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.

Kapitel: A

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: 02.07.2025

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

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.

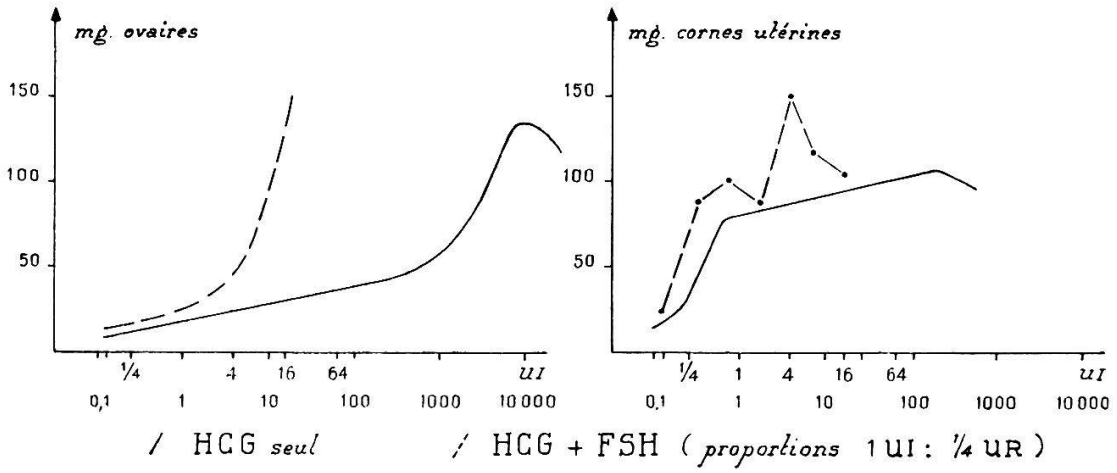

FIG. 2. — Stimulation pondérale des ovaires (monophasique) et des cornes utérines (biphasique) après administration de gonadotropines chorioniques soit seules soit associées à du FSH. (Selon HAMBURGER 1957)

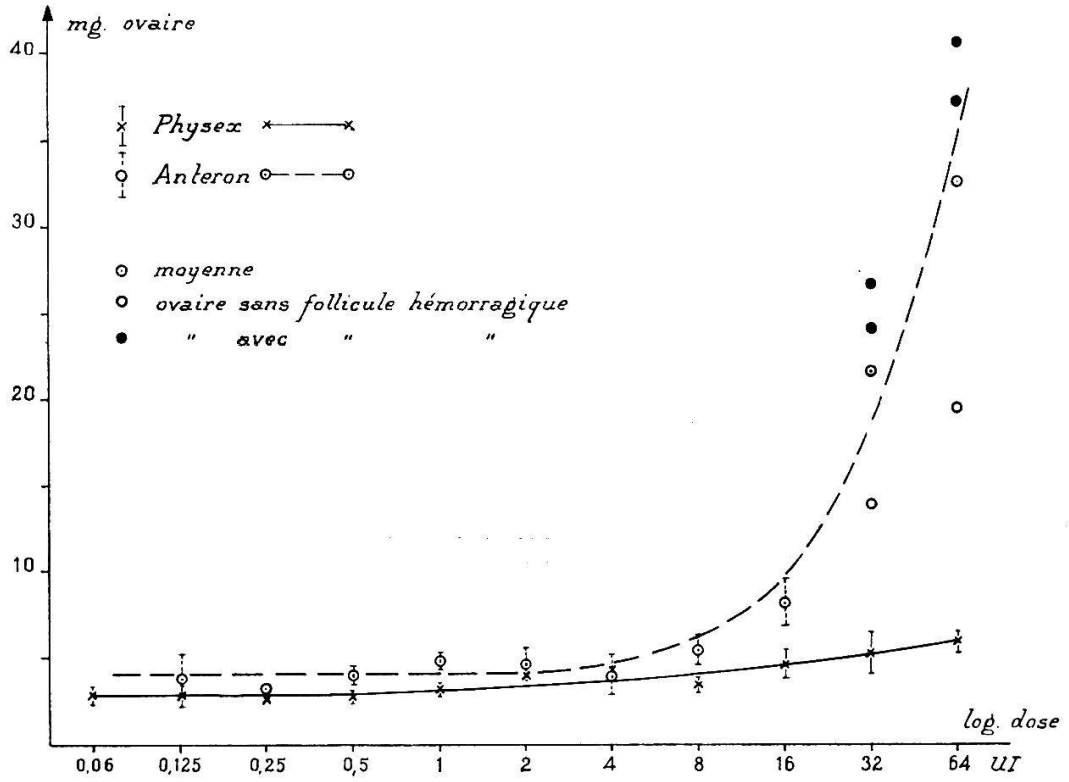

FIG. 3. — Test pondéral de l'ovaire de femelles de souris impubères recevant des doses croissantes de gonadotropines chorioniques (Physex) et sériques (Anteron).

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-