impubères âgées de trois semaines, pesant entre 6 et 9 g* et *sevrées la veille de la première injection.* Comme le poids des ovaires est relativement dispersé chez les souris, nous avons complété les résultats pondéraux, exprimés en mg et en mg %, par l'étude histologique des ovaires coupés en série (fig. 3 et tableau 3).

La différence frappante de l'allure des deux courbes s'explique par la composition respective en FSH/LH des deux gonadotropines envisagées. Le Physex, en tant que gonadotropine chorionique, contient principalement l'hormone lutéinisante; le poids de l'ovaire n'augmente que lentement. L'Antéron, en tant que gonadotropine sérique, contient en plus de l'hormone lutéinisante, de la folliculo-stimuline en quantités appréciables, qui provoque rapidement une forte augmentation pondérale de l'ovaire. A première vue il semble donc qu'on puisse mesurer l'hormone folliculo-stimulante. Or l'étude histologique nous offre un résultat beaucoup plus détaillé et légèrement différent.

Aux faibles doses, on observe pour les deux courbes d'étalonnage une stimulation de la croissance folliculaire. Le Physex touche la presque totalité des follicules, alors que l'Antéron provoque la croissance d'un certain nombre seulement de follicules, restant ainsi dans des normes physiologiques. Le réveil secondaire de l'hypophyse est aussi différent. De plus, les follicules hémorragiques, formations pathologiques qui témoignent d'un déséquilibre hormonal, font leur apparition à des doses bien plus élevées dans le cas de l'Antéron. Ce détail suggère que l'animal est plus sensible aux déséquilibres du rapport FSH/LH qu'à la quantité totale des gonadotropines circulantes. Même à des taux globaux ayant dépassé les limites physiologiques supérieures, les gonades peuvent répondre par une réaction physiologique, si le rapport FSH/LH se rapproche encore de la norme.

II. ASPECT CHIMIQUE

1) Constitution chimique des gonado-stimulines

On peut classer les gonadotropines parmi les gluco-muco-protéines. Leur composition chimique exacte n'est encore que partiellement connue et son approche s'est avérée très difficile.

En 1940, Li, Simpson et Evans ont isolé du FSH et ICSH à partir d'hypophyses de porcs et de moutons et déterminé certaines constantes physico-chimiques. En 1942, Gurin a annoncé la découverte de groupes caractéristiques, bien définis, se rapportant à la partie glucidique et à la partie protéique de la molécule :

— Les gonadotropines hypophysaires contiendraient surtout du mannose, avec un rapport $\frac{\text{hexose}}{\text{hexosamine}}$ d'environ 1.

— Les gonadotropines présentes en cas de grossesse, gonadotropines sériques et chorioniques, contiendraient plutôt du galactose. La valeur du rapport $\frac{\text{hexose}}{\text{hexosamine}}$ se rapprocherait de 2.

En 1948, Claesson, Hogberg, Rosenberg et Westman publient une méthode permettant d'obtenir l'hormone chorionique à l'état cristallin. Mais leurs conclusions étaient prématurées.

Il faut reconnaître que toutes les anciennes tentatives d'isoler l'une ou l'autre des deux activités biologiques à l'état pur ont échoué, surtout lorsqu'on part d'extraits urinaires. La conséquence en a été une reprise complète des travaux de purification, depuis quelques années, ce qui, à son tour, a entraîné une revision systématique des constantes physico-chimiques et des constituants chimiques. En effet, les données anciennes pouvaient aussi bien se rapporter à la molécule hormonale qu'aux impuretés indéterminées dont on n'avait pu la séparer. Vraisemblablement des erreurs assez grossières ont été commises. Cette même remarque peut être faite à propos des dosages des différents acides aminés. Il n'est pas certain que les taux trouvés soient corrects, et la séquence des divers chaînons reste inconnue. D'ailleurs, Li note que les résultats varient suivant les laboratoires et les méthodes utilisées (Li 1949; Li, Harris 1952). Cependant, cette observation n'annule d'aucune façon les différences spécifiques des espèces, qui, elles, sont réelles (Li 1960). Il est alors intéressant de regrouper quelques constantes physico-chimiques et d'établir des comparaisons entre les différents types de gonadotropines (tableaux 4 a - d).

Un fait se dégage de ces résultats : il semble que, plus on dispose de nouvelles techniques, d'appareils perfectionnés pour pousser la purification des gonadotropines, plus le poids moléculaire se révèle être bas. Il passe d'environ 100 000 à environ 30 000. En outre, Squire et Li (1958; 1959) ont observé que l'hypophyse de mouton contient deux hormones lutéinisantes : α-ICH et β-ICH. Ces faits rappellent singulièrement les observations faites au cours des recherches sur l'ACTH. Cette autre stimuline d'origine hypophysaire paraissait homogène, entre autres, à l'ultra-centrifugation et à l'électrophorèse. Son poids moléculaire, initialement fixé à 20 000, est vraisemblablement inférieur à 10 000; certains chercheurs le situent autour de 2000. Or, le poids moléculaire des polypeptides est de l'ordre de 4 à 5000. Finalement, on a dû reconnaître que l'hormone corticotrope à proprement parler, c'est-à-dire la partie biologiquement active, n'est, en réalité, rien d'autre qu'un contaminant mineur de la molécule protéique, initialement isolée. Ac-

tuellement, il semble que l'on doive même admettre l'existence de plusieurs substances à activité adréno-corticotrope.

En ce qui concerne le poids moléculaire des gonadotropines, il faut mentionner les expériences faites avec le sérum de jument gravide (Bourrillon, Got 1959; 1960). Les mesures ont été effectuées d'abord dans l'eau, puis répétées dans du NaCl 0,1 M. On constate que, si la constante de sédimentation ne varie pas, la constante de diffusion, elle, passe de 10,2 à 4,2. Par conséquent, le poids moléculaire est ramené de 28 000 à nouveau à 68 500.

Les conclusions qu'on tire de ces études sont très hypothétiques. Après avoir imposé l'idée que la gonado-stimuline est une grosse molécule de glucoprotéine, on pense de plus en plus que cette gluco-muco-protéine n'est que le véhicule d'une petite molécule active, qui y est intimement accrochée (Klingsoyr, Stöa 1955; Johnsen 1955 b; Brown 1956; Bourrillon, Got 1957). Même Li, qui pourtant a isolé des gonadotropines hypophysaires, et qui a obtenu des degrés de pureté extrêmement élevés, se demande si les deux activités, FSH et ICSH, du sérum de jument gravide ne sont pas, finalement, inhérentes à une molécule unique.

Ici les théories unicistes et dualistes s'affrontent. Partant de l'idée d'un « véhicule protéique », on peut imaginer soit une seule liaison chimique avec l'une ou l'autre des particules actives (dualistes), soit, au contraire, l'existence de deux liaisons chimiques sur le véhicule permettant la présence simultanée de deux activités biologiques (unicistes).

Un fait est certain. Les critères de l'homogénéité de la molécule, tels que les fournissent l'électrophorèse et l'ultra-centrifugation, sont insuffisants; ils ne sont pas capables de mettre en évidence les constituants des mélanges de substances dont la liaison est extrêmement intime. Enfin, une autre question se pose : Peut-on réellement, du point de vue chimique, comparer entre elles les gonadotropines extraites d'hypophyses, de sérum ou d'urine ?

2) Stabilité des gonado-stimulines

On s'est aperçu très tôt, et au cours des nombreuses recherches de purification, que les gonadotropines étaient d'autant moins stables que leur degré de pureté est plus élevé. Cette fragilité est spécialement prononcée lorsque les substances sont mises en solution. Pourtant, plus la solution est concentrée, plus elle a de chances de conserver son activité. Ceci s'observe aussi bien pour les gonadotropines chorioniques que sériques. Legault (1960) note que plus les préparations de gonadotropines sériques sont riches, plus elles sont fragiles. Cependant, l'inactivation lente peut varier d'une préparation à l'autre, sans que l'on sache exactement pourquoi. La

TABLEAU 4

a-d : *Constantes physico-chimiques des gonadotropines indiquées par différents auteurs*

a) *Extraits hypophysaires de mouton*

	FSH		ICSH		
Auteurs	1949; 1952 LI; LI, HARRIS	1959 STEELMAN, SEGALOFF	1948 LI, EVANS	1958 SQUIRE, LI	1959 WARD, MC GREGOR, GRIFFIN
PM	70 000-67 000	25-30 000	40 000	30 000 (α et β ICH)	28 000 $\pm$ 4 000 (LH_2)
p. i. e.	4,5	5	4,6	7,3	
Const. de sédiment.	4,3 S		3,6 S	2,47 S	2,32 $\pm$ 0,07
Const. de diffusion				$7{,}54 \times 10^{-7}$	

b) *Extraits hypophysaires de porc*

	FSH		ICSH	
Auteurs	1954 STRAN, JONES	1956; 1959 STEELMAN, KELLY et al.; STEELMAN, SEGALOFF	1948 LI, EVANS	1954 STRAN, JONES
PM		29 000	100 000	90 000
p. i. e.	4,8	5,1 - 5,2	7,45	7,45
Const. de sédiment.		2,49 S	$5{,}4 \times 10^{-13}$	
Const. de diffusion		$7{,}43 \times 10^{-7}$		

présence d'autres protéines, ainsi que l'état brut du produit, agissent comme protecteurs de la gonado-stimuline contre l'inactivation spontanée.

Parmi les agents d'inactivation, on peut distinguer d'une part les ferments et d'autre part des agents physico-chimiques.

TABLEAU 4 (suite)

c) *Extraits de sérum de jument gravide (PMS)*

Auteurs	1942 GURIN	1949 LI	1959 BOURRILLON, GOT (dans l'eau)	1960 BOURRILLON, GOT (dans NaCl 0,1M)	1960 LEGAULT
PM	100 000		28 000	68 500	60 000
p. i. e.	2,9-3	2,6-2,65	1,8		
Const. de sédiment.			3 S	3,7 S	$3,75 \times 10^{-13}$
Const. de diffusion			$10,2 \times 10^{-7}$	$4,2 \times 10^{-7}$	

d) *Gonadotropines humaines*

	ICSH*	Gonadotropines chorioniques (HCG)			Gonadotropines hypophysaires (HMG)	
Auteurs	1960 LI	1949 LI	1954 STRAN, JONES	1959 GOT	1953 BUTT, DERIAS	1959 SEGALOFF, STEELMAN EVERETT, FLORES
PM		100 000	60-80 000	30 000		30 000
p. i. e.	$< 7,3$	3,2-3,3	3,2-3,3	2,9-3	$< 4,5$	
Const. de sédiment.	2,14 S	4,3 S		2,7 S		
Const. de diffusion		$4,4 \times 10^{-7}$		$8,2 \times 10^{-7}$		

* extrait d'hypophyses humaines.

a) *Les ferments :*

En 1939, CHOW, GREEP et VAN DYKE observent que les gonadotropines extraites de l'hypophyse de porc perdent leur activité biologique au contact d'enzymes. Il semble que l'hormone folliculo-stimulante résiste mieux que l'hormone lutéinisante. Ces observations sont confirmées par LI dans une étude systématique effectuée avec des solutions d'hormones à différentes concentrations en présence de carboxypeptidase cristallisée, de chymotrypsine cristallisée, de la trypsine commerciale et cristallisée, de papaïne et de pepsine

cristallisée (Li, Evans 1948; Li 1949). A l'exception de la pepsine cristallisée, les enzymes utilisées font disparaître l'hormone lutéinisante en premier. L'hormone folliculo-stimulante semble plus spécialement résistante à la digestion de la trypsine commerciale. Cette propriété a été exploitée en vue d'une éventuelle séparation des deux facteurs FSH/ICSH par destruction quasi-sélective de l'hormone lutéinisante (Fraenkel-Conrat, Simpson, Evans 1940 ; Mc Shan, Meyer 1940; Drescher 1954).

Plus récemment, Bourrillon, Got et Marcy (1959) ont soumis la gonadotropine chorionique à l'action d'une série d'enzymes (protéolytique, glycolytique, ptyaline) et déterminé le pourcentage de récupération de l'activité biologique à la suite d'hydrolyses de durée variable, allant jusqu'à 22 heures. Après avoir examiné la cinétique de l'hydrolyse et de l'inactivation de l'hormone, ils concluent qu'il y a toujours destruction des gonadotropines, mais les courbes ne se superposent pas toutes. Il existe donc une caractéristique enzymatique qui se traduit par une inactivation plus ou moins rapide.

La gonadotropine sérique est également détruite par les enzymes protéolytiques, l'émulsine et la ptyaline.

b) *Les agents physico-chimiques :*

1° *L'influence de la température.* — On a pris l'habitude de travailler autant que possible dans des chambres froides et de stocker les substances à l'état sec à —20° C, car la thermolabilité des gonadotropines, et plus spécialement de l'hormone lutéinisante est considérable. Signalons que Guyénot (1941, 1946), ayant observé la destruction sélective de l'hormone lutéinisante par la chaleur, a exploité ce phénomène pour mettre en évidence les deux hormones folliculo-stimulantes.

Li (1949) a mesuré la thermolabilité des gonadotropines chorioniques et sériques et exprimé globalement le pourcentage de perte

Tableau 5

Perte d'activité des solutions de gonadotropine en fonction de la température et de la durée du chauffage (selon Li, 1949).

Température	PU conc : 1% — pH : 6,3		PMS conc : 1 UI/ml
	5 min.	15 min.	30 min.
60 °C	0 %	0 %	0 %
60,7 °C	0	34	—
62,5 °C	35	65	—
65 °C	50	76	—
70 °C	—	—	25 (moyenne)
80 °C	—	—	68 (moyenne)
100 °C	—	—	100

d'activité, sans se préoccuper de savoir si l'une ou l'autre ou les deux hormones étaient diminuées (tableau 5).

2° *L'effet de dilution.* — Li (1949) signale des fluctuations considérables dans les résultats provenant de différents laboratoires. Lui-même observe qu'une solution aqueuse à 0,1 mg/ml de gonadotropines sériques garde son activité pendant 2 jours à 37° C, alors que seulement 50 % persistent dans une solution d'acétate à pH 4,5 et conservée dans les mêmes conditions. Par contre, Cole a constaté que l'activité reste inaltérée pendant 5 mois, à condition de garder la substance entre 0° C et 4° C (Cole, Goss, Boda 1950).

En revanche, les solutions diluées de gonadotropines chorioniques sont rapidement détruites, même à 0° C; les solutions concentrées sont plus stables (Li 1949). Il en est de même pour les gonadotropines de sérum humain. Elles gardent leur activité à l'état congelé et la perdent après 15 jours à 0° C en solution diluée (Antoniades, Pennel, Mc Arthur, Ingersoll, Ulfelder, Oncley 1957).

3° *L'influence du pH.* — Morris (1955) complète ces données. D'après ses observations, une solution à 0,2 %, stockée à 0° C, reste active pendant 8 jours entre les pH 3 et 11, mais pendant 18 heures seulement aux pH 1 et 13.

Tout en confirmant les anciennes observations, Got (1959)) a tenté de préciser cette perte d'activité et de démontrer l'influence que pouvaient exercer plusieurs facteurs extérieurs sur la récupération de l'activité biologique. Des solutions aqueuses ou tamponnées à pH 7,2, ayant une concentration de 0,1 mg/ml perdent pratiquement 70 % de leur activité après une semaine et la totalité après deux semaines. De plus, aux pH de 2 et de 12, un traitement de six heures seulement suffit pour diminuer l'activité de 30 %.

Il ressort que toutes les gonodotropines sont sensibles aux pH extrêmes, mais ce sont surtout les excès d'acides qui sont néfastes.

4° *Effets secondaires.* — Selon certains auteurs, même la *lyophilisation* entraînerait une diminution de l'activité de la gonadotropine sérique (Li, Simpson, Evans 1940). Ce procédé toucherait aussi l'activité de l'hormone folliculo-stimulante (Li, Pedersen (1952). Steelman et Segaloff (1959) rendent attentif au fait que l'état lyophilisé des gonadotropines, aussi bien FSH que ICSH, ne constitue pas une garantie de leur stabilité lors du stockage.

Dans d'autres conditions d'expériences, Taubert et Weller (1956) évaluent la perte d'activité après *élution* et *précipitation* des gonadotropines à au moins 10 à 15 %.

Schneider et Frahm (1961) ont décrit une perte de l'activité, consécutive à l'*électrophorèse,* relativement forte dans le cas des gonadotropines chorioniques et faible ou nulle dans le cas des gonadotropines sériques. Les auteurs ne font pas le rapprochement

avec la composition des gonadotropines, respectivement avec la plus grande fragilité de l'hormone lutéinisante.

c) *Contribution à l'étude de la stabilité :*

Dans le cadre de nos recherches, il s'est avéré nécessaire de vérifier biologiquement l'inactivation des gonadotropines par la chaleur, l'inactivation spontanée des solutions aqueuses (physiologiques) abandonnées à la température ordinaire et l'inactivation après simple passage sur une colonne de chromatographie.

1° *Inactivation par la chaleur.* — La première série d'expériences a confirmé la thermolabilité de l'hormone lutéinisante. Des solutions à concentrations croissantes de Primogonyl (PU) et d'Anteron (PMS) ont été chauffées une demi-heure à 70° C. Les différences pondérales des ovaires de souris ne sont significatives qu'aux fortes doses de 64 UI et dans le cas de l'Anteron seulement. En revanche, l'inactivation sélective est mise en évidence par l'étude histologique. Les résultats sont résumés dans le tableau 6.

L'hormone lutéinisante n'a vraisemblablement pas été entièrement détruite. Par ailleurs, il n'est pas exclu d'attribuer en partie l'activité résiduelle à l'hypophyse de l'animal, stimulée indirectement par les injections. Seule une expérience sur souris hypophysectomisées peut trancher cette question. De toute façon, une activité lutéinisante n'apparaît, dans la série du Physex chauffé, qu'aux doses totales de 64 UI. Dans cette même série, on est également frappé de ce que la puberté précoce n'est pas encore provoquée par la dose de 16 UI de la solution chauffée, alors que 1 UI d'une solution fraîche entraîne déjà l'ouverture vaginale. De plus, on note la présence exceptionnelle d'un seul follicule hémorragique dans un seul ovaire d'un lot comprenant quatre bêtes ayant reçu 64 UI de Physex chauffé, alors qu'il n'est pas rare d'en compter plusieurs à 16 UI d'une solution fraîche.

2° *Inactivation spontanée des solutions aqueuses.* — Des solutions d'Anteron (PMS) ont été gardées à température ordinaire (24° C) et testées après 5, 15 et 18 jours. Nous n'avons pas observé de différences significatives quant aux poids ovariens comparés à ceux des animaux témoins recevant des solutions fraîches de la même concentration. En fin d'expérience, tous les vagins sont ouverts. Seule l'étude histologique révèle une différence de la réaction des ovaires (cf. tableau 7).

TABLEAU 6 : Comparaison de l'activité des solutions a) de Primogonyl (PU) et b) d'Antéron (PMS) à différentes concentrations, après chauffage ou non. Test pondéral de l'ovaire de la femelle de souris impubère et étude histologique des ovaires (p. 285).

a) PRIMOGONYL

Critères	1 UI	4 UI	16 UI		64 UI
		SOLUTIONS FRAICHES			
vagin	ouvert	ouvert	ouvert		ouvert
poids ov. (mg)	3,2 ± 0,7	4,2 ± 0,4	4,7 ± 0,6		5,7 ± 0,5
action FSH	± 0	++	++		±
action ICSH	0	± 0	++		++
foll. hem.*	0	0	1 à 2/ovaire		+++
lutéinisation	—	rares faux c.j.*	qq pseudo-c.j. T. I. ± normal		pseudo-c.j. T. I. lutéinisé *
		SOLUTIONS CHAUFFÉES			
vagin	fermé	fermé	fermé		ouvert
poids ov. (mg)	3,4 ± 1,1	3,9 ± 0,5	4,4 ± 1,2		5,7 ± 2,6
action FSH	0	0	±		++
action ICSH	0	0	0		± (hypophyse)
foll. hem.	0	0	0		1 exceptionnel
lutéinisation	—	—	—		T. I. + hypertrophié

b) ANTERON

Critères	1 UI	4 UI	16 UI	32 UI	64 UI
		SOLUTIONS FRAICHES			
vagin	fermé	ouvert	ouvert	ouvert	ouvert
poids ov. (mg)	4,7 ± 2	4,0 ± 1,1	8,1 ± 1,4	21,4 ± 6,7	32,5 ± 11,4
action FSH	± 0	+	++	+++	++++
action ICSH	0	0	± 0	++	++
foll. III	petits	grands (mûrs)	très grands (ovulation)	dentelle ± prélut.	dentelle
foll. hem.	0	0	0	nombreux	très nombreux (variable)
lutéinisation	—	—	T. I. ± normal	T. I. lutéinisé faux c. j. méroxanthosomes	T. I. lutéinisé faux c. j. pseudo-c. j.
		SOLUTIONS CHAUFFÉES			
vagin	fermé	ouvert	ouvert		ouvert
poids ov. (mg)	3,5 ± 0,4	4,6 ± 1	9,2 ± 1,6		19,1 ± 3,9
action FSH	0	++	+++		++++ (dentelle)
action ICSH	0	0	± 0		+ (hypophyse)
foll. hem.	0	0	0		0 ou 3 à 4
lutéinisation	—	—	—		qq. faux c. j. T. I. vascularisé

* foll. hém. = follicules hémorragigues c. j. = corps jaunes T. I. = tissu interstitiel

TABLEAU 7

Etude de l'inactivation de solutions d'Anteron (PMS) à différentes concentrations, gardées 15 et 18 jours à 24°C. Aspect histologique des ovaires de femelles de souris impubères.

Solutions	Eléments ovariens observés	18,75 UI	37,5 UI	75 UI
fraîches *	foll. III foll. hém. ** lutéinisation	rares (1 à 2)	+++ quelques pseudo-c. j. thèques ± T. I. lutéinisé	+++ nombreux (variables) pseudo-c. j. méroxanthosomes thèques + T. I. ± lutéinisé
après 15 jours	foll. hém.	0	rares	quelques
après 18 jours	foll. III foll. hém. lutéinisation	0	+++ quelques qq. faux c. j. T. I. normal	+++ quelques qq. faux c. j. T. I. normal

* Voir tableau 6 b.

** Même abréviation que pour le tableau 6.

3° *Inactivation au cours de la chromatographie.* — Ne travaillant pas en chambre froide, il nous importait de savoir si le simple passage des gonadotropines à travers un matériel d'adsorption maintenu à la température du laboratoire pouvait causer une inactivation de l'hormone. 5000 UI d'Anteron (PMS) ont été déposées sur une colonne de phosphate tricalcique et éluées selon la méthode de CROOKE, BUTT, INGRAM, ROMANCHUCK (1954). La totalité des éluats a été lyophilisée, puis diluée de façon à obtenir des solutions équivalant à 8 UI, 16 UI et 32 UI/ml, si l'on admettait une récupération de 100 %. Ces solutions, ainsi que des solutions fraîches, titrant exactement 8 UI, 16 UI et 32 UI/ml, ont été injectées à des souris femelles impubères (tableau 8).

Chez les témoins, les ovaires pèsent environ 4 mg et les cornes utérines 10 mg. Pour compléter cette étude, il aurait fallu déterminer également la dose effective minimale.

Les résultats des deux séries parallèles, comprenant trois lots de sept bêtes, sont très dissemblables. La différence d'activité avant et après passage de la colonne de chromatographie est plus particu-

TABLEAU 8

Comparaison de l'activité biologique de solutions d'Anteron (PMS) à différentes concentrations, soumises ou non à la chromatographie. Tests pondéraux et apparitions des follicules hémorragiques.

Critères	8 UI	16 UI	32 UI
SOLUTIONS FRAICHES			
vagin	ouvert ou s'ouvrant	ouvert	ouvert
poids ovarien (mg)	9,6 ± 2,3	20,7 ± 5,5	18,9 ± 4,3
poids : cornes utérines (mg)	50,3 ± 6,2	47,7 ± 7,3	47,0 ± 7,3
follicules hémorragiques	rares : 1 bête à 1 1 bête à 2	peu : 2 bêtes à 2 1 bête à 3	nombreux : 5 à 6 par bête
SOLUTIONS CHROMATOGRAPHIÉES			
vagin	ouvert ou s'ouvrant	ouvert	ouvert
poids ovarien (mg)	5,6 ± 1,3	11,8 ± 2,5	15,5 ± 3,4
poids : cornes utérines (mg)	47,1 ± 7,2	38,7 ± 3,8	37,9 ± 4
follicules hémorragiques	0	2 bêtes à 2	5 à 6 par bête

lièrement prononcée aux doses inférieures. L'inactivation de l'hormone lutéinisante est importante.

Cependant la diminution effective globale de l'activité biologique, évaluée à environ 50 %, est due d'une part à l'inactivation spontanée de l'hormone, d'autre part à une perte de substance au cours des manipulations (p. ex. fixation sur la colonne).

d) *Conclusions :*

Déjà en 1942, EVANS et SIMPSON avaient reconnu que, pour avoir une action biologique complète, il fallait que les parties glucidiques et protéiques soient intactes (« intégralité de la molécule » indispensable). Il existe donc un lien très étroit entre l'état de la molécule et son activité.

On peut affirmer que, de façon générale, l'activité lutéinique disparaît plus rapidement que l'activité folliculo-stimulante. C'est d'ailleurs également l'hormone lutéinisante, plus labile, qui, lors de traitements expérimentaux ou cliniques prolongés, subit la première les effets de l'accoutumance.

De plus, il est bien connu que des traces de l'hormone lutéinisante exercent une action synergique sur la stimulation pondérale des organes du tractus génital, puisque cette propriété est mise à profit dans le « test du FSH ». Dès lors, on comprend qu'un abaissement du taux de l'hormone lutéinisante active de la gonadotropine chorionique se fait bien plus sentir que la même inactivation de ce facteur dans un mélange de gonadostimulines tel que l'Anteron (PMS).

B. DEUXIÈME PARTIE

I. EXTRACTION DES GONADOTROPINES

Il est évident que ni les exigences, ni les problèmes à résoudre, ne sont les mêmes, suivant qu'on procède à l'extraction des gonadotropines en vue d'un dosage clinique, ou dans un but de recherche pure, tel que l'établissement d'un standard ou l'étude de la constitution de la molécule.

Nous retiendrons principalement ce qui se rapporte aux dosages cliniques (cf. Loraine 1958). Il est bon d'en rappeler quelques conditions techniques :

a) pour qu'un dosage soit valable, il faut que l'extraction soit quantitative et reproductible ;

b) les extraits, souvent très concentrés, ne doivent pas être toxiques (tests biologiques) ;

c) ils ne doivent pas contenir des stéroïdes contaminants qui pourraient fausser complètement les résultats (test pondéral de la stimulation des cornes utérines) ;

d) la méthode choisie doit être simple, rapide et peu coûteuse.

N'oublions pas enfin qu'en raison de leurs taux élevés, il est beaucoup plus facile de choisir une méthode d'extraction satisfaisante pour le dosage des gonadotropines chorioniques que pour les gonadotropines hypophysaires humaines, dont les taux normaux sont très bas (10 — 60 UI/24 h). De ce fait, les quantités de ces dernières contenues dans un litre d'urine, respectivement dans l'urine de 24 heures, sont parfois insuffisantes.

Il est très important de pouvoir se fier aux méthodes d'extraction, puisque l'erreur globale introduite par les tests biologiques peut atteindre 30 à 50 % (il faudrait travailler avec 40 à 80 bêtes pour abaisser l'erreur à 10 %). Non seulement des variations individuelles et raciales interviennent, mais encore le régime alimentaire (Heinrichs, Eulefeld 1960) et, pour une grande part, également la saison à laquelle les tests sont entrepris (Loraine 1957). Il n'est pas inutile de rappeler ces faits, car les fluctuations quan-

titatives des gonadotropines, observées au cours du cycle œstral de la femme, ont parfois été mises en doute par certains auteurs qui les ont attribuées à une mauvaise reproductibilité de la méthode d'extraction choisie (ALBERT, KELLY, SILBER, KOBI 1958 a; MC ARTHUR, WORCESTER, INGERSOLL 1958; BROWN 1958). Actuellement, la physiologie hormonale semble bien établie et avoir confirmé l'existence d'un maximum d'excrétion à mi-cycle (BORTH, LUNENFELD, DE WATTEVILLE 1957; BROWN, KLOPPER, LORAINE 1958).

1) MÉTHODES D'EXTRACTIONS A BUT CLINIQUE

a) *Précipitation alcoolique ou acétonique :*

C'est une des plus anciennes méthodes connues (ZONDEK 1931; KLINEFELTER, ALBRIGHT, GRISWOLD 1943, LORAINE 1949). A l'heure actuelle on lui préfère d'autres techniques. Elle présente plusieurs inconvénients, entre autres la toxicité des produits et parfois la présence d'œstrogènes. Des purifications (par exemple par dialyse) entraînent une trop grande perte de matériel, dont le facteur correctif ne peut être calculé avec précision. Par conséquent, cette méthode n'est utilisable que pour des tests de grossesse.

Dernièrement le principe de la précipitation a été repris dans un travail d'intérêt scientifique pur sur les gonadotropines urinaires de castrats et de femmes postménopausiques (BOURRILLON, GOT, MARCY 1960). Les chercheurs ont préconisé l'utilisation de la précipitation alcoolique suivie d'une deuxième extraction au kaolin. Ils constatent que le rendement final, ainsi que l'activité spécifique, sont supérieurs à ceux obtenus avec de l'urine traitée directement par le kaolin.

b) *Ultrafiltration :*

Cette technique avait été proposée par GORBMAN (1945). Elle a été réutilisée par VAN GILSE (1955 ; 1957), qui a déterminé un rendement de 80 à 90 %. Mais la confection de la membrane de collodion, dont dépend le succès de l'extraction, est très délicate. De plus, des vérifications ont prouvé qu'elle n'éliminait pas complètement les œstrogènes (DEMOLE, FANARD, BOUTE, LEFÉBURE, SOÈTE 1957 ; DEMOLE, FANARD, SOÈTE, VERVISCH 1957).

c) *Adsorption sur différentes matières (à l'exception du kaolin) :*

Pour extraire des gonadotropines chorioniques, KATZMAN, GODFRIED, CAÏN, DOISY (1943) proposent l'adsorption sur *permutite,* suivie d'une élution par l'ammoniaque et d'une précipitation fractionnée à l'alcool. D'autres auteurs (WODON, DUSTIN, BIGWOOD 1951 ; BIGWOOD, WODON 1952) ont modifié cette technique. Ils ont remplacé le permutite par une *bougie Chamberland.* Ces méthodes n'ont pas retenu l'attention générale, et les meilleurs résultats ont finalement été obtenus par l'adsorption par l'*acide benzoïque,* substrat déjà signalé par KATZMAN et DOISY en 1934. La technique originale a souvent été modifiée et comparée à l'adsorption sur kaolin.

BUTT (1957 ; BUTT, INGRAM 1957) estiment que le rendement de l'adsorption par l'acide benzoïque est de 80 % pour les gonadotropines hypophysaires. Il apparaît que l'acide benzoïque retient plus ou moins sélectivement l'hormone lutéinisante ; l'hormone folliculo-stimulante, présente dans l'urine de femme enceinte, peut être récupérée par l'adsorption ultérieure sur kaolin (BUTT, CROOKE, INGRAM, ROUND 1957). L'utilisation de l'acide benzoïque semble donc tout indiquée dans le cas des dosages cliniques des gonatropines chorioniques. Elle constitue également une excellente méthode lorsqu'il s'agit d'extraire les gonadotropines à grande échelle où l'extraction quantitative n'est pas absolument exigée (industrie).

L'extraction des gonadotropines hypophysaires de l'urine, par exemple de femme postménopausique, rencontre des difficultés sérieuses. L'acide benzoïque n'en retient que 7,2 à 10 %.

L'adsorption par l'*acide phénique,* bien qu'à rendement légèrement supérieur (29,5 %) et retenant plus de folliculo-stimuline que l'acide benzoïque, doit pourtant aussi être abandonnée, en raison du fait que la destruction de l'hormone lutéinisante est plus marquée qu'avec l'acide benzoïque et devient nettement appréciable (BUTT, INGRAM 1957).

Certains auteurs ont envisagé le remplacement de l'acide benzoïque par l'*acide tannique.* WALTER (1957) cherche à comparer l'adsorption des gonadotropines d'urine de femme postménopausique par l'acide tannique et sur kaolin ; la purification se fait par chromatographie sur colonne. Les difficultés d'établir des comparaisons valables sont flagrantes. Les auteurs observent des différences considérables pour la même méthode d'extraction, suivant le test biologique choisi ; utilisant le test de la prostate ventrale des rats hypophysectomisés, l'adsorption sur kaolin paraît leur donner un rendement plus élevé. JOHNSON (1958), non satisfait des résultats fournis par l'acide tannique seul, lui ajoute de l'Hyflo-Supercel. L'élution se fait par l'acétate d'ammonium. L'ensemble des manipulations ne prend pas plus d'une heure, ce qui serait parfait en vue d'un dosage clinique. Cependant, la récupération n'atteint, en moyenne, que 66 % malgré la faible quantité de matière inerte entraînée. Notons que ces expériences ont été effectuées avec des surcharges utilisant six fois la quantité normale excrétée par l'homme. Au cours de cette même étude, l'auteur a été en mesure de démontrer qu'une faible albuminurie déjà compromet l'extraction. On savait que les albumines, les globulines et les différentes muco-gluco-protéines acides insolubles gênent l'extraction, mais la quantité limite tolérable n'avait encore jamais été mesurée. JOHNSON limite les taux à 0,5 g par litre d'urine ; l'évaluation des gonadotropines est impossible dès que les albumines atteignent ou dépassent un gramme.

Certains groupes de chercheurs ont estimé que l'extraction par adsorption sur kaolin n'est pas quantitative et que l'élution, en milieu fortement alcalin, dénature les gonadotropines et plus particulièrement l'hormone lutéinisante. BUTT et CROOKE (BUTT 1958 ; BUTT, CROOKE, CUNNINGHAM 1958, 1959) ont mis au point une technique utilisant un *mélange d'acide tungstique et d'acide benzoïque.* L'activité spécifique du produit d'extraction est bonne. Ils comparent le rendement par tests biologiques, en attribuant un rendement de 100 % à la méthode au kaolin. Dans leurs essais, peu nombreux, la dispersion est énorme. Pour les gonadotropines totales, ils trouvent une moyenne de 163 % (81-320 %), et pour l'hormone folliculo-stimulante 157 % (65-410 %).

d) *Adsorption sur kaolin :*

La nécessité s'est fait sentir d'établir une méthode standard qu'adopteraient tous les laboratoires pour l'extraction des gonadotropines hypophysaires, en vue d'un dosage quantitatif permettant un diagnostic clinique. ALBERT et LORAINE se sont attaqués à ce problème. Il est regrettable de constater que ni l'une ni l'autre des deux méthodes proposées ne se soit encore imposée.

L'adsorption sur kaolin suivie d'une élution et d'une précipitation acétonique ou alcoolique, a constitué, finalement, la base même des extractions des hormones gonadotropes non chorioniques. Suivant les besoins, la poudre obtenue est soumise à une détoxication ou à une purification (SCOTT 1941 ; DEKANSKI 1949 ; BRADBURY, BROWN 1949 a ; 1949 b ; LORAINE 1950 ; BENARD, CRUZ-HORN, MOREAU, LALANDE, RAUBERT 1952 ; MC ARTHUR 1952 ; LORAINE, BROWN 1954 ; 1956, etc.). ALBERT (1955) utilise une chambre à pression et certains détails techniques diffèrent de ceux de LORAINE. Il est intéressant de noter que les essais de récupération à partir d'urines diluées se sont révélés bons, si l'on prend soin de ramener la densité de l'urine à 1,025 avec du NaCl. Toutefois, si l'émission quotidienne

dépasse cinq litres, l'extraction des gonadotropines devient impossible (ALBERT, SILBER 1957 ; ALBERT, ROSEMBERG 1959).

La technique d'ALBERT a été reprise par ALEXANDRITIS, APOSTOLAKIS et VOIGT (1958) et légèrement modifiée pour la rendre moins coûteuse. Une comparaison entre le rendement obtenu après précipitation alcoolique (très variable, plus de 200 %) et après adsorption sur kaolin (70-105 % ou 40-60 %, suivant le test biologique utilisé) parle en faveur de la méthode au kaolin, qui amène moins de matières inertes au stade final et qui est plus reproductible.

La méthode de LORAINE (LORAINE, BROWN 1954 ; LORAINE 1957 ; 1958 ; LORAINE,BROWN 1959), connue sous le nom « kaolin-acétone », insiste avant tout sur la nécessité de respecter les valeurs de pH indiquées au cours des différentes manipulations (adsorption, élution, précipitation). La détoxication se fait avec du phosphate tricalcique, soit dans un bécher, soit sur colonne. Les expériences de surcharge, doublant le taux normal des gonadotropines présentes dans l'urine, démontrent que la récupération moyenne atteint 76 % (52-92 %).

Récemment, HEINRICHS et EULEFELD (1960) ont consacré une étude à la comparaison des deux méthodes standards proposées. Ils donnent la préférence à celle d'ALBERT, dont les extraits sont environ trois fois plus concentrés, tout en étant moins toxiques que ceux obtenus par la méthode de LORAINE.

2) MÉTHODE D'EXTRACTION A BUT SCIENTIFIQUE PUR

Nous n'entrerons pas dans les détails concernant les préparations gonadotropes extraites à partir d'hypophyses animales (STEELMAN, SEGALOFF 1959) ou d'hypophyses humaines (LI, 1958; RIGAS, PAULSEN, HELLER 1958). Mais nous ne pouvons passer sous silence les études faites sur le plasma humain, d'autant plus que pour les tests de grossesse on préfère injecter aux animaux, dans certains cas, du sérum et non de l'urine.

L'intérêt de l'étude d'ATONIADES, PENNEL, MC ARTHUR, INGERSOLL, ULFELDER, ONCLEY (1957) n'est pas d'ordre clinique, puisque les auteurs partent de 300 litres de plasma et qu'ils cherchent à savoir si les deux activités biologiques sont liées à une ou deux molécules. Ils concluent que, même s'il y a deux molécules, leurs caractéristiques physico-chimiques (solubilité, etc.) paraissent identiques et liées aux γ-globulines, respectivement à la partie β-lipo-protéique.

A ce sujet, signalons les conclusions opposées du groupe de BOURRILLON. Au cours d'une étude sur le sérum de jument gravide tout se passe comme si les gonado-stimulines étaient principalement liées à l'α_2-globuline et, dans une moindre mesure, aux β- et γ-globulines (BOURRILLON, GOT, MARCY 1958).

Ce même groupe s'est donné pour tâche d'obtenir, à partir de gonadotropines chorioniques, l'hormone « HCG » à l'état pur, sans se limiter par les quantités d'urine nécessaires. Il ne s'est pas non plus préoccupé de l'hormone folliculo-stimulante volontairement éliminée progressivement en cours d'opération, et non récupérée. Le schéma de l'extraction comprend une première adsorption par l'acide benzoïque, suivie d'une extraction aqueuse à pH 4,5, d'une extraction hydro-alcoolique et d'une précipitation au point iso-électrique. Ce n'est qu'à ce stade-là que l'adsorption sur kaolin est in-

tercalée. Différentes chromatographies sur échangeurs d'ions représentent la partie de purification poussée, qui se termine par une électrophorèse sur amidon (Got 1959).

3) Expérience de récupération pondérale

Ayant eu connaissance du travail de Got (1959), fait à l'échelle industrielle, le Dr Neukomm nous a suggéré l'application de ce mode d'extraction pour étudier le rendement pondéral des différentes étapes, en partant de quantités d'urine ne dépassant pas le cadre clinique, et sans s'attarder aux tests biologiques. Sachant que les différentes muco-protéines urinaires peuvent entraver l'extraction des hormones protéiques et que la quantité, ainsi que la nature, de ces substances gênantes varient d'une récolte d'urine à l'autre, nous avons préparé une solution dont la composition se rapproche des normes urinaires. Son résidu sec est d'environ 54 grammes par litre. On prépare cinq litres de solution à la fois, laisse décanter une nuit et filtre avant l'extraction. Cette solution est appelée « urine synthétique » (tableau 9).

Tableau 9

Composition de l'urine synthétique (U. S.)

Substances	g/1000 ml	Observations
NaCl	15.0	
KCl	3.5	
$CaCl_2$	0.2	
$MgCl_2$	0.15	
Na_2HPO_4	3.0	certains phosphates précipitent
saccharose	1.5	à saturation
acides aminés libres (l-Tyrosine)	0.5	
protéines (γ-globulines bovines)	0.03	
urée	30.0	

Nous avons envisagé quatre séries d'expériences :

1) Extraction d'un « pool » d'urine d'hommes normaux.
2) Extraction d'un « pool » d'urine d'hommes normaux avec surcharge de gonadotropines.
3) Extraction de l'« urine synthétique ».
4) Extraction de l'« urine synthétique » avec surcharge de gonadotropines.

En vue de surcharges, on a mélangé de façon homogène 500 mg d'Antex lyophilisé (1 050 UI/mg) et 500 mg d'Anteron non lyophilisé (1 100 UI/mg). Ce mélange constitue notre stock de gonadotropines sériques. La surcharge, exprimée en activités biologiques, est énorme, puisque seule la récupération pondérale est en jeu. L'adjonction est uniformément de 20 mg par litre, soit 21 500 UI.

Nous avons toujours travaillé avec des parties aliquotes d'un litre. La solution à analyser est amenée au pH 4,5 en vue de l'adsorption par l'acide benzoïque en solution saturée dans l'acétone. Après filtration, le filtrat est, si possible, soumis à l'extraction « kaolin-acétone » selon LORAINE ; quant au résidu, il constitue l'extrait brut de gonadotropines après dissolution de l'acide benzoïque dans l'acétone. En raison du faible poids de nos extraits, seuls les trois premiers stades de la purification selon le schéma de GOT ont pu être effectués :

— extraction aqueuse par un tampon acétate de pH 4,5 et reprécipitation acétonique ;
— extraction hydro-alcoolique à pH 4,5 en amenant le titre d'alcool du liquide de dissolution à 55 % puis à 80 % ; on recueille une poudre blanche ;
— précipitation alcoolique au point iso-électrique, après dissolution du résidu précédent dans de l'acide acétique 0,5 N et à pH 3.

Tous les précipités sont lavés, puis séchés sous vide sur du chlorure de calcium.

Nous avons obtenu les même pourcentages que GOT et récupéré les mêmes quantités de substances en passant d'une étape à l'autre. Les résultats pondéraux sont résumés dans le tableau 10.

Cette étude a démontré qu'on récupère en moyenne 75% des 20 mg ajoutés à l'urine synthétique par l'extraction à l'acide benzoïque. Qu'il s'agisse des « pool-témoins » ou des témoins isolés de la deuxième série, les résultats obtenus avec l'urine d'homme sont beaucoup moins concluants.

Malheureusement cette impression s'accentue lorsqu'on compare les poids des extraits de la série témoin 1 avec la série 2 ayant reçu une surcharge d'hormone. Les variations d'un pool à l'autre sont énormes. Les rendements diffèrent à l'intérieur d'une même série lorsque les « 6 × 1 litre » n'ont pu être extraits le même jour. Vraisemblablement, les variations de température, de faibles écarts de pH, en sont responsables. Même en l'absence de tests biologiques, il est possible de conclure que le schéma original de GOT, excellent pour des études d'intérêt scientifique pur, n'est pas utilisable en clinique. Soulignons que l'auteur a dû procéder à 8 stades pour obtenir le facteur « HCG » hautement purifié.

II. PURIFICATION DES GONADOTROPINES

La simple extraction des gonado-stimulines est souvent insuffisante, car les produits obtenus, encore fortement contaminés par des protéines inertes, sont toxiques aux fortes doses pour les animaux. Des purifications successives se sont imposées surtout dans le cadre des recherches scientifiques. A cet effet, différents groupes de chercheurs ont utilisé des chromatographies et des électrophorèses, soit répétées, soit alternatives, soit combinées. A partir d'un

TABLEAU 10.

Expériences de surcharges dans de l'urine d'homme et de l'« urine synthétique ».
Résultats pondéraux des quatre premières étapes d'extractions d'un mélange de gonadotropines sériques.

Série d'expériences	Kaolin			Extraction à l'acide benzoïque			Extraction aqueuse			Extraction hydro-alcoolique			Précipité au P. I. E.		
	mg	Moyenne mg/l;	%	mg	Moyenne mg/l;	%	mg	Moyenne mg/l;	%	mg	Moyenne mg/l;	%	mg	Moyenne mg/l;	%
1.	170,7			345,0			35,3			23,5			19,7		
	180,2			296,0			30,1			18,9			16,5		
	231,8	*208*;	70 %	260,2	*296*;	100 %	32,6	*33,7*;	11,4 %	22,6	*22,8*;	67,5 %	18,9	*19,2*;	83 %
	218,9			282,7			44,3			29,2			23,7		
	238,3			*178,5* *			*26,5*			*20*			*17,3*		
	140,1			101,3			32,8			22,7			19,8		
	150,7	*157,8*;	150 %	103,9	*105,5*;	100 %	30,1	*35,7*;	34 %	19,5	*27,1*;	77 %	16,1	*19,6*;	72,5 %
	158,2			93,6			44,4			29,2			23,1		
	110,9			232,3			16,2			3,9			3,2		
	222,2			84,5			35,1			10,2			6,5		
2.	109,1			181,1			*6,8* *			*2,5*			*3,0*		
	152,6			312,5			36,8			19,8			—		
	279,7	*246,9*;	122 %	157,1	*202,1*;	100 %	35,8	*36,9*;	13,3 %	13,4	*13,4*;	36,5 %	9,5	*7,9*;	59 %
	388,8			143,9			25,3			10,1			7,2		
	304,0			185,7			41,9			11,1			7,1		
	223,1			122,8			28,9			9,7			6,9		
	218,9	*213,6*;	184 %	114,4			26,9			9,3			7,1		
	246,3			119,2	*116,7*;	100 %	37,7	*30,4*;	26 %	11,2	*9,8*;	32,5 %	7,7	*7,1*;	72,5 %
	—			116,5			29,7			9,4			7,2		
	—			110,7			29,1			9,4			6,8		

3.	—		19,3		0,2							
	—		25,1		0,6							
	—		25	*24*; 100 %	0,6	*0,6*; 2,5 %						
	—		26,5		0,7							
	—		23,9		0,2							
4.	31,3		39,5		5,2		2,7		1,8			
	37,0		40,8		5,6		2,9		1,4			
	35,1	*36,4*; 88 %	41,2	*41,4*; 100 %	5,6	*5,6*; 13,5 %	3,0	*2,8*; 50 %	2,0	*1,9*; 68 %		
	42,2		44,2		5,9		2,7		2,3			
	36,5		*21,3* *		*2,3*		*1,9*		*0,9*			

* Perte mécanique.

Composition des séries d'expériences

Série 1 : Extraction d'un « pool » d'urine (témoins I).
On a recolté d'abord cinq litres d'urine, puis trois litres de moindre densité. Dans cette série figurent aussi les deux témoins des groupes de la deuxième série.

Série 2 : Extraction d'un « pool » d'urine avec surcharge d'hormone gonadotrope sérique.
On a récolté six litres puis quatre litres d'urine. On prélève un litre de chaque groupe pour obtenir les valeurs témoins. 100 mg, respectivement 60 mg, du mélange de PMS sont ajoutés aux cinq, respectivement trois, litres restants.

Série 3 : Extraction de cinq litres d'« urine synthétique » (témoins II).

Série 4 : Extraction de cinq litres d'« urine synthétique » avec surcharge d'hormone gonadotrope sérique.
On ajoute 100 mg du mélange de PMS.

certain degré de pureté, les éluats provenant des chromatographies et des électrophorèses ont été soumis systématiquement à des analyses chimiques, complétées souvent par des tests biologiques. Les protéines ont été dosées principalement par leur absorption dans l'UV, par la ninhydrine et le Folin.

1) La chromatographie

a) *But clinique :*

En 1951, Swingle et Tiselius ont proposé l'utilisation du phosphate tricalcique comme matériel d'adsorption pour les protéines. Il est donc tout naturel que ce moyen-là ait servi à des essais de séparation des deux hormones gonadotropes (Butt, Crooke 1952; Butt, Crooke 1953; Crooke, Butt Ingram, Romanchuck 1954; Ingram, Butt, Crooke 1954).

Les résultats des premiers essais étaient concluants. Il semblait que le dosage clinique avait trouvé sa voie. Malheureusement, des études d'intérêt scientifique, permettant de travailler avec des quantités de gonadotropines plus importantes, ont indiqué clairement l'erreur des conclusions hâtivement tirées (Butt 1955).

Lors des premières expériences, les colonnes de chromatographies étaient éluées d'abord par du Na_2HPO_4 (0,002 M), donnant un pic « GA », puis par du Na_3PO_4 (0,02 M), donnant un second pic, « GB ». Sur des extraits bruts, la séparation en deux zones brunes pouvait être suivie à l'œil. Les vérifications par la ninhydrine étaient bonnes. L'urine de femme enceinte fournissait un faible pic « GA » à activité folliculo-stimulante, et un pic « GB » important, à activité lutéinisante.

Les expériences ont été répétées avec des gonadotropines extraites d'urine de femmes postménopausiques, d'enfants entre deux et quatre ans, d'une femme atteinte de la maladie de Simmons, et d'un homme présentant un panhypopituitarisme.

La fraction « GA », préparée en becher par double extraction du phosphate tricalcique par le phosphate disodique a été soumise aux tests biologiques. A la suite de cette vérification, Butt et Crooke ont eux-mêmes reconnu qu'une activité lutéinisante accompagnait l'hormone folliculo-stimulante. Ils notent également qu'une agitation de dix minutes est suffisante; prolongée à une heure, elle entraîne une perte d'activité non négligeable. Pourtant, l'emploi du phosphate tricalcique a été recommandé comme agent détoxifiant (Loraine, Brown 1954). Actuellement, on lui préfère l'Amberlite ou différents types de cellulose (DEAE, CM, etc.). Ces matières permettent une élution moins brutale (pH, force ionique), par conséquent la perte de substance est moins importante (Butt 1958).

L'étude chimique approfondie du « G A » par chromatographie sur colonne de Hyflo-Supercel (système : butyl-cellosolve-phosphate de potassium - eau) met encore en évidence un fait important : les dosages des éluats à la ninhydrine et par l'absorption en U. V. ne concordent pas nécessairement. Des altérations chimiques, différentes suivant les méthodes employées, sont responsables de la dissemblance des résultats.

b) *But scientifique pur :*

1° *Les gonadotropines urinaires.* — Peu ou pas limitée par les quantités de matériel disponible, la chromatographie sur colonne a été abondamment exploitée, et plus particulièrement les colonnes d'échangeurs d'ions, de résines ou de différents types de cellulose (cf. PETERSON, SOBER 1956).

JOHNSON (1955 a, 1955 b) par exemple, traite 40 litres d'urine de femme post-ménopausique par du Cabunite qu'il élue par l'acétate d'ammonium alcoolique avant de purifier par fractionnement au sulfate d'ammonium saturé. KLINGSÖYR et STÖA (1955) utilisent les mêmes éluants pour le Decalso. Signalons les études comparatives portant sur les gonadotropines de l'urine d'homme, de femme post-ménopausique, ainsi que sur les deux standards HMG-J_3 et HMG-20A. Les gonadotropines, extraites selon la méthode acide benzoïque-acide tungstique, sont chromatographiées sur de la DEAE-cellulose. On constate que l'urine d'homme contient proportionnellement plus d'hormone lutéinisante que les trois urines post-ménopausiques, identiques entre elles. Cependant, la séparation FSH-ICSH n'est qu'esquissée. La fraction éluée contient principalement de la folliculo-stimuline avec une forte proportion d'hormone lutéinisante. La fraction adsorbée, au contraire, est constituée de ICSH contaminé par du FSH. Les pertes de substance sont énormes, puisque la récupération est de 60 % en bécher et de 15 % seulement en colonne (système : acétate d'ammonium 0,01 M- 0,2 M- 0,5 M et 0,5 M en présence de NaCl 0,2 M. BUTT, CROOKE, CUNNINGHAM 1959 b).

La DEAE-cellulose est également citée par SEGALOFF et STEELMAN (1959). Les auteurs confirment les résultats de BUTT, et, de plus, observent une activité plus élevée dans les fractions obtenues à partir d'hypophyses humaines que d'urine.

La DEAE- et la CM-cellulose ont été utilisées dans le cadre des travaux sur l'urine postménopausique. Les chercheurs insistent sur la non-séparation des deux hormones ainsi que sur la grande perte d'activité biologique au cours des purifications (BOURRILLON, GOT, MARCY 1959 b). L'utilisation de Decalso ou de Dowex leur paraît plus judicieuse. Pourtant, l'électrophorèse libre révèle encore la présence d'un mélange des deux constituants de gonadotropines. Ce n'est qu'après une nouvelle purification par électrophorèse sur amidon qu'il a été possible de conclure à l'homogénéité de la substance grâce à l'immuno-életrophorèse (BOURRILLON, GOT, MARCY 1960).

On peut se demander s'il faut imputer les demi-succès de ces séparations aux méthodes d'extraction ou à l'accumulation des difficultés dues au choix de la matière première, l'urine.

2° *Les gonadotropines hypophysaires humaines.* — Depuis quelques années, le nombre des études entreprises avec des hypophyses humaines est allé en augmentant. Nous ne citerons ici que quelques travaux.

STEELMAN, SEGALOFF et ANDERS (1959) utilisent la CM-cellulose. Ils distinguent une première fraction « A », éluée par l'acétate d'ammonium (0,01 M), représentant le 80 % de l'hormone folliculo-stimulante contaminée par une activité lutéinisante et une fraction « B », éluée par l'acétate d'ammonium (1 M), constituée par de l'hormone lutéinisante presque pure.

LI, SQUIRE, GRÖSCHEL (1960) procèdent d'abord à l'électrophorèse sur amidon, puis à la chromatographie sur DEAE-cellulose. L'élution se fait avec des solutions de phosphate à molarité croissante (0,05 M-0,1 M-0,2 M). Les substances recueillies se distinguent par un très haut degré de pureté. Il semble qu'on puisse parler d'une certaine spécificité du matériel de chromatographie : la DEAE-cellulose fournit de meilleurs résultats pour la folliculo-stimuline et l'Amberlite pour

l'hormone lutéinisante (Li 1960). Li souligne la flagrante dissemblance des constantes physico-chimiques des deux gonadotropines hypophysaires humaines par rapport à celles des hormones hypophysaires de mouton.

Roos et Gemzell (1960) ont complété deux chromatographies successives, faites respectivement sur de la CM-cellulose et de la DEAE-cellulose, par une électrophorèse. Ainsi ils parviennent également à une folliculo-stimuline d'origine hypophysaire humaine extrêmement pure.

3° *Les gonadotropines hypophysaires animales.* —

En 1958, Steelman rapporte quelques observations au sujet de *l'hormone folliculo-stimulante d'hypophyses de porc.* Des solutions de phosphate de concentration croissante (0,01 M - 0,04 M, 0,2 M) sont utilisées pour l'élution fractionnée des colonnes d'hydroxyl-apatite. Les éluats, analysés en UV, révèlent trois fractions, dont la deuxième est biologiquement active. A l'ultra-centrifugation, elle paraît être constituée de deux composés. Or, la substance active est instable. Assez curieusement, la perte d'activité fait augmenter fortement la première fraction et, dans une moindre mesure, aussi la troisième.

Les recherches de Woods et Simpson (1960) sur l'*hormone folliculo-stimulante de l'hypophyse de mouton* indiquent la persistance des facteurs contaminants après chromatographie sur DEAE-cellulose. Les conditions dans lesquelles les expériences ont été menées ne semblent pas favorables à une deuxième chromatographie : les auteurs récupèrent 60-75 % d'activité au premier passage et seulement 20 % au deuxième.

Ce sont les résultats des études de l'*hormone lutéinisante,* extraite d'*hypophyses de mouton,* qui ont été les plus inattendus. L'électrophorèse de certaines fractions, obtenues sur colonne d'Amberlite (élution par le phosphate de potassium 0,2 M à pH variable), dosées par absorption en UV, a fait apparaître la présence de deux hormones lutéinisantes, appelées α-ICH et β-ICH (Squire, Li 1959).

Un autre groupe (Ward, Mc Gregor, Griffin 1959) obtient des résultats analogues avec une colonne de CM-cellulose. L'hormone folliculo-stimulante est éluée par un tampon phosphate 0,005 M à pH 6,0 et les impuretés par un tampon phosphate 0,01 M à pH 7. Ensuite, la même colonne est traitée par un tampon borate 0,04 M. La première fraction lutéinisante, appelée LH_1, sort au pH 8, la seconde, appelée LH_2, après adjonction de NaCl 0,2 M au tampon borate 0,04 M. Diverses vérifications, telles que la rechromatographie des substances éluées et des tests biologiques, indiquent que le LH_1 n'est pas stable et se convertit en LH_2. Les auteurs cherchent alors à caractériser le LH_2.

4° *Les gonadotropines sériques animales.* — Tout comme dans les extraits urinaires humains, on n'a pas encore réussi à séparer les deux gonadotropines présentes dans le sérum de jument gravide.

Bourrillon et Got (1957) ont fait ressortir très clairement que l'hétérogénéité de la substance n'apparaît qu'à partir d'un certain degré de purification atteignant au moins 5000 UI/mg. En dessous de cette valeur limite, des associations de molécules empêchent toute séparation, ce qui a été confirmé par Legault, Clauser et Jutisz (1958). Ces derniers avaient abandonné la DEAE-cellulose en raison de son mauvais rendement (35 %) au profit de la permutite (90 %) et complété la chromatographie par l'adsorption des protéines inertes sur du carbonate de baryum. Malgré ces opérations successives, ils n'ont pas mieux abouti à la séparation des deux activités biologiques des gonadotropines sériques.

c) *Contribution à l'étude de la séparation chromatographique des deux activités gonadotropes :*

Nous avons utilisé la chromatographie sur phosphate tricalcique lavé avec une solution physiologique et élué par du Na_2HPO_4 0,002 M puis du Na_3PO_4 0,02 M. Le premier essai avec une substance brute, c'est-à-dire de l'urine de femme enceinte extraite à l'acide benzoïque,

a confirmé l'apparition de zones brunes éluées séparément. Ces zones, dont nous n'avons pas déterminé la nature, étaient bien visibles à l'œil, mais rendaient le dosage des éluats en UV impossible.

Les expériences ont été effectuées avec des substances commerciales, donnant des éluats incolores en l'absence de zones visibles :

1° *chromatographie de Primogonyl* (PU; pose 5000 UI) : fig. 4. La hauteur des deux pics est presque identique aussi bien à l'UV qu'au Folin. Des mesures par polarographie semblent indiquer qu'une plus forte quantité de substance est éluée par le Na_3PO_4, mais les ions sodium gênent la mesure. Dans l'ensemble, les trois courbes de dosage concordent ;

2° *chromatographie d'Anteron* et test biologique des éluats (PMS; pose 5000 UI) : fig. 5.

Les conditions de travail sont toujours les mêmes. On voit apparaître les mêmes deux pics de l'expérience précédente en absorption dans l'UV à 280 mμ. Les éluats sont réunis en fonction de la courbe de dosage, lyophylisés et testés sur femelles de souris impubères. Il apparaît clairement que les deux pics ne correspondent pas aux deux activités recherchées. Seul le premier, élué par Na_2HPO_4, stimule les ovaires. Le deuxième pic, mieux délimité et plus important, correspond à des impuretés protéiques pouvant être soit des artéfacts d'extraction, soit des substances ajoutées à l'extrait pour le rendre injectable.

Nous pouvons parfaitement admettre que la majeure partie de l'hormone soumise à la chromatographie est éluée par les premiers ml du phosphate disodique. Les ml suivants ne font qu'augmenter le pourcentage de récupération, mais ne contiennent plus qu'une faible part des substances adsorbées. Or, les animaux recevant les éluats réunis correspondant au premier pic (et donc aux premiers ml) présentent une réaction FSH/LH mixte forte. Les animaux du deuxième groupe, recevant l'équivalent des 10 ml qui suivent où aucun pic ne s'inscrivait à l'UV, montrent tout au plus une stimulation folliculaire faible, voire physiologique. Cette expérience a été répétée avec de l'Antex (pose 6000 UI), et les résultats en sont les mêmes.

3° *Double-chromatographie d'Anteron* (pose 2 × 5000 UI) : fig. 6. On nous a demandé de vérifier si le deuxième pic dans l'UV, correspondant à l'élution par du phosphate trisodique et qui s'avère inactif, ne contient pas une protéine pouvant éventuellement servir d'entraîneur. Une double-chromatographie devait résoudre le problème :

Sur une première colonne, lavée au NaCl à 8 ‰, on pose 6000 UI d'Antex, respectivement 5000 UI d'Anteron. On élue par le phosphate disodique. Les éluats, recueillis par fractions de deux ml, sont dosés à l'UV. L'éluat trisodique entraînant la substance inerte est recueilli *in toto*. Sur une deuxième colonne, lavée également au NaCl à 8 ‰, on pose la même quantité de substance que sur la première. Mais au lieu d'éluer par des solutions fraîches de phosphate di- et trisodique, on fait passer directement le Na_3PO_4 provenant de la première colonne. On recueille à nouveau des fractions de deux ml qu'on analyse à l'UV.

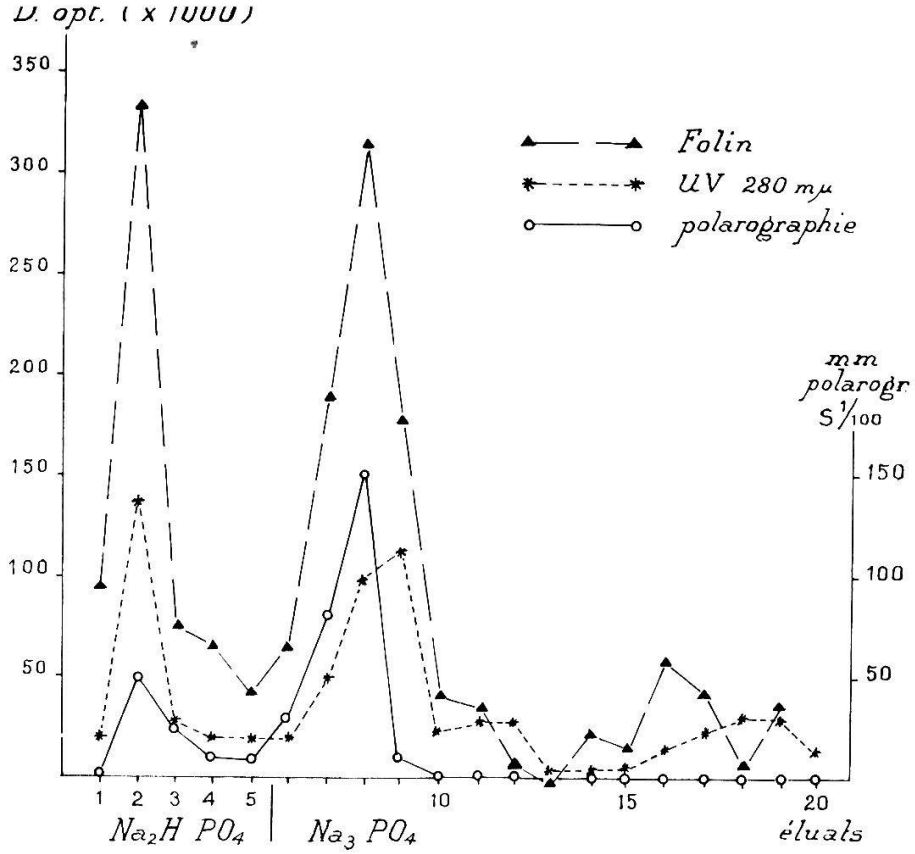


FIG. 4. — Chromatographie de 5000 UI de Primogonyl et dosages chimiques des éluats (cf. p. 299).

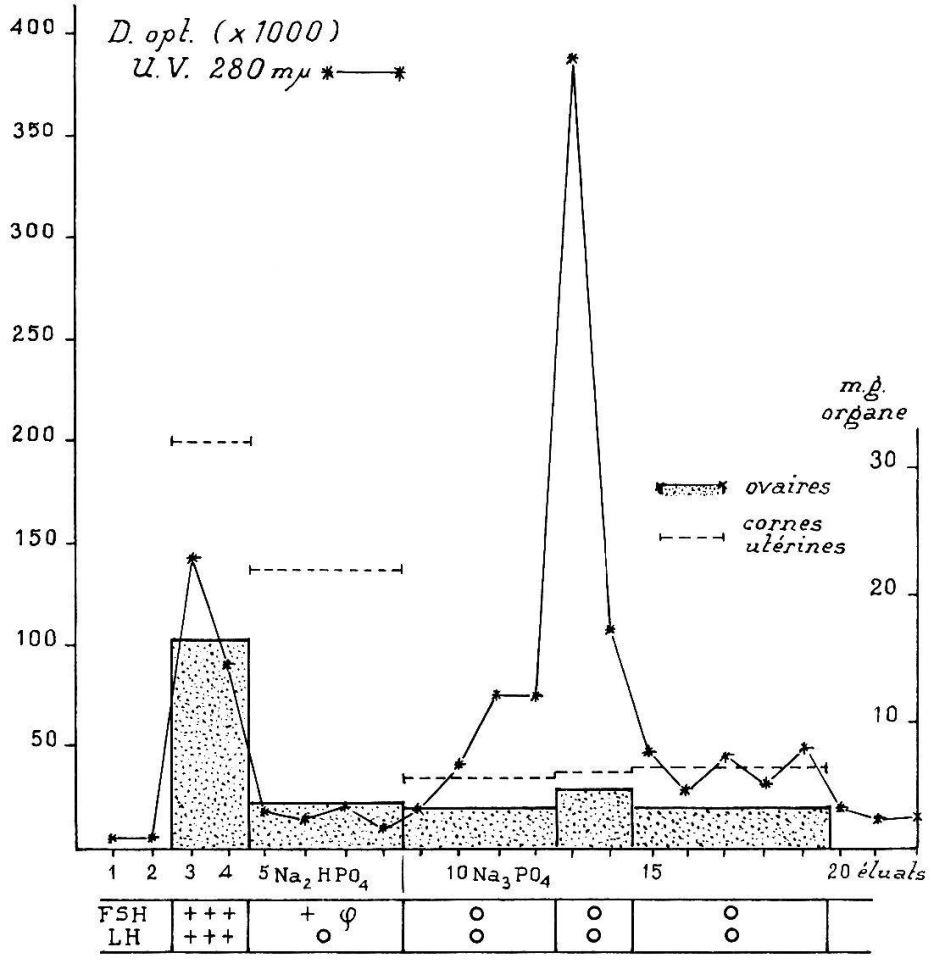


FIG. 5. — Chromatographie de 5000 UI d'Anteron.
Dosages parallèles des éluats:
Absorption à 280 mμ, tests biologiques pondéraux et étude histologique des ovaires (action FSH/LH).

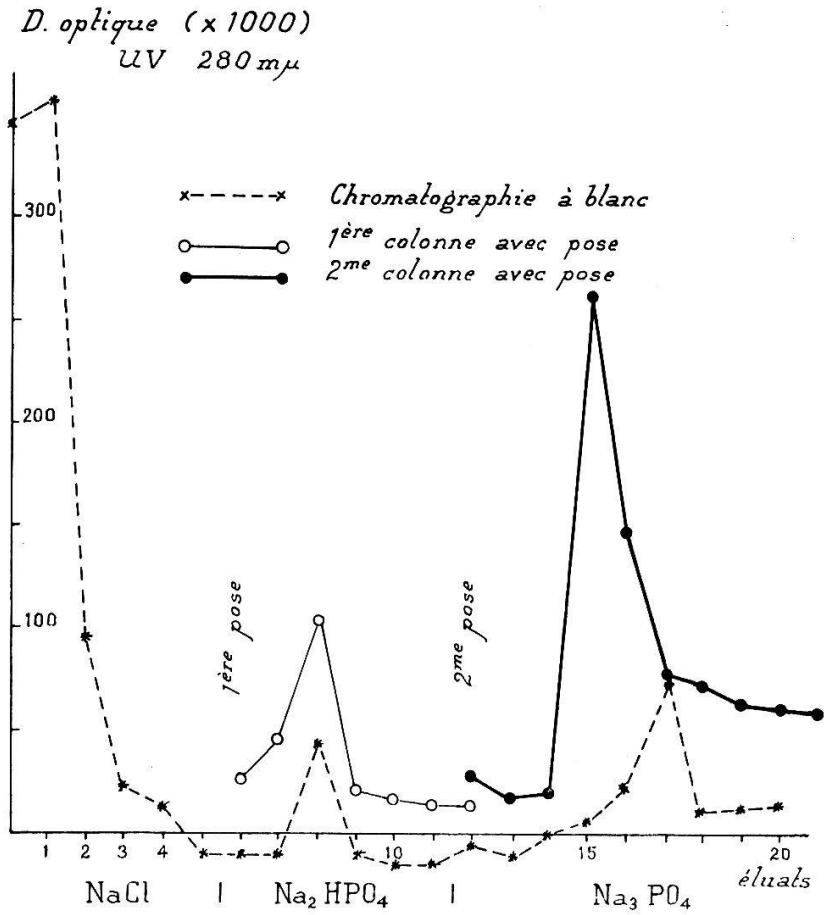


FIG. 6. — Comparaison de deux doubles-chromatographies éluées l'une à blanc, l'autre avec deux poses de 5000 UI d'Anteron.

Les résultats des deux préparations de gonadotropines sériques concordent. La hauteur de l'unique pic de cette deuxième colonne apparaît plus rapidement que lors de l'expérience à blanc. Pourtant, ce maximum n'est pas plus haut que le deuxième pic apparaissant au cours des chromatographies simples. Il n'est pas non plus dédoublé. On constate pourtant une certaine asymétrie, ainsi qu'un net effet de « traînée », qui se traduit à l'UV par une absorption de fond plus élevée.

Dans la dernière expérience l'« effet-entraîneur » n'a pas eu lieu. La double-chromatographie n'a fait qu'enrichir la deuxième pose en protéines non actives. Il serait alors plus intéressant d'enrichir la fraction active. On peut se demander s'il en serait résulté un gain réel, et si l'enrichissement par la deuxième chromatographie n'aurait pas été annnulé par l'inactivation spontanée observée au cours des chromatographies.

d) *Conclusions :*

Chaque nouvel éluant utilisé pour la chromatographie des gonadotropines provoque l'apparition d'un éluat présentant un pic d'ab-

sorption maximum. Ces pics ne correspondent pas tous à des protéines douées d'une activité biologique. En outre, la hauteur des pics n'a qu'une valeur relative; elle ne mesure pas l'activité absolue des fractions. Bien au contraire, l'activité spécifique ne peut se calculer qu'à partir des résultats fournis par les tests biologiques et les dosages des protéines.

Considérant l'ensemble des recherches faites jusqu'à maintenant en chromatographie nous pouvons dire que, dans la plupart des expériences, la séparation des deux hormones gonadotropes n'a pu être réalisée. En fait, il s'agit simplement d'une purification des extraits, puisqu'une certaine masse de substance, biologiquement inerte, est éliminée. Au cours de quelques travaux spéciaux et dans certaines conditions particulières, une séparation a été obtenue de façon plus ou moins satisfaisante. Mais des quantités initiales considérables de substances brutes doivent être déposées.

Dans nos propres expériences, les 5000 UI mises en jeu représentent en moyenne cent fois le taux des gonadotropines hypophysaires excrétées quotidiennement par un sujet normal.

L'adaptation de la séparation chromatographique aux dosages cliniques des deux gonadotropines hypophysaires, même incomplète, reste donc encore aujourd'hui une gageure.

2) Le contre-courant

Devant les brillants résultats obtenus dans le domaine des séparations ocytocines-vasopressines, de la résolution des différentes hormones corticotropes et des facteurs contrôlant la décharge de l'ACTH, on peut se demander si la distribution à contre-courant n'apporterait pas aussi une solution pour les gonadotropines. Peu de publications mentionnent ce mode d'extraction.

La récupération de la fraction « GA » provenant de la chromatographie d'extraits d'urine de femme postménopausique de Butt était mauvaise, en raison de la trop forte concentration en sels. Il est regrettable qu'aucun dosage biologique ne soit mentionné (Butt 1956).

Dans une communication personnelle, Ward (1960) nous a signalé que les essais de purifier l'hormone lutéinisante par la distribution à contre-courant avaient échoué, tous les systèmes de solvant ayant provoqué la dénaturation des protéines.

Travaillant avec des gonadotropines sériques, Legault (1960) a surmonté cet obstacle. Mais il affirme n'avoir observé aucune séparation des hormones folliculostimulante et lutéinisante. Cette technique n'est donc encore et sous toute réserve qu'une méthode de purification.

3) L'électrophorèse

Cette méthode a été utilisée au cours des recherches sur les gonadotropines aussi bien en vue d'une application clinique que pour les besoins des recherches de base.

a) *But clinique :*

Du point de vue purement historique, il faut mentionner le travail de SPIELMANN (1938).

Presque quinze ans plus tard, un groupe de chercheurs propose un dosage de l'urine de femme enceinte par électrophorèse sur papier avec des extraits obtenus sur filtre Chamberland. Il distingue une fraction immobile, biologiquement inerte, et une fraction mobile, représentant la protéine active, puisqu'elle seule est « Friedman-positive » (DUSTIN, MÉDARD, WODON, BIGWOOD 1952).

STRAN et JONES (1953) croient observer une différence qualitative entre l'urine normale d'une part et l'urine de femme enceinte ou de certains malades d'autre part. (L'urine de femme normale ne présente pas de migration. Par contre, ils observent une migration dans le cas des femmes enceintes ou atteintes d'hypergonadotropisme. L'urine d'un malade à protéinurie présente un complexe migrant vers l'anode.)

Mais en fait il n'est pas possible de distinguer les gonadotropines hypophysaires des chorioniques. Si l'on ajoute à cet inconvénient que d'autres expériences ont prouvé que la purification entraîne une diminution de la colorabilité allant jusqu'à effacer des zones, tandis que l'activité biologique des éluats persiste, il faut convenir qu'un dosage des gonadotropines par cette voie est douteux (STRAN, JONES 1954).

b) *But scientifique pur :*

1° *L'urine de femme enceinte* a fait l'objet d'un certain nombre de travaux, qui ne concordent pas toujours.

Ainsi, le groupe de LI (RAACKE, LI, LOSTROH 1954) utilise des produits à différents degrés de pureté (2000-7000 UI/mg). Les éluats de l'électrophorèse sur amidon, lus à 750 mμ font apparaître deux pics appelés « HCG-A » et « HCG-B ». Tous deux possèdent une activité biologique du type ICSH. L'activité spécifique de « B » est supérieure à celle de « A » ; leurs points iso-électriques sont très voisins (3,6 et 3,5).

Les résultats précités sont en désaccord avec ceux obtenus par BOURRILLON, GOT et MARCY (1956). Ces chercheurs ne retrouvent pas les pics « A » et « B » pour des produits titrant 6000 et 10.000 UI, mais ils obtiennent une protéohormone homogène, bien individualisée, migrant vers l'anode. Ils concluent que les gonadotropines sont excrétées dans l'urine sous forme de complexes protéiques labiles qui seraient scindés au cours des purifications.

Les travaux d'un autre groupe nous intéressent particulièrement puisque les auteurs ont travaillé, comme nous, avec du Primogonyl (SCHNEIDER, FRAHM 1955 a; 1956 a; 1956 b). Le tableau 11 résume leurs résultats obtenus par électrophorèse sur papier.

Cherchant à isoler le facteur «HCG» de l'urine de femme enceinte, GOT (1959) a rendu évident le rôle des différents types d'électrophorèses qui, en aucun cas, ne peuvent servir à des fins d'extraction ou de purification même grossière, et ne présentent un réel intérêt que pour des substances déjà hautement purifiées. L'électrophorèse sur papier sert d'analyse courante. L'électrophorèse de zone sur amidon aboutit, grâce à son haut pouvoir de résolution, à des purifications très poussées. Elle permet de juger de l'homogénéité des fractions. Par l'électrophorèse libre, on détermine le point iso-électrique, établit la courbe de mobilité et vérifie le degré de pureté de la substance.

Or, il s'est trouvé que des produits hautement purifiés, homogènes selon les critères habituels et ne présentant aucune activité folliculo-stimulante se sont révélés fortement inhomogènes à l'immuno-électrophorèse ; cette dernière méthode devient alors une méthode de vérification ultra-sensible (GOT, LÉVY, BOURRILLON 1959). Les auteurs soulignent l'importance du choix de l'immunsérum. La même

TABLEAU 11

Expériences de SCHNEIDER *et* FRAHM. *Electrophorèses de gonadotropines chorioniques et activités biologiques des éluats.*

	Zones						
	1	2	entre 2 et 3	3	entre 3 et 4	4	5
Coloration des bandes							
Ninhydrine (acides aminés libres)	+	+	—	(+ large)	—	+	(+ variable)
Amidoschwarz (protéines)	—	(rare)	—	++	—	++	—
Schiff (aldéhydes)	—	—	—	—	—	+	—
Tests préliminaires							
Rat ♂ entier de 21 jours : poids : prostate ventrale	1 pic	1 pic	—	3 pics	—	—	—
Souris ♀ entière de 21 jours : poids ovarien	—	1 pic	—	2 pics	—	—	—
poids : cornes utérines	1 pic	1 pic	—	3 pics	—	—	—
Tests sensibles							
Rat ♂ hypophysectomisé : poids : prostate ventrale	—	—	petit maximum	—	grand maximum	—	—
Rat ♀ hypophysectomisée : poids ovarien	—	—	—	++	—	—	—
histologie ovarienne	—	—	LH	FSH LH ±	ICSH	—	—

substance, titrant 1500 UI/mg présente deux lignes de précipitation avec l'immunsérum de cheval et 7 à 8 lignes avec celui de lapin. Quatre lignes sont encore présentes (immunsérum de lapin) aux titres de 6000 UI/mg ; et c'est seulement pour une activité spécifique de 12.000 UI/mg qu'on obtient une ligne de précipitation unique. Il reste cependant à savoir si ce produit représente réellement l'hormone recherchée, à l'état pur.

2° En ce qui concerne l'*urine de femme postménopausique,* citons entre autres le travail de BOURRILLON, GOT et MARCY (1960) annonçant l'apparition d'une fraction présentant un seul maximum symétrique. Cette fraction est active sur l'utérus de souris à la dose de 0,001 mg.

3° Dans des extraits d'*hypophyses humaines,* RIGAS, PAULSEN et HELLER (1958) ont observé trois zones nettes, ne représentant pourtant pas les trois hormones recherchées FSH, LH et LTH (prolactine).

Ce n'est qu'en combinant judicieusement l'électrophorèse sur colonne d'amidon et la chromatographie que l'équipe de Li (Squire, Li 1959; Li 1960) a réussi la séparation des hormones folliculo-stimulante et lutéinisante à partir d'hypophyses humaines.

4° *Le sérum de jument gravide* a également été étudié à l'électrophorèse. En soumettant de l'Anteron aux mêmes conditions d'expérience que le Primogonyl on peut croire, à première vue, avoir obtenu l'individualisation des deux facteurs (Schneider, Frahm 1955 b; 1956 c; Frahm, Schneider 1957).

Le tableau 12 résume les résultats.

Tableau 12

Expérience de Schneider *et* Frahm. *Electrophorèses de gonadotropines sériques et activités biologiques des éluats.*

	Zones						
	1	2	entre 2 et 3	3	entrs 3 et 4	4	5
Coloration des bandes							
Ninhydrine (acides aminés libres)	+	+	—	+	—	+	+ (variable)
Amidoschwarz (protéines)	+	++	—	+	—	—	—
Schiff (aldéhydes)	+	++	—	+	—	—	—
Tests préliminaires							
Souris ♀ entière 21 jours :							
poids ovarien	+	+	—	2 pics	—	+ (vers bande 5)	—
poids : cornes utérines	+	+	—	+ (inhomogène)	—	+ (vers bande 5)	—
follicules hémorragiques	—	—	—	+	—	—	—
Tests sensibles							
Rat ♂ hypophysectomisé :							
poids : prostate ventrale	—	—	petit maximum	—	grand maximum	—	—
Rat ♀ hypophysectomisée :							
poids ovarien	—	—	—	+	—	—	—
poids : cornes utérines	—	—	—	+	—	—	—
histologie ovarienne	—	—	LH/ICSH	FSH+++	FSH ± ICSH	—	—

Raacke, Loraine, Boda et Li (1957), comparant dans une étude critique approfondie deux séparations de gonadotropines sériques de pureté différente, soumises à l'électrophorèse sur amidon (différents

systèmes de tampon), ont dû constater que les éluats, qui sont doués d'une activité biologique, ne présentent pas nécessairement un pic dans la courbe de dosage des protéines. Il semble que les deux activités biologiques soient retenues dans les mêmes proportions au cours de toute la purification. Les auteurs se sont opposés à l'annonce prématurée de la séparation des hormones.

Depuis, ni les recherches de Bourrillon et Got (1957), ni celles de Legault (1960) n'ont abouti a une séparation par l'électrophorèse. Bien au contraire, un récent travail de Schneider et Frahm (1961) confirme l'impossibilité d'une résolution entre les différentes activités biologiques.

c) *Contribution à l'étude électrophorétique :*

Par électrophorèse continue, Péguiron (1955) avait obtenu, avec de la gonadotropine chorionique CIBA, titrant 125 UI/mg, la résolution en deux zones bien distinctes à l'Amidoschwarz et désignées par les lettres A et B. Aucune vérification des activités biologiques n'avait été décrite à l'époque, et la dénomination A et B n'a aucun rapport avec les deux facteurs hormonaux recherchés.

Ce travail a été repris avec d'autres substances commerciales, tantôt avec l'appareil Elphor, tantôt avec le système à chevalet de Durrum. Nous avons utilisé du papier Schleicher et Schüll 2043, du papier Whatman de différentes épaisseurs permettant des poses d'importance variable, et de l'acétate de cellulose. Les zones sont généralement révélées par la ninhydrine (acides aminés) et l'Amidoschwarz (protéines).

1° *Electrophorèse d'un extrait brut d'urine de femmes enceintes :* fig. 7.

Un gramme de poudre d'extrait à l'acide benzoïque titrant environ 300 UI/mg est extrait par deux fois 2,5 ml de tampon véronal-acide acétique à pH 8,6. On pose 30 µl, répartis sur trois cm, et fait migrer quatre heures et demie à 13 V/cm.

Les zones révélées par l'Amidoschwarz (AS) et la ninhydrine (N) ne se recouvrent pas nécessairement. (A titre de comparaison, la figure montre l'électrophorèse de sérum humain normal, faite dans les mêmes conditions.)

2° *Vérification de la sensibilité de la ninhydrine.*

Si la ninhydrine révèle la présence de traces d'acides aminés, il est pourtant bien connu que les quantités minimales nécessaires à l'apparition d'une tache, dont la couleur varie suivant l'acide aminé envisagé, dépend également de la substance analysée. Il nous a paru utile de déterminer le seuil de sensibilité de la ninhydrine dans le cas des gonadotropines. Il dépend de la substance utilisée et de son degré de pureté. Du Physex, provenant d'une ampoule contenant 1500 UI, a été déposé à raison de 15 UI - 30 UI - 45 UI - 60 UI -

75 UI - 90 UI et 105 UI, puis soumis à l'électrophorèse (tampon : véronal-acétate à pH 5,8; migration : 40 heures à 6 V/cm). On n'observe qu'une seule bande. A 30 UI et 45 UI la zone est à peine perceptible, alors qu'elle est nette à partir de 60 UI. Puisque les extraits d'hormone sont constitués par un mélange de produits, il faut toujours se demander si une tache foncée révèle la présence d'une faible quantité d'une substance à grande affinité pour la ninhydrine ou, au contraire, une très grande quantité de substance peu chromogène.

Ainsi, dans la figure 9 la bande II représente une électrophorèse de 500 UI de Physex. Les conditions de migration sont identiques à celles de l'expérience précédente. Lorsqu'on dépose une quantité plus importante de produit, d'autres bandes apparaissent. La même observation a été faite avec du Primogonyl.

3° *Double-électrophorèse* (Primogonyl) : fig. 8.

Lorsque nous avons travaillé avec la préparation PU de Schering, le Primogonyl, les quantités de UI mises en jeu ont été, en général, très élevées. Avec 300 UI de gonadotropines déposées sur une largeur de trois centimètres et soumises à l'électrophorèse, on se trouve juste en dessous du seuil de sensibilité de la ninhydrine. Lors d'un dépôt punctiforme, on observe après électrophorèse un spot allongé sans résolution apparente. Nous avons alors effectué une double-électrophorèse en tournant le papier de 90° avant la deuxième migration. Les conditions restent inchangées (tampon : véronal-acétate à pH 5,8; migration : 3 heures à 13 V/cm). Il en résulte une succession de spots, en diagonale, plus ou moins bien individualisés (fig. 8 b). Malheureusement, du point de vue pratique, il n'est pas possible, avant la coloration, de découper l'électrophorèse et d'éluer sélectivement et individuellement l'une ou l'autre des substances, car l'emplacement n'en est pas rigoureusement fixe. De faibles variations des conditions d'expérience (température, pH, etc.) causent une déviation de la localisation.

4° *Influence du degré de pureté de la préparation :* fig. 9 et 10.

Dans une série d'électrophorèses de Primogonyl, nous avons constaté certaines divergences des résultats, s'expliquant uniquement par l'utilisation de préparations provenant de lots de fabrication différents.

L'influence des substances inertes sur le comportement électrophorétique des gonado-stimulines a été mise en évidence avec des préparations commerciales de différentes concentrations, donc de « degré de pureté » différent :

Physex (PU), titrant soit 500 UI, soit 3000 UI par ampoule ; Antex (PMS), titrant soit 750 UI, soit 3000 UI par ampoule. On pose toujours l'équivalent de 500 UI sur une largeur de trois cm. Les conditions de migration figurent dans le tableau 13.

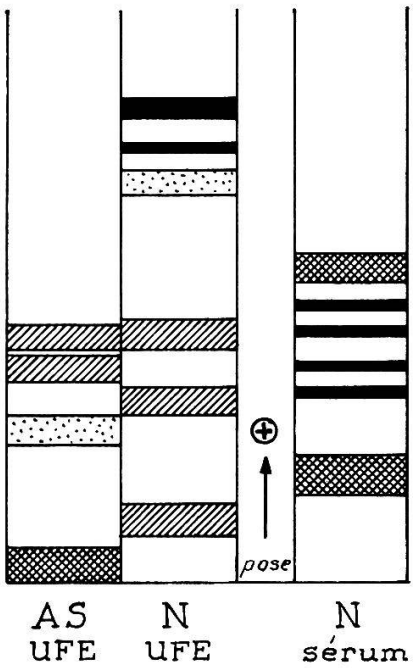


Fig. 7. — Electrophorèses d'un extrait brut d'urine de femme enceinte (UFE) et de sérum humain normal.

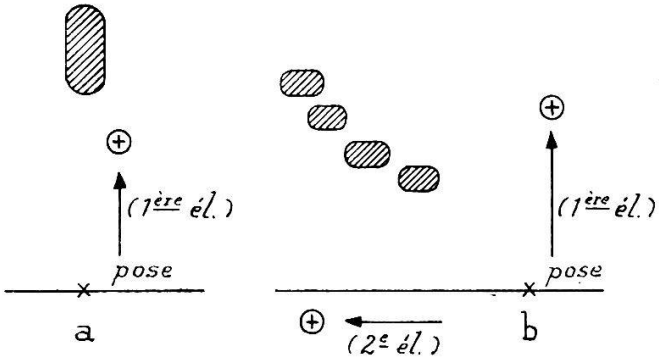


Fig. 8. — Electrophorèse simple (a) et double (b) de 300 UI de Primogonyl.

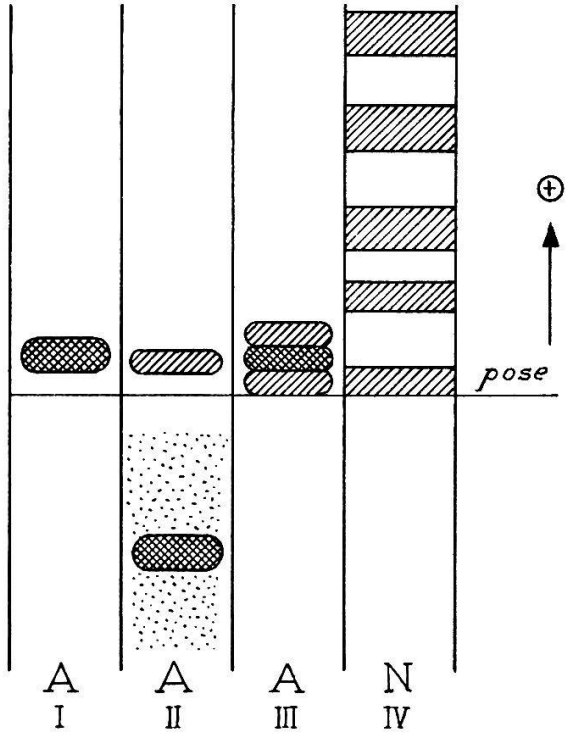


Fig. 9. — Electrophorèses de 500 UI de Physex, faites dans différentes conditions: voir tableau 13.

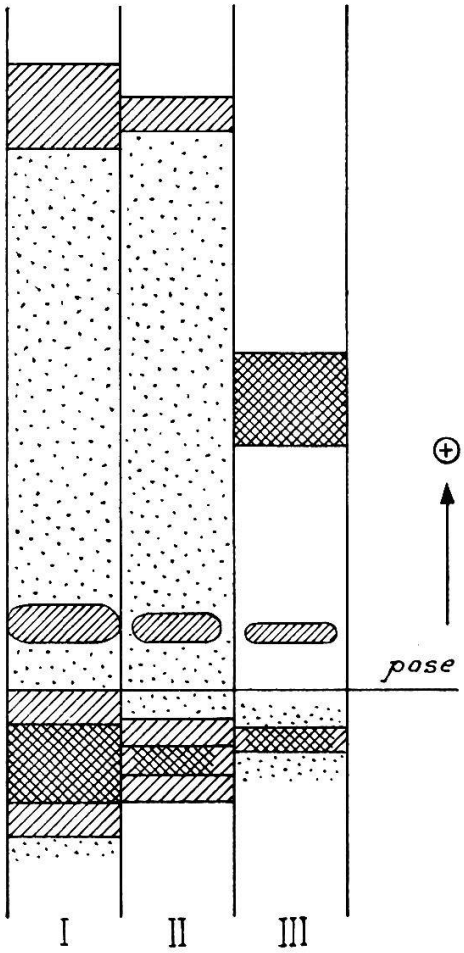


Fig. 10. — Electrophorèses de 500 UI d'Anteron faites dans différentes conditions: voir tableau 13.

TABLEAU 13

Electrophorèses faites dans différentes conditions.
(V. également fig. 8 et 9)

Bande	Titre de l'ampoule	Appareil	Tampons	pH	Durée	Diff. de potentiel	Coloration
a) *Pose de 500 UI de Physex* (fig. 8)							
I	500 UI	à chevalet	Véronal-acétate	5,8	40 h	6 V/cm	Amidoschwarz
II	3000 UI	»	»	»	»	»	»
III	3000 UI	Elphor	T. E. B.	8,5	8 h	8 V/cm	»
IV	1500 UI	»	Véronal-acétate	5,8	»	»	Ninhydrine
b) *Pose de 500 UI d'Antex* (fig. 9)							
I	750 UI	à chevalet	Véronal-acétate	5,8	40 h	6 V/cm	Amidoschwarz
II	3000 UI	»	»	»	»	»	»
III	3000 UI	Elphor (acétate de cellulose)	»	»	5 ½ h	8 V/cm	»

Dans le cas du Physex, la masse plus ou moins immobile d'une quantité importante d'impuretés a empêché la migration cathodique des gonadotropines. Dans le cas de l'Antex, la migration a eu lieu. La forte coloration de la zone, proche de l'endroit de pose, correspondant aux substances inertes, indique la présence d'une forte quantité d'impuretés. Les zones sont mal délimitées et l'on note des phénomènes de traînées très prononcées. Ce dernier inconvénient peut être évité par l'emploi d'acétate de cellulose (fig. 10 III). L'emploi de ce support présente de plus l'avantage de n'exiger qu'une courte durée de migration.

Il est intéressant de souligner que, dans les mêmes conditions, la coloration à l'Amidoschwarz révèle une migration anodique du Primogonyl et cathodique du Physex, alors que dans les deux cas il s'agit de préparations de gonadotropines choriales.

5° *Tests biologiques et dosages des éluats :* fig. 11, 12 et 13.

Des substances commerciales ont été soumises à l'électrophorèse, dans un système jugé optimal pour les séparations.

Sur les papiers encore humides, on prélève longitudinalement, sur une petite largeur, une bande témoin qui est colorée à la ninhydrine. Sur la bande principale, on coupe et élue des bandelettes de un ou de deux cm de long, suivant la

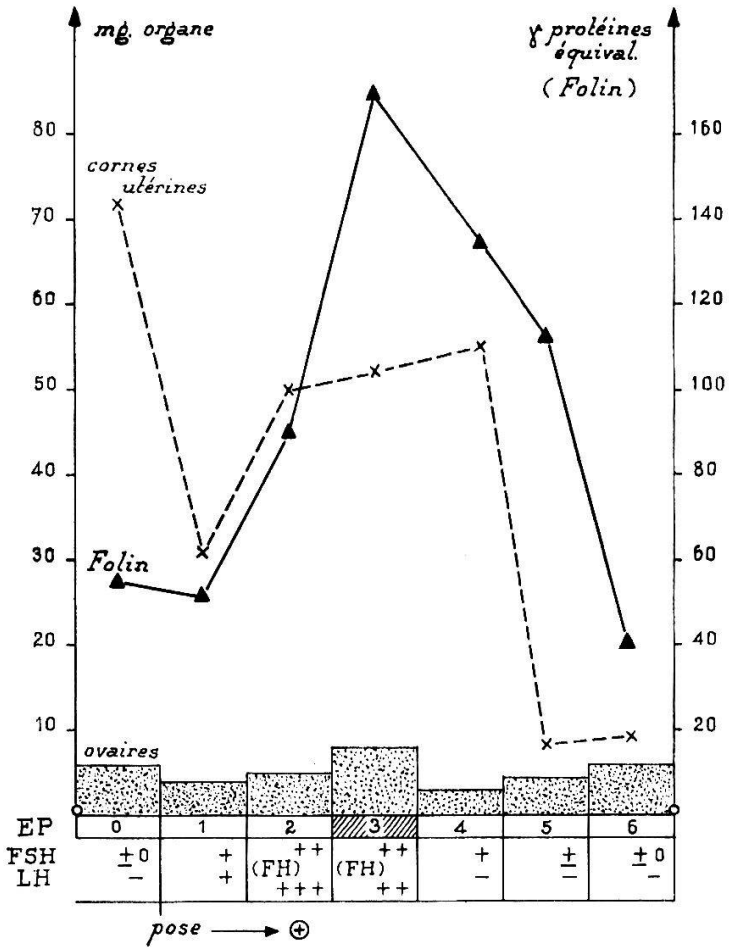


FIG. 11. — Electrophorèses de 1000 UI de Physex. EP = bande témoin colorée à la ninhydrine. Dosage au Folin et tests biologiques pondéraux des éluats. Etude biologique des ovaires (action FSH/LH et présence de follicules hémorragiques).

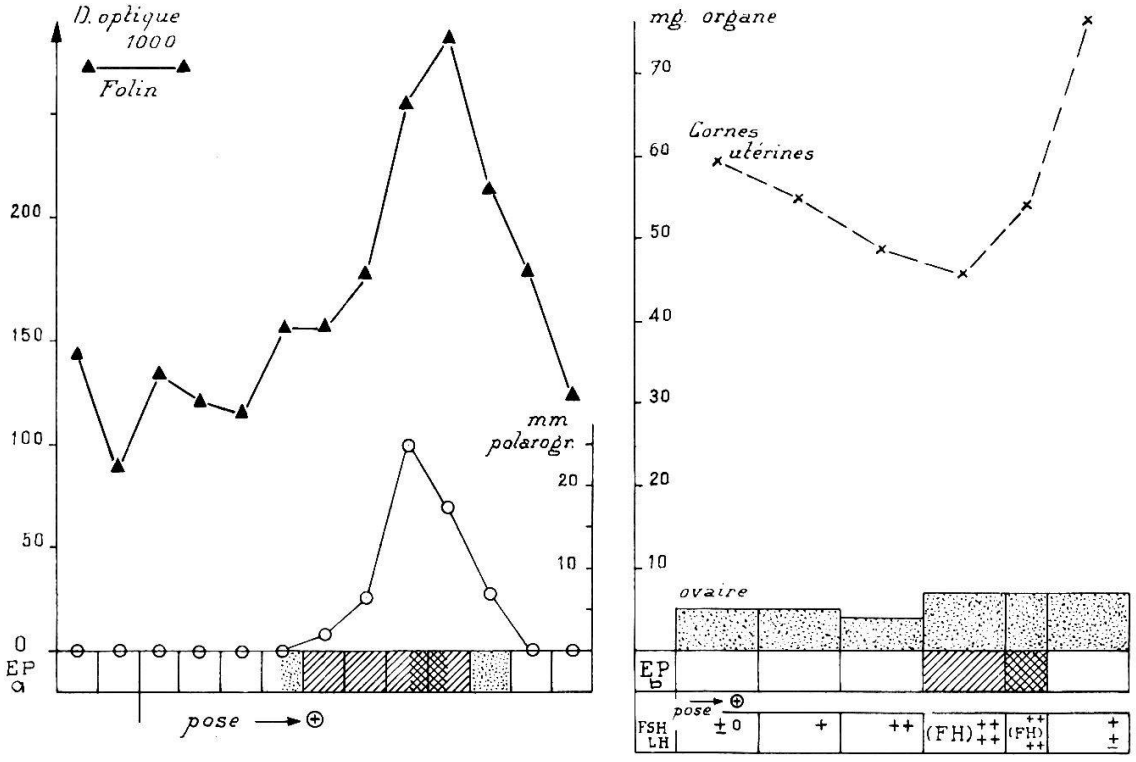


FIG. 12. — Electrophorèses de 1200 UI de Primogonyl, faites simultanément, colorées à la ninhydrine (EP).
a) dosages chimiques et physico-chimiques
b) Tests biologiques.

précision désirée. Les éluats aqueux sont lyophilisés, puis repris par un volume de solution physiologique minimal, permettant de faire parallèlement des tests biologiques et des dosages chimiques. Dans certains cas, il était préférable de faire simultanément deux électrophorèses parallèles identiques, l'une servant aux tests biologiques et l'autre aux dosages chimiques et physico-chimiques. A cet effet, les éluats lyophilisés sont repris par de l'eau distillée, car le sodium gêne l'apparition de la double vague de BRDICKA lors de la mesure polarographique.

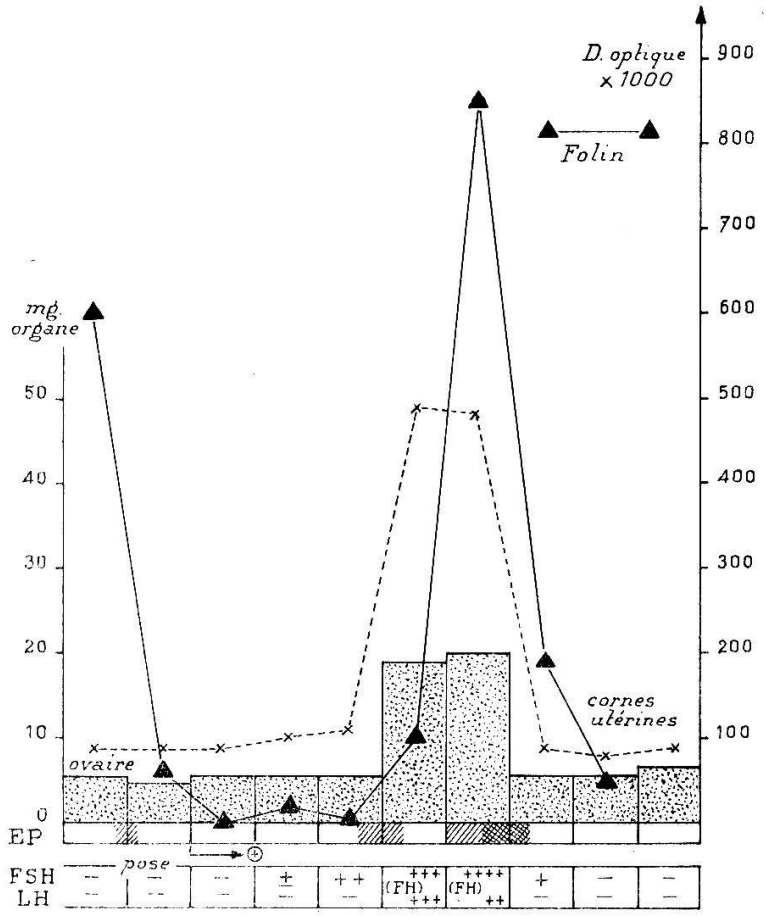


FIG. 13. — Electrophorèses de 2500 UI d'Anteron. EP = bande témoin colorée à la ninhydrine. Dosage au Folin et tests biologiques des éluats.

Une première série d'expériences est effectuée avec des préparations de gonadotropines chorioniques. Les figures 11 et 12 font ressortir une relation entre la stimulation pondérale des ovaires et des cornes utérines des femelles de souris impubères d'une part et des zones colorées à la ninhydrine sur la bande témoin d'autre part. Cependant, l'étude histologique révèle non pas une séparation franche entre une éventuelle hormone folliculo-stimulante et l'hormone lutéinisante, mais en quelque sorte une stimulation des follicules, graduellement plus puissante entre le lieu de pose et la zone colorée à la ninhydrine. La zone ninhydrine-positive, qui correspond à une forte lutéinisation, avec apparition de follicules hémorragiques, est encadrée de deux zones, d'importance inégale, à activité folliculo-stimulante. Cette dernière se trouve dans les éluats cor-

respondant à des parties peu ou pas colorées à la ninhydrine, pouvant donc correspondre à des régions de l'électrophoré-gramme où les gonadotropines étaient en faible concentration. Leur présence peut être due à un effet de « traînée » ou de « prémigration », cette dernière en raison de la grande quantité de substance déposée.

Dans une deuxième série, l'expérience a été répétée avec de l'Anteron. Les résultats sont représentés par la figure 13. On ne peut affirmer que les différentes zones, révélées par la ninhydrine, représentent les deux activités biologiques recherchées. La stimulation pondérale reflète pourtant une migration des gonadotropines. A nouveau, une forte croissance folliculaire suit la lutéinisation et la présence des follicules hémorragiques.

d) *Conclusions :*

De tout ce qui précède concernant l'électrophorèse des hormones gonadotropes nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

— Les impuretés, quelles qu'elles soient, substrats de préparations commerciales ou impuretés d'extraits bruts, gênent l'électrophorèse en s'opposant à une bonne migration des gonadotropines.

— L'électrophorèse ne peut être envisagée que pour des substances déjà hautement purifiées, pour autant qu'on dispose de suffisamment de matériel.

— Pour ce genre d'étude, le papier est un mauvais support car il retient une trop forte proportion de matériel. L'amidon et l'acétate de cellulose lui sont préférables.

Tenant compte des critiques de Li on peut se demander :

1° si la traînée, observée sur les électrophorèses, est formée par des substances actives, liées à une autre protéine, donnant une réaction du type FSH en raison de sa nature ou en raison de la faible quantité d'hormones présente ;

2° s'il s'agit d'une séparation réelle de deux produits présents initialement au moment de la pose, ou

3° s'il y a eu dégradation.

L'absorption à l'UV à 280 mμ et la réaction au Folin des éluats indiquent une certaine corrélation entre les zones colorables à la ninhydrine et les pics des courbes de dosages, sans que la preuve soit apportée qu'il s'agisse exclusivement de substances hormonales. On dose donc aussi les impuretés dans la mesure où celles-ci sont des acides aminés ou des protéines, ainsi que les protéines vectrices éventuelles des gonadotropines.

Il est regrettable que les expériences biologiques sur rats hypophysectomisés de Frahm et de Schneider ne puissent être comparées aux nôtres, en raison du choix différent des animaux. Nous n'avons jamais rencontré la zone « LH », mais bien les deux zones

« FSH » et « ICSH ». De ce fait aussi nos conclusions ne concordent pas avec celles des auteurs précités. L'hypothèse selon laquelle certains minima pondéraux correspondent à des surdosages nous paraît discutable et nécessiterait une vérification histologique.

Comme nous d'ailleurs, ce groupe de chercheurs a pu constater une forte variabilité entre les différents lots de fabrication d'une même gonado-stimuline. Nous ajoutons que cette constatation est encore plus frappante pour des substances de provenance différente (nombre et localisation des zones). C'est notamment cette divergence des résultats qui nous incite à souligner la grande importance du choix du mode d'extraction, dans le cas où l'on envisagerait un dosage chimique des gonado-stimulines.

III. DOSAGES CHIMIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES DES GONADOTROPINES

1) Méthodes chimiques

a) *Travaux étrangers :*

Plusieurs méthodes de dosage ont été proposées. Elles se basent sur certaines caractéristiques chimiques grossières, non spécifiques des gonadotropines.

Ainsi, Van den Driessche et Hans (1952) ont utilisé la *réaction des sucres* à l'orcinol pour déceler les gonadptrooines chorioniques dans les urines de femmes enceintes. La réaction est négative chez les femmes non gravides.

Wodon et Bigwood (1952) ont mesuré le développement de la couleur rouge du *réactif de Schiff*. Selon ces auteurs, cette coloration apparaît déjà en début de grossesse. Il ne s'agit pas d'un dosage à proprement parler des gonadotropines, mais d'un test chimique, censé remplacer les tests biologiques de grossesse.

En 1955, De Gennes, Moukhtar et Baillet publient une technique chimique nouvelle. La méthode repose sur la transformation des glucoprotéides (FSH) par l'acide periodique en formol et acide formique. On évalue au spectrophotomètre, après adjonction de l'acide chromotropique, la quantité de *formaldéhyde libérée*. Les chercheurs se réfèrent aux expériences de surcharges donnant une récupération très satisfaisante. Mais il faut remarquer que les expériences n'ont pas été effectuées avec de l'urine. On ne sait donc pas dans quelle mesure des substances, pouvant interférer avec cette réaction, masquent la présence des gonadotropines et rendent impossible un dosage clinique.

Rappelons qu'un grand nombre d'électrophorèses, de chromatographies, etc. ont été suivies d'un dosage chimique des protéines ou des acides aminés présents dans les éluats. On ne peut pas cependant considérer les dosages au Folin, ou les mesures d'absorption dans l'UV, comme des dosages chimiques précis des gonadotropines. Ils ne sont pas spécifiques et ne constituent, par conséquent, qu'un moyen de vérification, par exemple de l'évolution de la purification.

b) *Observations personnelles sur le dosage des hormones gonadotropes par la méthode au Folin et par l'absorption dans l'ultraviolet (UV)*, fig. 14 et 15.

Nous avons établi des courbes d'étalonnage pour les produits commerciaux utilisés dans nos expériences. Ces courbes devaient nous permettre, par la suite, de trouver les relations existant entre les unités internationales, c'est-à-dire l'activité biologique d'une part et les valeurs obtenues après les analyses chimiques des gonadotropines d'autre part. Aussi bien pour la méthode au Folin que pour l'absorption dans l'UV, il est apparu que, si les courbes tracées appartiennent à la même famille, elles ne sont pas pour autant superposables (p. ex. Physex et Primogonyl, tous deux des gonadotropines chorioniques). Pour un même produit, la hauteur des courbes est inversement proportionnelle à la concentration initiale, exprimée en unités internationales et inscrite sur les ampoules (cf. fig. 14).

Comparant les courbes, après dosage au Folin, de l'Antex (PMS) et du Physex (PU) provenant l'un et l'autre d'ampoules à 3000 UI, l'unité internationale n'apparaît pas comme une mesure quantitative réelle, mais bien comme une mesure relative de l'activité caractéristique du produit envisagé.

Signalons aussi l'influence qu'exercent, entre autres, la nature et le pH du solvant des gonadotropines commerciales sur la densité optique : le tampon véronal-acétate à pH 5,8 et pH 8,6 abaisse considérablement les valeurs trouvées avec du NaCl 8 $^0/_{00}$ qui sont, elles, plus basses que celles obtenues avec de l'eau distillée.

Il est donc évident que ces courbes ne peuvent être mises à profit pour le dosage chimique des gonadotropines urinaires.

Ayant constaté la valeur douteuse des différentes courbes d'étalonnage au Folin, nous avons préféré utiliser la méthode de dosage basée sur la mesure de l'absorption dans l'UV à 280 mμ. Les résultats sont alors exprimés en « γ-équivalent » d'une certaine protéine connue. On sait que l'absorption entre 276 et 281 mμ est due à la tyrosine et au tryptophane, le pH pouvant varier entre 6 et 13. Comme substance de référence nous avons utilisé la γ-globuline bovine, l'albumine humaine et le Labtrol DADE; cette dernière solution est couramment utilisée comme solution de référence pour les dosages d'analyses médicales, puisqu'elle reproduit artificiellement, mais de façon constante, le sérum humain.

La figure 15 représente l'allure des courbes de la densité optique à 280 mμ en fonction de la quantité de chacune des trois substances de référence. Ce sont des droites parfaites, qui se prêtent beaucoup mieux à l'évaluation des résultats expérimentaux que les courbes de la fig. 14.

Néanmoins, dans nos expériences il nous a paru préférable de ne pas convertir les valeurs trouvées au spectrophotomètre en mg de protéines, mais d'adopter tout simplement pour nos mesures les valeurs de la densité optique multipliées × 1000.

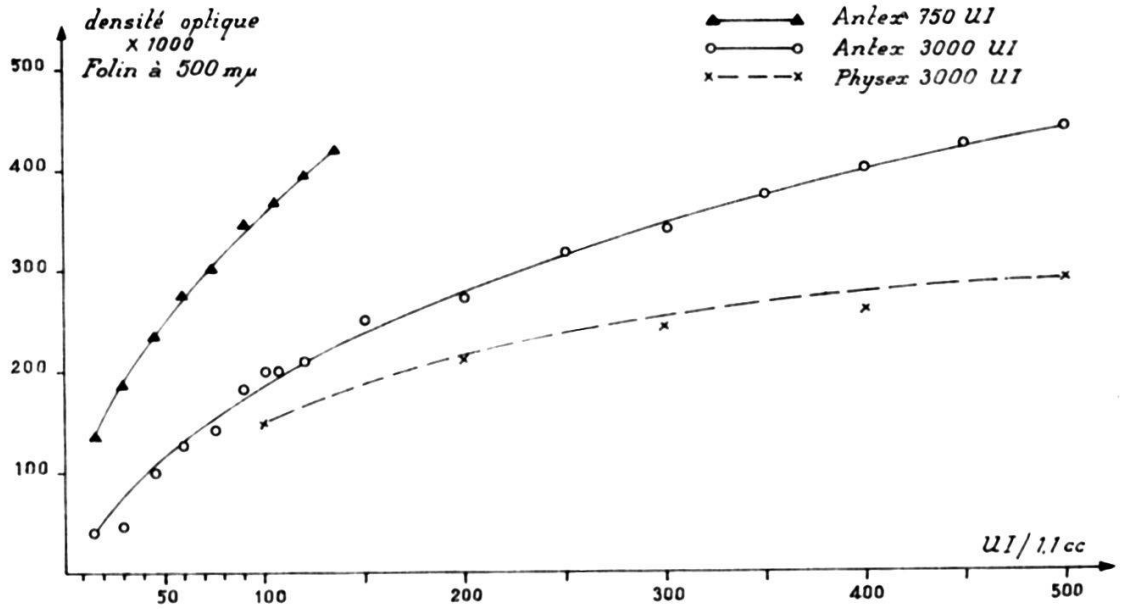


Fig. 14. — Courbes d'étalonnage au Folin (à 500 mμ) de gonadotropines provenant d'ampoules à différentes contenance.

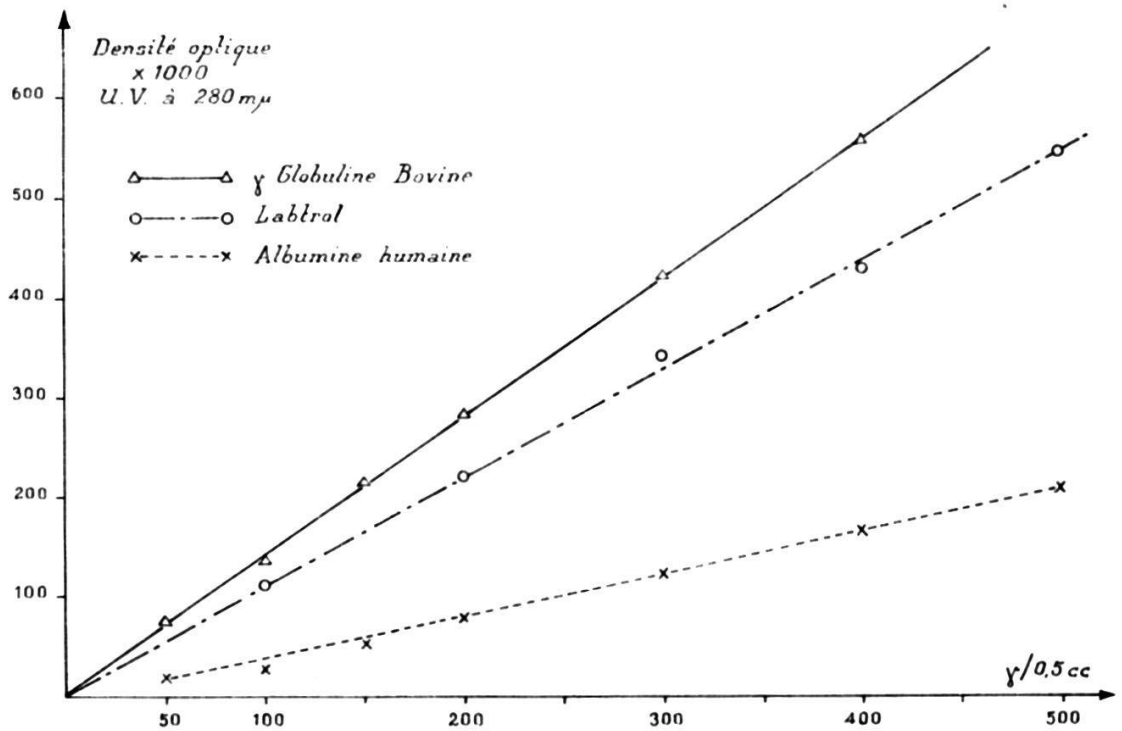


Fig. 15. — Courbes d'étalonnage de trois protéines différentes : γ-globulines bovines, Labtrol, albumine humaine.
Mesure de l'absorption en UV à 280 mμ.

2) Dosages polarographiques

a) *Travaux étrangers :*

La polarographie est devenue un instrument de travail très efficace et courant, surtout en chimie minérale, et cela à tel point que certains problèmes ne peuvent être résolus que par cette méthode. Il n'en est pas de même en chimie organique, où les substances étudiées doivent remplir des conditions bien déterminées. L'application de la polarographie à la recherche des stéroïdes, substances bien définies, a rencontré un certain succès. Mais, de façon générale, cette technique a relativement peu retenu l'attention en hormonologie et plus particulièrement dans le domaine des stimulines.

Balle-Helaers a publié une méthode de dosage des gluco-protéines urinaires, c'est-à-dire des gonadotropines (1957; 1958; 1959).

b) *Contribution à l'étude polarographique :*

Le Dr Neukomm eut l'idée d'étudier le comportement polarographique des gonadotropines et de mettre à profit la double-vague de Brdicka pour évaluer quantitativement le taux des gonadotropines urinaires (1951). Par la suite une étude plus systématique et plus approfondie a permis de fixer le mode opératoire et les conditions optimales de la méthode Peguiron (Peguiron, Neukomm 1954; Peguiron 1955). L'équation de la courbe d'étalonnage a été calculée, d'où la possibilité de déduire le pourcentage d'impureté accompagnant les différentes préparations commerciales examinées. Ces auteurs ont finalement admis que la polarographie permettait le dosage de la gonadotropine placentaire si l'on pouvait obtenir cette hormone dans un état tout à fait pur, car cette méthode constitue un excellent moyen de doser quantitativement une protéine connue.

Ces conclusions ont en fait également déterminé la poursuite des recherches sur des méthodes d'extraction et de purification des produits se trouvant dans des liquides physiologiques.

Nous avons donc repris la technique de Peguiron pour effectuer des mesures sur les éluats provenant des électrophorèses de gonadotropines (PMS et PU) faites soit sur papier, soit sur amidon (cf. fig. 12), mais en ayant au préalable établi de nouvelles courbes d'étalonnage.

De façon générale, nous avons fait les mêmes observations que pour les courbes d'étalonnage au Folin et à l'UV : pour une même quantité de gonadotropines mesurée en UI, les hauteurs des paliers sont variables; elles dépendent du produit envisagé, du lot de fabrication et de la concentration des ampoules. La très grande sensibilité de la polarographie accentue encore les facteurs interférents. On démontre aussi la nécessité de travailler avec un thermostat, puisque de faibles élévations de température entraînant une forte

augmentation des valeurs, ce qui est vraisemblablement dû à des altérations physiques des molécules.

A la suite de ces observations, nous avons jugé préférable de renoncer à convertir les résultats en unités internationales. Les concentrations des solutions sont exprimées en « hauteur - mm, rapportée à la sensibilité 1/100 ».

Dans ces conditions nous avons donc abouti à la même conclusion que nos prédécesseurs, à savoir que la polarographie n'est pas applicable pratiquement sur des produits insuffisamment purifiés selon une méthode non parfaitement reproductible. Cette méthode de mesure ne reprendra donc tout son intérêt qu'au moment où les méthodes d'extraction et surtout de purification seront au point et — étant donné l'extrême sensibilité de la polarographie — également au moment où il s'agira de doser de très petites quantités d'hormone purifiée.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Dans les pages qui précèdent, nous n'avons pas cherché à retracer un historique complet ni à énumérer toutes les nouvelles notions acquises au cours des dernières années dans le domaine des gonadotropines. Nous nous sommes limitée à étudier les possibilités d'un dosage chimique en vue de son application en clinique humaine. A cet effet il nous a paru utile de souligner certains obstacles techniques et quelques difficultés théoriques.

Connaissant la portée des équilibres physiologiques et biochimiques en hormonologie, il est indiscutable que la découverte d'un mode de détermination rapide et exact des deux activités biologiques dues aux hormones folliculo-stimulante et lutéinisante, c'est-à-dire la mise au point d'un dosage permettant leur mesure quantitative absolue et menant à l'établissement du rapport entre les deux facteurs, est de toute première importance. Une telle découverte trouverait sa pleine signification non seulement dans les mains des endocrinologues, cliniciens ou non, mais, comme nous l'avons dit dans l'introduction du sujet, également dans celles des cancérologues.

Il existe une différence de prime abord essentielle entre le test biologique et le dosage chimique. Si, au cours de l'extraction, la molécule gonadotrope subit une altération entraînant la perte de son activité biologique, les résultats fournis par les tests biologiques n'ont pratiquement plus aucune signification. La préservation de l'intégralité de la molécule hormonale constitue donc la condition fondamentale du test biologique. Au contraire, tout en observant certaines restrictions, on peut admettre que cette même inactivation des gonado-stimulines n'entrave en rien un dosage chimique, surtout si l'altération n'entraîne aucune dégradation structurale fondamentale de la molécule hormonale.

Dans les conditions générales d'un bon dosage des hormones en question figure également la nécessité de l'absence de toute autre substance étrangère qui puisse s'ajouter à la gonadotropine ou à son dérivé au moment de la mesure finale. Ces impuretés pourraient être, et sont probablement, des molécules biologiquement inactives, mais cependant chimiquement très voisines des gonadotropines, et présentes dès le début dans le mélange à analyser : de ce fait elles peuvent subir les mêmes transformations que les hormones qui nous intéressent. D'autres artéfacts pourraient être constitués par des molécules plus petites, se joignant aux dérivés des gonadotropines ou présentant, en raison de leurs fonctions identiques, les mêmes réactions au dosage final. On conçoit qu'il serait relativement malaisé d'évaluer dans quelles proportions l'on a affaire à des produits d'origine hormonale. De toute façon, on doit être en mesure de connaître les modifications successives des molécules gonadotropes survenues au cours des manipulations et de s'assurer de leur parfaite reproductibilité.

Théoriquement, pour aboutir au dosage quantitatif des gonadotropines on dispose de deux méthodes de travail : lorsqu'on possède des dosages spécifiques sûrs, on peut, dans certains cas, se contenter d'une extraction globale, suivie d'une purification plus ou moins grossière. Si, par contre, les dosages ne sont pas spécifiques, il est nécessaire d'exécuter au préalable une extraction sélective et une séparation chimique très poussée. En ce qui concerne les gonadotropines urinaires humaines, nous sommes forcée de reconnaître qu'il faut associer une séparation spécifique à l'extraction spécifique et trouver un mode de dosage également spécifique et ultra-sensible.

On a relevé à plusieurs reprises les difficultés infiniment plus grandes rencontrées lors des extractions urinaires comparativement à celles des extractions tissulaires, hypophysaires par exemple. La composition de ces diverses matières premières est très différente selon les cas : d'une part on est en face de cellules actives, faisant partie d'un organe humain et produisant des hormones natives, et d'autre part on a affaire à un liquide complexe dans lequel les produits d'excrétion se trouvent mélangés à leurs propres produits d'inactivation ainsi qu'aux divers produits des dégradations métaboliques provenant de l'organisme tout entier. Soulignons à ce propos que le dosage des stéroïdes hormonaux ne peut être comparé à celui des gonadotropines; ces dernières ne représentent qu'une infime partie des gluco-muco-protéines urinaires. De plus, les différences dans la constitution chimique des substances à activités biologiques dissemblables sont beaucoup moins évidentes dans le domaine des macromolécules.

Une autre difficulté doit être soulignée : il existe à l'heure actuelle une différence énorme entre les quantités d'hormones à doser en clinique et celles mises en jeu dans le cadre des travaux à but scientifique pur. C'est ainsi que l'activité spécifique d'un produit hautement purifié, mais encore contaminé malgré de nombreux stades de purification, est de 12 000 UI par milligramme, respectivement 12 UI par gamma; or ce chiffre représente précisément l'ordre de grandeur des valeurs à doser et à fractionner en deux constituants hormonaux au moins chez un sujet normal, à partir d'un volume urinaire d'environ un litre. On mesure alors les obstacles qui se dressent devant le chercheur. Il est vrai que dans la plupart des cas pathologiques qui nous intéressent principalement, les taux des gonado-stimulines sont incomparablement plus élevés, puisqu'ils atteignent facilement ceux rencontrés au cours de la grossesse.

Nos remerciements s'adressent tout d'abord à Mlles C. Boitel, M. Halmi et M. Kiraly pour leur aide technique. Par ailleurs, c'est avec gratitude que nous avons reçu des Maisons LEO (Copenhague) et SCHERING (Berlin) les échantillons d'hormones gonadotropes nécessaires à une partie de nos travaux.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit dieser Arbeit bezweckten wir einerseits einen allgemeinen Ueberblick über die biologischen sowie die chemischen und physico-chemischen Eigenschaften der gonadotropen Hormone zu gewähren, und andererseits die hauptsächlichsten Extraktions- und Purifikationsmethoden anzuführen. Dies bot uns die Gelegenheit, ebenfalls unsere eigenen Experimente und Resultate einzuflechten. Auf die rein biologischen Probleme dieser Substanzen mussten wir allerdings grössenteils verzichten.

Seit über einem Jahrzehnt hat man sich im « Centre anticancéreux romand » zu wiederholten Malen um die Auftrennung der menschlichen Gonadotropine im Harn in ihre beiden biologischen Komponenten (FSH-ICSH) bemüht. Das Ziel war, im Anschluss an die Auftrennung eine individuelle, exakte, chemische Auswertung auszuarbeiten, die für den Kliniker die verhältnismässig unzuverlässigen und vor allem unspeziefischen, globalen biologischen Teste ersetzen sollte.

Unsere hier veröffentlichten Experimente wurden mit pharmazeutischen Produkten ausgeführt. Die Standardkurven anhand der Gewichtszunahme infantiler Mäuseovarien wurden durch histologische Befunde ergänzt. Auffallenderweise kommt es selbst bei Chorion-Gonadotropinen, bei schwacher Dosierung, zu einer eindeutigen Follikelstimulierung (FSH) ; bei Serum-Gonadotropinen nimmt diese FSH-Reaktion einen physiologischen Charakter an.

Ferner bestätigten verschiedene Experimente, die grössere Labilität des ICSH. Dieser äusserst wichtige Punkt wird eingehend besprochen.

Vor Jahren hoffte man auf chromatographischem Wege eine Aufteilung der beiden Hormone zu erhalten. Obgleich eine systematische Durchtestung der Chromatographien in Bezug auf die Proteinkonzentration zwei Gipfel aufweist, befindet sich dennoch die biologische Wirksamkeit einheitlich in den ersten Eluaten vereinigt. Einerseits stellt man eine beträchtliche Aktivitätsverminderung in der Folge von Substanzverlust und partieller Inaktivation fest ; andererseits aber kann eine gewisse Purifikation nicht verneint werden.

Durch verschiedene Elektrophorese-Systeme erreichten wir eine schwache Aufteilung in FSH und ICSH, die aber noch kritisch beleuchtet werden muss.

Beide Zonen waren nie eindeutig getrennt. Die FSH-Fraktion der Chorion-Gonadotropine schien uns zu bedeutend und zudem fehlen vorderhand chemische Methoden, die im Stande wären grössenordnungsmässig die klinischen Werte zu erfassen.

Es wird schliesslich die Möglichkeit, diese Hormone chemisch oder polarographisch zu messen, besprochen. Trotz der sehr grossen Empfindlichkeit, vor allem letzterer Methode, scheint sie uns hier noch nicht angebracht, denn die Unmöglichkeit, die Substanzen in genügend hoch gereinigtem Zustande einfach und rasch herzustellen, steht im Wege.

SUMMARY

In this work we have mentioned the main biological, chemical and physico-chemical properties of the gonadotropines and listed the various methods of extraction and purification. This gave us the opportunity to include also our personal results. The purely biological problems of these hormones were left aside.

For over ten years, and on various occasions, different scientists have tried in the « Centre anticancéreux romand » to separate the two biological activities, FSH and ICSH, in human urine. The aim is to replace the rough, biological tests, carried out clinically, by a method of exact, chemical analysis.

Our experiments were performed with pharmaceutical products. The stimulated ovaries of immature mice were used to establish the standard-curves for the weight-increase-test and to be examined for their histological changes.

We noticed very clearly a follicle-stimulation after injection of small doses of chorion-gonadotropines ; at the same doses, the FSH-reaction of serum-gonadotropines is stronger, physiological.

By different experiments we could observe the high lability of ICSH and paid a special attention to this point.

The eluats of the chromatographies of either gonadotropines show definitely two pics in the protein-concentration, but the biological activities remain in the first fractions.

A relatively high loss of activity due partially to mechanical loss and partially to spontaneous inactivation becomes evident. Nevertheless a certain purification of the initial substance has taken place.

After electrophoresis we observed a slight resolution which should be studied in details. Both zones are not clearly separated. The fraction containing the FSH activity of the chorion-gonadotropines seems to be too large. Finally one must admit, that no chemical method is capable of measuring accurately the clinical values of the gonadotropines.

The possibility of a chemical or polarographic analysis of the gonadotropines is discussed. Although these methods, and especially the last one, are very sensitive, it seems that we cannot yet use them, the chief reason for this being the difficulty to obtain very pure hormones quickly and by a simple method out of a 24-hours sample of human urine.

Bibliographie *

Albert A. 1955. — *Proc. Staff Meet. Mayo Clin. 30,* 552.
— 1956 a). — *Recent Progr. Horm. Res. 12,* 227.
— 1956 b). — *Proc. Staff Meet. Mayo Clin. 31,* 341.
— , Borth R., Diczfalusy E., Loraine J. A., Lunenfeld B., Mc Arthur J. W. et Rosemberg E. 1958. — *J. Clin. Endocr. and Metab. 18,* 1117.
— et Derner J. 1960. — *J. Clin. Endocr. and Metab. 20,* 858.
— et Kelly Sh. 1958 a). — *J. Clin. Endocr. and Metab. 18,* 1067.
— et — 1958 b). — *J. Clin. Endocr. and Metab. 18,* 1216.
— — et Kobi J. 1958. — *J. Clin. Endocr. and Metab. 18,* 843.
— — , Silver L. et Kobi J. 1958. — *J. Clin. Endocr. and Metab. 18,* 600.
— — — — et Bloodsworth L. 1958. — *J. Clin. Endocr. and Metab. 18,* 452.
— , Paulsen C. A., Maddock W. O., Mellinger R. C. et Kline J. T. 1958. — *J. Clin. Endocr. and Metab. 18,* 1428.
— et Rosemberg E. 1959. — *J. Clin. Endocr. and Metab. 19,* 518.
— et Silver L. 1957. — *Endocr. 61,* 587.

Alexandritis D., Apostolakis M. et Voigt K. D. 1958. — *Acta Endocr. 29,* 537.

Antoniades H. N., Pennel R. B., Mc Arthur J. W., Ingersoll F. M., Ulfelder H. et Oncley J. L. 1957. — *J. Biol. Chem. 228,* 863.

Apostolakis M. et Voigt K. D. 1958. — *Acta Endocr. 28,* 54.

Aron Cl., Asch L. et Gaudan R. 1958. — *Ann. Endocr. 19,* 603.

Aschheim P. 1951. — Le biodiagnostic de la grossesse par la réaction de l'hyperémie ovarienne chez le rat. *Expansion scientifique française.*

Aschheim S. 1928. — *Vortrag Berliner Gyn. Gesellschaft.*
— 1933. — *Arch. f. Gynäk. 155,* 44.
— et Zondek B. 1927. — *Klin. Wochenschr. 6,* 1322.

Balle-Helaers E. 1957. — *Bull. Soc. Roy. Belg. Gyn. Obst. 27,* 633.
— 1958. — *Clin. Chim. Acta, 3,* 51.
— 1959. — *6th Coll. Bruge, Protides of Biol. Fluids,* 59.

Benard, Cruz-Horn, Moreau, Lalande et Raubert 1952. — *Ann. Endocr. 13,* 310.

Benz F., Borth R., Brown P. S., Crooke A. C., Dekanski J. B., Diczfalusy E., Loraine J. A., Lunenfeld B. et Schueler W. 1959. *J. Endocr. 19,* 158.

Bigwood E. J. et Wodon C. 1952. — *Arch. Internat. Physiol. 60,* 207.

Borth R., Diczfalusy E. et Heinrichs H. D. 1957. — *Arch. f. Gynäk. 188,* 497.
— , Linder A. et Lunenfeld B. 1959. — *Acta Endocr. 31,* 192.
— , Lunenfeld B., Riotton G. et de Watteville H. 1956. — *Arch. f. Gynäk. 188,* 112.
— — — — 1957. — *Experientia 13,* 115.

* Cette bibliographie a été arrêtée à fin octobre 1960.

BORTH R., LUNENFELD B. et DE WATTEVILLE H. 1957. — *Fertility and Sterility 8*, 233.
— — — 1958. — *Acta Endocr. 29*, 531.

BOURRILLON R. et GOT R. 1957. — *Acta Endocr. 24*, 82.
— — 1959. — *Acta Endocr. 31*, 559.
— — 1960. — *Acta Endocr. 35*, 221.
— — et MARCY R. 1956. — *Bull. Soc. Chim. Biol. 38*, 1165.
— — — 1958. — *Bull. Soc. Chim. Biol. 60*, 97.
— — — 1959 a. — *Acta Endocr. 31*, 553.
— — — 1959 b. — *Nature* (London) *184*, 983.
— — — 1960. — *Acta Endocr. 35*, 225.

BRADBURY J. T., BROWN E. S. et BROWN W. E. 1949 a. — *Federat. Process 8*, 15.
— — — 1949 b. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71*, 228.

BROWN J. B., KLOPPER A. et LORAINE J. A. 1958. — *J. Endocr. 17*, 401.

BROWN P. S. 1955. — *Endocr. 13*, 59.
— 1956 a. — *J. Endocr. 13*, 178.
— 1956 b. — *J. Endocr. 14*, 129.
— 1956 c. — *J. Endocr. 14*, 257.
— 1957. — *J. Clin. Endocr. and Metab. 17*, 805.
— 1958 a. — *J. Endocr. 17*, 329.
— 1958 b. — *Proc. Roy. Soc. Med. 51*, 554.
— 1959. — *J. Endocr. 18*, 46.

BUTT W. R. 1956. — *J. Endocr. 13*, 167.
— 1957. — *J. Endocr. 15*, LIX.
— 1958. — *J. Endocr. 17*, 143.
— et CROOKE A. C. 1953. — *Ciba Found. Coll. Endocr. 5*, 44.
— — et CUNNINGHAM F. J. 1958. — *J. Endocr. 17*, 1.
— — — 1959 a. — *Acta Endocr. 30*, 378.
— — — 1959 b. — *Acta Endocr. 32*, 509.
— —, INGRAM J. D. et ROUND B. P. 1957. — *J. Endocr. 16*, 107.
— et DERIAZ R. E. 1953. — *Biochem. J. 54*, XXXVIII.
— et INGRAM J. D. 1957. — *J. Endocr. 16*, II.
— et ROUND B. P. 1958. — *J. Endocr. 17*, 75.

CHOW B. F., GREEP R. et VAN DYKE H. B. 1939. — *J. Endocr. 1*, 440.

CLAESSON L., HOGBERG B., ROSENBERG TH. et WESTMAN A. 1948. — *Acta Endocr. 1*, 1.

CLARINGBOLD P. J. et LAMOND D. R. 1957. — *J. Endocr. 16*, 86.

COLE H. H., GOSS H. et BODA J. 1950. — *J. Clin. Endocr. 10*, 432.
— et HART G. H. 1930 a. — *Am. J. Physiol. 93*, 57.
— — 1930 b. — *Am. J. Physiol. 94*, 597.
—, PENCHARZ R. J. et GOSS H. 1940. — *Endocr. 27*, 548.

CROOKE A. C. 1958. — *Pathophysiologica Dienceph.*, 647.
— et BUTT W. R. 1952. — *Proc. Roy. Soc. Med. 45*, 805.
— — 1959. — *J. Obst. Gynaek. Brit. 60*, 297.
— —, INGRAM J. D. et ROMANCHUCK K. 1954. — *Lancet 1*, 379.
— — — et ROUND B. P. 1958. — *Ciba Found. Coll. Endocr. 12*, 208.

DEKANSKI J. 1949. — *Brit. J. Exp. Path. 30,* 272.

DEMOL R., FANARD A., BOUTE J., LEFEBURE R. et SOETE M. 1957. — *Bull. Soc. Roy. Belge Gyn. Obst. 27,* 609.
— —, SOETE M. et VERVISCH A. 1957. — *Bull. Soc. Roy. Belge Gyn. Obst. 27,* 615.

DICZFALUSY E. 1953. — *Acta Endocr.*, suppl. 12.
— et HEINRICHS H. D. 1956. — *Arch. f. Gynäk. 187,* 556.

DRESCHER J. 1954. — *Acta Endocr. 15,* 325.

VAN DEN DRIESSCHE R. et HANS M. J. 1952. — *Ann. Endocr. 13,* 485.

DUTSIN J. P., MEDARD O., WODON C. et BIGWOOD E. J. 1952. — *Arch. internat. Physiol. 60,* 208.
—, WODON C., MEDARD O. et BIGWOOD E. J. 1952. — *Ann. Endocr. 13,* 687.

EMMENS C. W., CLARINGBOLD P. J. et LAMOND D. R. 1957. — *Nature* (London) *180,* 38.

EVANS H. M. et SIMPSON M. E. 1950. — *Pincus II,* 351.

FLORSHEIM W. H., VELCOFF SH. M. et BODFISCH R. E. 1959. — *Acta Endocr. 30,* 175.

FRAENKEL-CONRAT H. L., SIMPSON M. E. et EVANS H. M. 1940. — *Sciences 91,* 363.

FRAHM H. et SCHNEIDER W. G. 1957. — *Acta Endocr. 24,* 106.

GADDUM J. H. 1953. — *J. Pharm.-Pharmacol. 5,* 345.

DE GENNES L., MOUKHTAR M. S. et BAILLET J. 1955. — *Am. Biol. Chem. 13,* 379.

VAN GILSE H. A. 1955. — *Nature* (London) *175,* 686.
—, NASS C.A. et KASSENAAR A. A. H. 1957. — *Acta Endocr. 24,* 91.

GITSCH E. 1959. — *Acta Endocr. 30,* 1.

GORBMAN A. 1945. — *Endocr. 37,* 177.

GOT R. 1959. — Gonadotropine choriale humaine. — *Thèse, Paris.*
— LEVY G. et BOURRILLON R. 1959. — *Experientia 15,* 480.

GREEP R. O., VAN DYKE H. B. et CHOW B. F. 1942. — *Endocr. 30,* 635.

GURIN S. 1942. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 49,* 48.

GUYÉNOT E. 1945. — *Experientia 1,* 1.
— 1946. — *Rev. Suisse Zool. 53,* 1.
— et HELD E. 1941. — *Rev. Suisse Zool. 48,* 377.

HAMBURGER CH. 1931. — *Ugesk. f. laeger 93,* 27.
— 1950. — Dans *Horm. Assay* de EMMENS.
— 1957. — *Acta Endocr.* suppl. *31,* 59.
— et JOHNSEN S. G. 1957. — *Acta Endocr. 26,* 1.

HEINRICHS H. D. et EULEFELD F. 1960. — *Acta Endocr.*, suppl. 53.

INGRAM J. D., BUTT W. R. et CROOKE A. C. 1954. — *Nature* (London) *173,* 85.

JOHNSEN S. G. 1955 a. — *Acta Endocr. 20,* 101.
— 1955 b. — *Acta Endocr. 20,* 106.
— 1958. — *Acta Endocr. 28,* 69.

KATZMAN P. A. et DOISY E. A. 1934. — *J. Biol. Chem. 106,* 125.
—, GODFRIED CAIN C. K. et DOISY E. A. 1943. — *J. Biol. Chem. 148,* 501.

KLINEFELTER M. F., ALBRIGHT F. et GRISWOLD G. 1943. — *J. Clin. Endocr. 3,* 529.

KLINGSOYR L. et STÖA K. F. 1955. — *Acta Endocr. 8,* 288.

LAMOND D. R. 1958. — *J. Endocr. 17,* 218.
— et BRADEN A. W. H. 1959. — *Endocr. 64,* 922.
— et CLARINGBOLD P. J. 1958. — *J. Endocr. 16,* 298.
— et EMMENS C. W. 1959. — *J. Endocr. 18,* 251.

LEGAULT-DEMART J. 1960. — Purification et propriétés de l'hormone gonadotrope sérique de jument gravide. Paris.
— , CLAUSER H. et JUTISZ H. 1958. — *Biochim. Biophys. Acta 30,* 169.

LI C. H. 1949. — *Vit. Horm. 7,* 224.
— 1958. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98,* 839.
— 1960. — *Ciba Found. Coll. Endocr. 13,* 46.
— et EVANS H. M. 1948. — *Pincus 1,* 631.
— — et WONDER D. H. 1940. — *J. Gen. Physiol. 23,* 733.
— et HARRIS J. 1952. — *Ann. Rev. Biochem. 21,* 603.
— et PEDERSEN K. O. 1952. — *J. Gen. Physiol. 35,* 629.
—, SIMPSON M. E. et EVANS H. M. 1940. — *Endocr. 27,* 803.
—, SQUIRE P. G. et GRÖSCHEL U. 1960. — *Arch. Biochem. Biophys. 86,* 110.

LORAINE J. A. 1950. — *J. Endocr. 6,* 319.
— 1952. — *J. Obst. Gynaek. Brit. 59,* 536.
— 1956. — *Vit. Horm. 14,* 305.
— 1957. — *Acta Endocr. 31,* 75.
— 1958. — The clinical application of hormone assay. — Ed. Livingstone Ltd.
— et BROWN J. B. 1954. — *Acta Endocr. 17,* 250.
— — 1956. — *Clin. Rev. Endocr. 16,* 1180.
— — 1959. — *J. Endocr. 18,* 77.
— et DICZFALUSY E. 1958. — *J. Endocr. 17,* 425.

LOSTROH A. J., SQUIRE P. G. et LI C. H. 1958. — *Endocr. 62,* 833.

LYONS R., SIMPSON M. E. et EVANS H. M. 1953. — *Endocr. 50,* 674.

MANDL A. 1957. — *J. Endocr. 15,* 448.

MC ARTHUR J. W. 1952. — *Endocr. 50,* 304.
— , INGERSOLL F. et WORCESTER J. 1958. — *J. Clin. Endocr. Metab 18,* 460.
— , WORCESTER J. et INGERSOLL F. 1958. — *J. Clin. Endocr. Metab 18,* 1186.

MC SHAN et MEYER 1940. — *J. Biol. Chem. 135,* 473.

MORRIS C. J. 1955. — *Brit. Med. Bull. 11,* 101.

NEUKOMM S. 1951. — *Experientia 7,* 349.
NOWELL N. W. et CHESTER-JONES J. 1957. — *Acta Endocr. 25,* 273.

PAYNE R. W. et RUNSER R. H. 1958. — *Endocr. 62,* 313.
PEGUIRON M. E. 1955. — *Mem. Soc. vaud. Sc. nat. 11,* 1.
— , PEGUIRON L. et NEUKOMM S. 1954. — *Arch. Internat. Pharmaco-dynamique et thérapie, 96,* 447.
PETERSON E. A. et SOBER H. A. 1956. — *Am. Chem. Soc. 78,* 751.
PHILIPP E. 1930. — *Zentralbl. f. Gynäk. 54,* 1858.
PIERCE B., DIXON F. et VERNEY E. 1858. — *Cancer Res. 18,* 204.
PONSE K. et un groupe d'élèves 1958. — *Ann. Endocr. 19,* 809.

RAACKE J. D., LI C. H. et LOSTROH A. J. 1954. — *Acta Endocr. 17,* 366.
— , LORAINE J. A., BODA J. H. et LI C. H. 1957. — *Acta Endocr. 26,* 377.
— , LOSTROH A. J. et LI C. H. 1958. — *Arch. Biochem. Biophys. 77,* 138.
RIGAS D. A., PAULSEN C. A. et HELLER C. G. 1958. — *Endocr. 62,* 738.
RINGLER J. et KLIMAN A. 1958. — *Endocr. 63,* 135.
ROSEMBERG E., SMITH F. et DORFMANN R. 1957. — *Endocr. 61,* 337.
ROSENBUSCH-WEIHS D. E. 1960. — *Rev. Suisse Zool. 67,* 387.
ROOS P. et GEMZELL C. A. 1960. — *Ciba Found. Coll. Endocr. 13,* 209.

SCHNEIDER W. G. et FRAHM H. 1955 a. — *Acta Endocr. 20,* 279.
— — 1955 b. — *Acta Endocr. 20,* 286.
— — 1956 a. — *Naturwissenschaften 43,* 61.
— — 1956 b. — *4e Symposium, Dtsch. Gesell. Endocr.*
— — 1956 c. — *Acta Endocr. 23,* 338.
— — 1961. — *Acta Endocr. 36,* 417.
SCOTT L. D. 1941. — *Brit. J. Exp. Path. 21,* 320.
SEEGAR-JONES G. E., GEY G. O. et GEY M. K. 1943. — *Bull. John Hopkins Hosp. 72,* 26.
SEGALOFF A. et STEELMAN S. L. 1959. — *Recent Progr. Horm. Res. 15,* 127.
— —, EVERETT C. et FLORES A. 1959. — *J. Clin. Endocr. Metab. 19,* 827.
SPIELMANN M. A. et MEYER R. K. 1938. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 37,* 623.
SQUIRE P. G. et LI C. H. 1958. — *Science 127,* 32.
— — 1959. — *J. Biol. Chem. 234,* 520.
STEELMAN S. L. 1958. — *Biochem. Biophys. Acta 27,* 405.
— , KELLY T. L., SEGALOFF A. et WEBER G. F. 1956. — *Endocr. 59,* 256.
— et POHLEY F. M. 1953. — *Endocr. 53,* 604.
— et SEGALOFF A. 1959. — *Recent Progr. Horm. Res. 15,* 115.
— — et ANDERS R. 1959. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101,* 452.
STEWART H. L. 1951. — *Am. J. Obst. Gyn. 61,* 990.

STRAN H. M. et JONES G. E. S. 1953. — *Bull. John Hopkins Hosp. 93*, 51.
— — 1954. — *Bull. John Hopkins Hosp. 95*, 162.
SWINGLE S. M. et TISELIUS A. 1951. — *Biochem. J. 48*, 171.

TAUBERT M. et WELLER O. 1956. — *Klin. Wochensch. 34*, 84.
TISELIUS A., HJERTEN S. et LEVIN O. 1956. — *Arch. Biochem. Biophys. 65*, 132.

WALTER K. 1957. — *J. Endocr. 15*, 119.
WARD D. N., MC GREGOR R. F. et GRIFFIN A. C. 1959. — *Biochem. Biophys. Acta 32*, 305.
WODON C. et BIGWOOD E. J. 1952. — *Bull. Federal Soc. Gynec. Obst. 4*, 889.
—, DUSTIN J. P. et BIGWOOD E. J. 1951. — *Arch. Internat. Physiol. 58*, 463.
WOODS M. C. et SIMPSON M. E. 1960. — *Endocr. 60*, 575.

ZARROW M. X., HAFEZ E. S. C., CALDWELL A. L. et PINCUS G. 1958. — *Endocr. 63*, 748.
ZILLIACUS W. 1953. — *Gynaecologia 135*, 161.
ZONDEK B. 1931. — *Klin. Wochensch. 10*, 212.
— et ASCHHEIM S. 1926. — *Deutsch. Med. Wochensch. 52*, 343.
— — 1927. — *Klin. Wochensch. 6*, 248.
— et SULMAN 1945. — *Vit. Horm. 3*, 297.

Manuscrit reçu à fin novembre 1961.

Rédaction : Mlle Suzanne Meylan, professeur, Treyblanc 6, Lausanne.
Publicité : M. R. Magliocco, En Martines, Le Mont, Lausanne.
Imprimerie Baud, place de la Riponne, Lausanne.