

ÉTUDE DE L'EXCRÉTION URINAIRE DES ŒSTROGÈNES CHEZ LA BREBIS PENDANT LA GESTATION

J. FÈVRE et P. ROMBAUTS

avec la collaboration technique de Ginette LÉPINE

*Laboratoire des Métabolismes,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas*

SOMMAIRE

L'étude de l'excrétion urinaire d'œstrogènes chez la Brebis gestante a été entreprise. Des recherches qualitatives, au moyen de réactions colorées spécifiques, de la chromatographie sur couche mince de gel de silice et des spectres d'absorption, ont permis de caractériser le 17- α -OH œstradiol, l'œstrone et un œstriol. L'étude quantitative par la méthode chimique de BROWN modifiée a montré que le 17- α -OH œstradiol est le principal métabolite urinaire. Il existe cependant des quantités relativement importantes d'œstrone et de faibles quantités d'œstriol. La courbe d'excrétion du 17- α -OH œstradiol est particulière. Ces valeurs commencent à s'élever vers le 70^e jour de gestation pour atteindre un premier maximum vers le 115^e jour. Il y a alors une chute de ces valeurs jusqu'au 140^e jour, puis une remontée finale jusqu'à la mise bas où les valeurs les plus élevées sont atteintes. La signification de ces résultats est discutée.

INTRODUCTION

La connaissance de la production d'hormones stéroïdes œstrogènes présente un grand intérêt pour l'étude des fonctions de reproduction chez les animaux domestiques. Elle peut permettre le contrôle du fonctionnement de l'ovaire au cours du cycle œstral, le contrôle du fonctionnement placentaire pendant la gestation (GREENE et TOUCHSTONE, 1963), ou même servir de diagnostic précoce de gestation quand les méthodes simples ne sont pas applicables, comme chez la Truie (LUNAAS, 1961). La détermination des quantités d'œstrogènes circulant dans le sang périphérique est très difficile car elles sont très inférieures à celles des autres hormones stéroïdes, de l'ordre du nanogramme. Le dosage des œstrogènes du sang n'est donc possible qu'à l'aide de techniques très sensibles telles que la double dilution isotopique, la fluorimétrie ou la chromatographie gazeuse.

L'analyse de l'excrétion urinaire reste donc le test le plus commode pour la mesure de la sécrétion journalière de ces hormones. Chez les Ruminants cette ana-

lyse est plus délicate qu'en clinique humaine. D'une part, une proportion importante de l'excrétion des œstrogènes s'effectue par la bile et la réabsorption intestinale est limitée ; la voie d'excrétion fécale ne peut donc être négligée. Ainsi, chez la Vache, EL-ATTAR et TURNER (1957) ont trouvé des quantités équivalentes d'hormones dans l'urine et les fèces. Les métabolites œstrogènes des fèces sont différents des métabolites urinaires, ce qui est vraisemblablement dû à l'action de la flore intestinale. WRIGHT (1962) a rapporté les difficultés rencontrées pour doser les œstrogènes dans les fèces. D'autre part, les fourrages consommés par ces animaux contiennent de nombreux pigments qui se retrouvent dans les excréta et gênent le dosage chimique. De plus, les Légumineuses, trèfles et luzernes, contiennent des quantités appréciables de composés présentant une activité œstrogène, notamment coumestrol et génistéine (BRADBURY et WHITE, 1954; BICKOFF et *al.*, 1962). Dans l'urine des ruminants on trouve des quantités importantes d'équol (isoflavane 7,4'-diol) (KLYNE et WRIGHT, 1957-1959), qui, s'il ne présente pas d'activité biologique œstrogène, peut interférer dans la réaction de Kober. Ceci explique que le problème de l'excrétion totale des œstrogènes chez les ruminants ne soit pas encore résolu. Néanmoins, dans la mesure où le pourcentage d'excrétion par la voie urinaire reste constant, on peut utiliser le dosage urinaire comme indice de la production globale d'œstrogènes. Nous avons commencé l'étude de l'importance relative des excréments fécale et urinaire à l'aide d'œstrogènes tritiés.

La détermination chimique des œstrogènes chez la Vache a été effectuée par EL-ATTAR et TURNER (1957), VELLE (1958 *a*), ROMMEL (1961), LECLERCQ et DERIVAUX (1962), NELSON et SMITH (1963), MELLIN, ERB et ESTERGREEN (1965). Deux très bonnes revues récentes ont fait le point des travaux sur cette espèce (VELLE, 1963; MELLIN et ERB 1965). KLYNE et WRIGHT (1957) ont fait une étude qualitative détaillée des métabolites urinaires chez la Chèvre (1957) et chez la Vache (1959). Chez la Brebis, les travaux sont très rares et aucune étude quantitative systématique n'était publiée au moment où nous avons commencé ce travail. Les estimations biologiques de BECK (1950) et BASSETT (1955) étaient faussées par la faible activité biologique du principal métabolite : l'œstradiol 17 α . VELLE (1958) avait constaté par méthode chimique que les teneurs urinaires d'œstrogènes étaient beaucoup plus faibles que chez la Vache. Enfin récemment MAZURJACK (1964) et surtout SKRZECZKOWSKI (1964) ont effectué une étude cinétique comparable à la nôtre.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — MATÉRIEL

Quatre brebis de race *Ile-de-France*, saillies par un bélier de race *Texel* furent maintenues en cage à métabolisme à partir du 50^e jour de gestation. Elles reçurent le même aliment sous forme de granulés de 5 mm qui apportait 150 g de matières azotées digestibles par jour. Les urines de 24 h, séparées des fèces, furent recueillies une fois par semaine pendant la plus grande partie de la gestation, puis quotidiennement durant les 10 jours précédant la date présumée de mise bas. Les urines ont été récoltées dans des seaux en polyéthylène avec une quantité d'acide chlorhydrique suffisante pour l'obtention d'un pH final de 4 à 5. Les échantillons ainsi récoltés furent conservés à — 15°C dans les cas où les dosages ne purent être effectués immédiatement. Cette conservation au froid et en milieu acide n'entraîne pas de pertes d'œstrogènes.

B. — MÉTHODES DE DOSAGE

a) *Analyse quantitative*

La méthode utilisée fut celle de BROWN (1955) qui permet la séparation de l'œstrone, des œstradiols et de l'œstriol. La méthode originale fut cependant adaptée à l'urine de Brebis :

— Dans la méthode originale, les œstrogènes urinaires qui se trouvent sous forme de glucuro-ou de sulfoconjugués, sont hydrolysés par hydrolyse acide. Cette hydrolyse acide par HCl à 15 p. 100 pendant 1 h à 100° libère de nombreuses substances interférentes et, surtout, entraîne la destruction du 17- α -OH œstradiol libre (VELLE, 1958 b ; SKRZECZKOWSKI, 1964). Elle fut remplacée par une hydrolyse enzymatique préconisée par JAYLE et al. (1959) : l'échantillon d'urine est amené à pH 4,8 ; il est ajouté ensuite un tampon acétate 2 M (1/10 du volume de l'échantillon) et l'échantillon est mis à incuber 22 h environ à 37°C avec du suc d'*Helix pomatia* (1 000 unités Fishman de β -glucuronidase et 8 000 unités Roy de sulfatase par ml d'urine).

— Après extraction à l'éther éthylique et lavage au carbonate de sodium pH 10,5, il a été procédé à deux lavages à la soude 8 p. 100 au lieu d'un seul. Le lavage supplémentaire permet l'élimination d'un plus grand nombre de pigments urinaires qui se trouvent en quantité importante dans l'urine de Brebis.

— Pour la purification des extraits urinaires, la saponification préconisée par BAULD (1956) puis par BROWN, BULBROOK et GREENWOOD (1957) a été adoptée.

— Après chromatographie d'adsorption sur colonne d'alumine qui permet l'obtention de trois fractions correspondant respectivement à l'œstrone, l'œstradiol et l'œstriol, les déterminations quantitatives colorimétriques des œstrogènes méthylés se font selon la réaction de Kober, mais le chromogène rose est extrait par un solvant organique, en l'occurrence une solution à 2 p. 100 de *para*-nitrophénol dans le tétrachlorure d'acétylène, suivant la technique d'ITTRICH (1958 et 1960). Les lectures au spectrophotomètre Jobin et Yvon ont été effectuées à trois longueurs d'onde afin d'appliquer la correction d'Allen :

pour l'œstrone et l'œstradiol à 510, 540 et 570 $m\mu$;

pour l'œstriol à 508, 538 et 568 $m\mu$,

la densité optique corrigée (d. o. c.) est respectivement :

$$\text{œstrone et œstradiol : d. o. c.} = \text{d. o. } 540 - \frac{\text{d. o. } 510 + \text{d. o. } 570}{2};$$

$$\text{œstriol : d. o. c.} = \text{d. o. } 538 - \frac{\text{d. o. } 508 + \text{d. o. } 568}{2}.$$

Ces modifications ont permis d'améliorer la sensibilité de la méthode et de l'abaisser à 1 μg d'œstrogènes excrétés par 24 h.

La méthylation suivie de la chromatographie sur colonnes d'alumine permet de séparer l'équol de l'œstradiol et évite ainsi la coloration parasite donnée par l'équol dans la réaction de Kober (KLYNE et WRIGHT, 1956).

b) *Analyse qualitative*

Deux moyens d'étude ont été utilisés :

1. *Réactions en milieu liquide* avec obtention de spectres d'absorption et de colorations caractéristiques. — C'est ainsi qu'a été réalisée la coloration de LUNAAS (1964) qui consiste à faire chauffer au bain-marie bouillant l'œstrogène en présence du réactif sulfurique à 40 p. 100. Les colorations sont différentes selon le temps de chauffage. De même a été essayée la réaction de KÄGI-MIESCHER (1939) caractéristique de l'isomère 17 α -OH de l'œstradiol : le stéroïde sec est mis en présence de 1 ml d'acide acétique glacial et de 50 μl d'acide sulfurique concentré, puis placé 5 mn au bain-marie bouillant.

Les composés purs de référence ont été :

| | |
|--|-------------------------|
| l'estra 1-3-5 (10) triène - 3 ol - 17 one | : œstrone |
| l'estra 1-3-5 (10) triène - 3-17 β -diol | : œstradiol 17 β |
| l'estra 1-3-5 (10) triène - 3-17 α -diol | : œstradiol 17 α |
| l'estra 1-3-5 (10) triène - 3-16 α -17 β -triol | : œstriol |

Pour l'obtention des méthyl-esters, ces composés ont été méthylés selon la méthode classique de BROWN (1955).

2. *Chromatographie sur couche mince* de 0,25 mm d'épaisseur de Gel de Silice G. — Deux systèmes de solvants parmi ceux qui ont été définis par LISBOA et DICZFALUSY (1962) furent utilisés :

| | | | |
|-----------|---|------------------|----|
| Système A | { | cyclohexane | 45 |
| | | acétate d'éthyle | 45 |
| | | éthanol absolu | 10 |
| Système C | { | acétate d'éthyle | 50 |
| | | cyclohexane | 50 |

Les réactions colorées destinées à la caractérisation des œstrogènes sur couches minces seront détaillées lors de l'exposé des résultats.

RÉSULTATS

I — *Étude qualitative*

a) *Réactions en milieu liquide.*

Elles ont été réalisées sur les fractions obtenues après chromatographie d'absorption sur colonne d'alumine. Les trois fractions obtenues ont été colorées selon KOBER-ITTRICH (1960). Les spectres d'absorption ont été effectués sur le spectrophotomètre enregistreur Bausch et Lomb, Spectronic 502. Les figures 1, 2 et 3 montrent que les composants des fractions recueillies après chromatographie et les composés purs présentent leur maximum d'absorption à la même longueur d'onde.

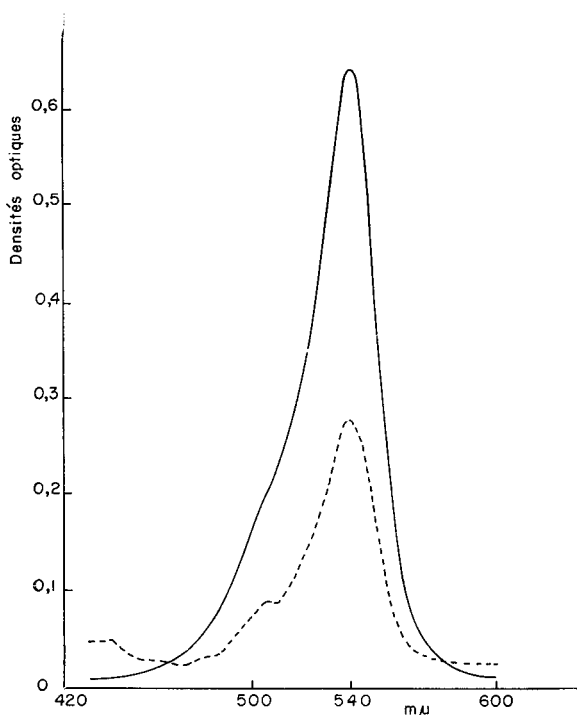


FIG. 1. — Spectres d'absorption des méthyl-esters d'œstrone colorés selon KOBER-ITTRICH

——— œstrone de référence
 - - - - - fraction « œstrone » urinaire

Il n'y a pas de différence entre la longueur d'onde du maximum d'absorption du méthyl-ester d'œstradiol 17 α , celle du méthyl-ester d'œstradiol 17 β et celle de l'extrait urinaire. De même sur la fraction chromatographique correspondant à l'œstradiol, a

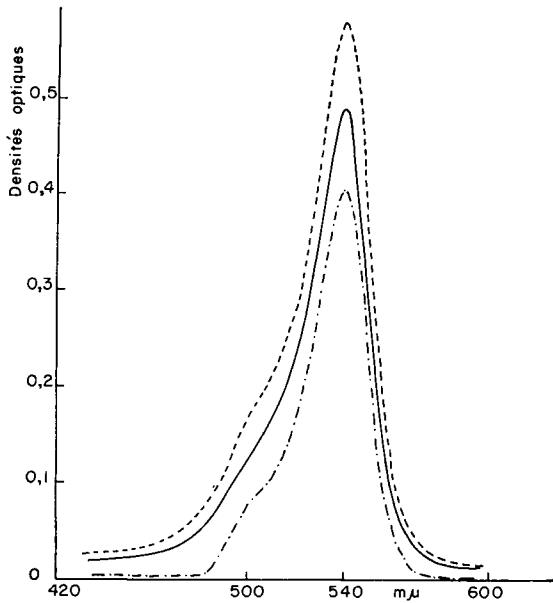


FIG. 2. — Spectres d'absorption des méthyl-esters d'œstradiol colorés selon KOBER-ITTRICH.

- œstradiol 17 α de référence
- - - - œstradiol 17 β de référence
- · - · - fraction « œstradiol » urinaire.

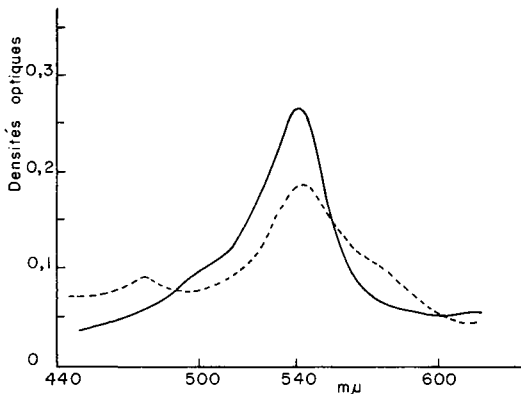


FIG. 3. — Spectres d'absorption des méthyl-esters d'œstriol colorés selon KOBER-ITTRICH

- œstriol de référence
- - - - fraction « œstriol » urinaire

été essayée la coloration de LUNAAS (1964) : au bout de 5 mn de chauffage seul l'isomère 17 α -OH donne une coloration rose. La figure 4 indique bien que l'œstradiol 17 β ne réagit pas dans ces conditions et que l'extrait urinaire contient de l'œstradiol 17 α . Après 60 mn de chauffage, l'œstradiol 17 β réagit et la coloration obtenue est la somme des colorations dues à chaque isomère. La quantité d'œstrogènes présents

est alors la même qu'après 5 mn de chauffage, ce qui indique qu'il n'y a pas d'œstradiol 17β détectable dans les extraits urinaires.

La réaction de KÄGI-MIESCHER (1939) essayée sur la fraction chromatographique correspondant à l'œstradiol a donné des résultats positifs. L'œstradiol 17α , seul, donne une coloration rose avec une intense fluorescence verte.

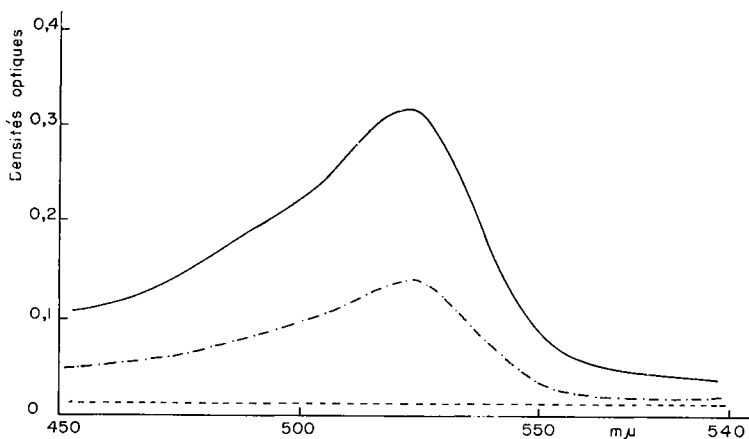


FIG. 4. — Spectres d'absorption de l'œstradiol coloré selon LUNAAS et extrait selon ITTRICH

— — — — — œstradiol 17α de référence
 - - - - - œstradiol 17β de référence
 fraction œstradiol urinaire

Les réactions colorées de BACHMAN (1939) et DAVID (1934-1935) spécifiques de l'œstriol n'ont pas permis, en raison des faibles quantités présentes, de mettre en évidence l'œstriol dans les extraits urinaires.

b) Chromatographie sur couche mince.

Dans les systèmes A et C de LISBOA et DICZFALUSY (1962) les R_f des composés étaient les suivants :

| | Système A | Système C |
|--------------------------------|-----------|-----------|
| Œstrone | — | — |
| Œstriol | 0,70 | 0,53 |
| Œstradiol 17α | 0,30 | 0,06 |
| Œstradiol 17β | 0,60 | 0,40 |
| | 0,62 | 0,45 |

On voit que le système C ne permet pas la migration de l'œstriol et qu'aucun de ces deux systèmes, le A surtout, ne permet la bonne séparation des isomères α et β de l'œstradiol. Aussi avons-nous dû caractériser ces deux isomères par des réactions colorées spécifiques de chacun :

— réaction à l'acide phosphomolybdique (ADLERCREUTZ et LUUKKAINEN, 1965). Les chromatogrammes sont révélés par une solution à 4 p. 100 d'acide phosphomolybdique dans l'éthanol, puis chauffés à 100°C. Au bout de 10 mn l'œstradiol 17α donne un spot bleu-violet sombre, alors que l'œstradiol 17β ne donne une tache bleue pâle qu'au bout de 30 mn ;

— réactions colorées d'AXELROD et PULLIAM (1960) :

Test II : le réactif est constitué de 4 g d'urée et de 0,3 g de chlorure stanneux dissous dans 10 ml d'acide sulfurique à 40 p. 100. Les chromatogrammes révélés par ce réactif, sont chauffés une heure à 100°C. Les composés purs ou méthylés réagissent de la même façon.

L'œstriol donne un spot bleu violacé, l'œstrone un spot orange foncé, l'œstradiol 17 β un spot orangé clair et l'œstradiol 17 α un spot rose.

Test V : il est constitué de deux réactifs : le réactif A est composé d'un mélange d'acide sulfurique concentré et de formol (2/1) et le réactif B composé d'un mélange à volume égal de chloroforme et d'anhydride acétique. Les chromatogrammes sont d'abord révélés par le réactif A, puis par le B. Après 20 mn de chauffage à 100°C, les composés méthylés donnent une réaction colorée : l'œstriol donne une tache violacée, l'œstrone rose orangée, l'œstradiol 17 β rose-brun, l'œstradiol 17 α violet clair.

— réaction à l'acide sulfurique de LISBOA et DICZFALUSY (1962). Cette réaction n'est valable que pour les composés méthylés. Les chromatogrammes sont révélés par une solution d'acide sulfurique à 2 p. 100 dans un mélange eau-éthanol (1/1), puis portés à 100°C. Au bout de 10 mn seul le méthyl-ester d'œstradiol 17 α donne une tache rose. Après 20 mn l'isomère 17 β donne un spot-jaune brun.

Après 1 heure de chauffage nous avons les réactions colorées suivantes :

| | |
|-----------------------|--------------------|
| œstrone | : rose-violet |
| œstradiol 17 α | : rose |
| œstradiol 17 β | : brun-rouge |
| œstriol | : violet très pâle |

Ces diverses réactions colorées ont été appliquées soit aux fractions recueillies après chromatographie sur colonne d'alumine, soit aux fractions obtenues par chromatographies sur couche mince successives.

L'œstrone a été identifié par les réactifs II et V d'AXELROD et PULLIAM. L'isomère d'œstradiol présent dans l'urine de Brebis est l'isomère 17 α -OH. Il a été caractérisé par le réactif sulfurique de LISBOA et DICZFALUSY et par le réactif phosphomolybdique d'ADLERCREUTZ et LUUKKAINEN. Nous n'avons pas mis en évidence d'œstradiol 17 β . L'œstriol a été identifié par le réactif V d'AXELROD et PULLIAM et par le réactif sulfurique de LISBOA et DICZFALUSY. Toutefois, la fraction recueillie après chromatographie sur colonne d'alumine et correspondant à l'œstriol, n'est pas pure. Elle contient au moins quatre composants dont une contamination par l'œstradiol 17 α . Les quantités de triol vrai dans cette fraction sont trop faibles pour nous permettre d'affirmer s'il s'agit bien de l'estra 1-3-5 (10) triène 3,16 α , 17 β triol ou de son 16 épimère.

En conclusion, l'urine de Brebis pendant la gestation contient de l'œstrone, de l'œstradiol 17 α , un œstriol, plus des composés non encore identifiés. La présence d'œstradiol 17 α semble bien établie, notamment grâce à la réaction de LUNAAS, de même que l'absence d'œstradiol 17 β . L'identification de ces métabolites œstrogènes n'est cependant pas complète. Nous pensons la poursuivre, en particulier, par l'étude des spectres infrarouges.

II — *Étude quantitative*

Les dosages selon la méthode exposée précédemment furent réalisés en double ou, parfois, en triple exemplaire. Les prises d'essais furent en général de 100 ml d'urine. Les pourcentages moyens de récupération furent respectivement de $91,2 \pm 6,4$ pour l'œstradiol 17α , $85,4 \pm 5,7$ pour l'œstrone et $67,8 \pm 3,6$ pour l'œstriol. Les résultats sont donnés en valeurs corrigées sauf pour l'œstriol car, ainsi que nous l'avons vu, la fraction « œstriol » est constituée de plusieurs composants et le pourcentage de récupération n'est connu que pour l'œstriol.

Pendant les deux premiers mois de la gestation, l'excrétion urinaire d'œstrogènes est très faible, à la limite de sensibilité de la méthode de dosage. Elle commence à augmenter lentement à partir du 70^e jour de gestation, puis plus rapidement à partir du 90^e jour. Le métabolite essentiel est l'œstradiol 17α . La courbe d'excrétion d'œstradiol 17α présente un aspect particulier caractéristique (fig. 5). A partir du 90^e jour de gestation, l'excrétion augmente rapidement pour atteindre des valeurs élevées vers le 115^e jour ($69,4 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ en moyenne). Vers le 140^e jour de gestation ces valeurs ont diminué de 30 p. 100 environ. Il se produit alors, de nouveau, une brusque remontée des valeurs de l'excrétion urinaire d'œstradiol 17α jusqu'à la mise bas où se situent les valeurs maximales de la gestation, particulièrement dans les 4 derniers jours ($78,6 \mu\text{g}/24 \text{ h}$, en moyenne, deux jours avant la mise bas).

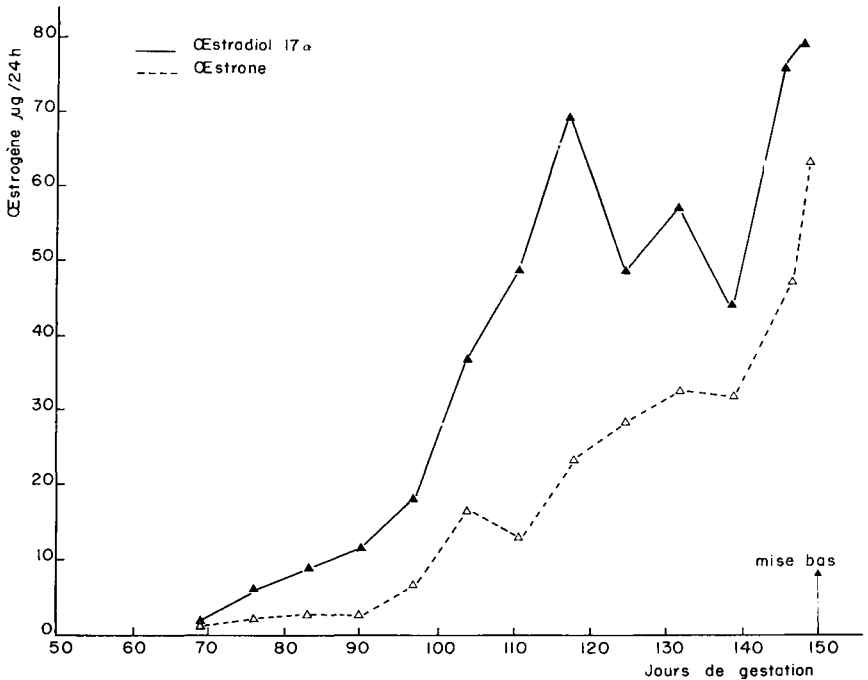


FIG. 5. — Variation de l'excrétion urinaire d'œstrone et d'œstradiol 17α chez la Brebis au cours de la gestation.

(moyenne de 4 animaux)

— œstradiol 17α
 - - - - - œstrone

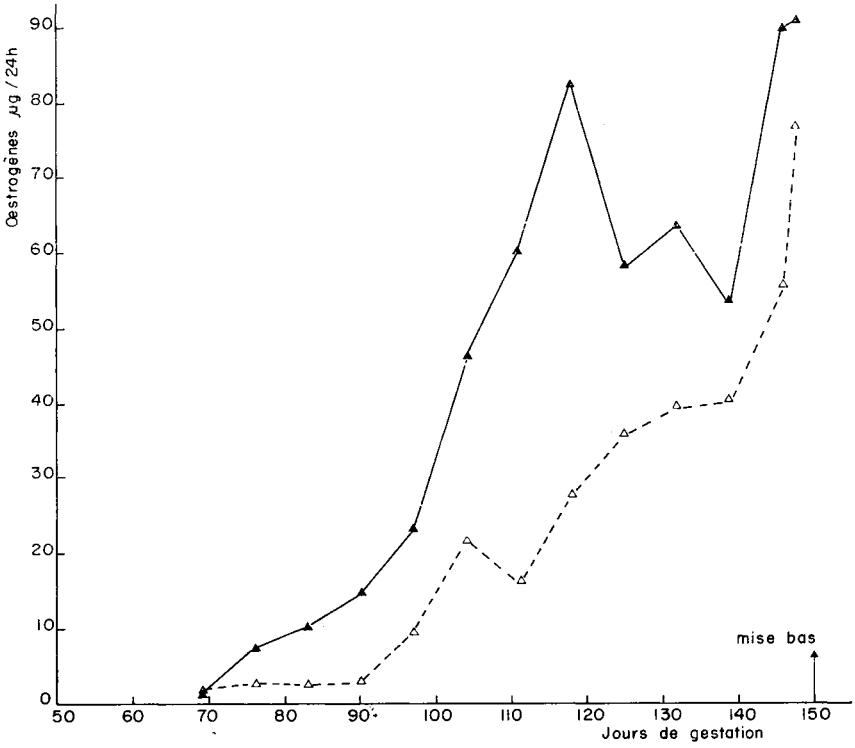


FIG. 6. — Excrétion urinaire d'œstrone et d'œstradiol 17α
(moyenne de trois brebis à gestation double)

— œstradiol 17α
- - - - - œstrone

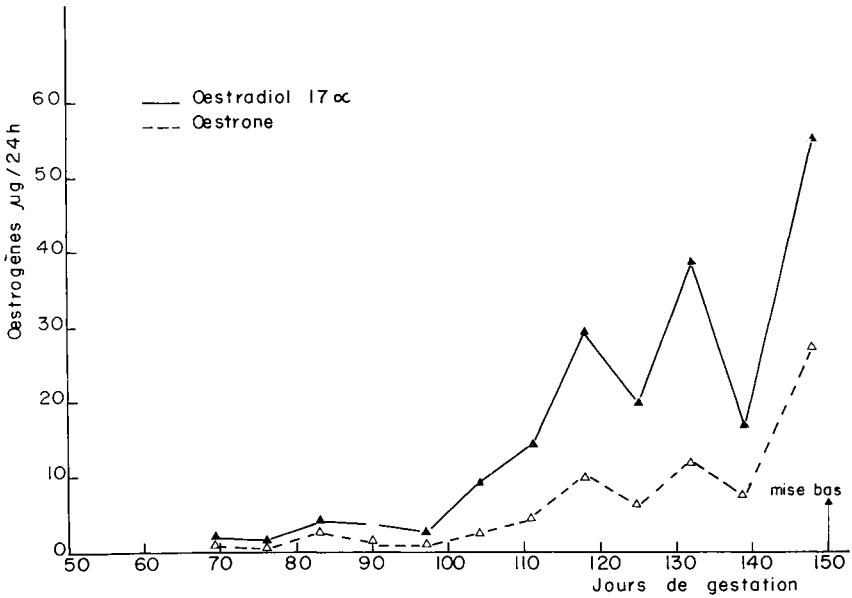


FIG. 7. — Excrétion urinaire d'œstrone et d'œstradiol 17α chez une brebis à gestation simple

— œstradiol 17α
- - - - - œstrone

L'élimination urinaire d'œstrone est régulière (fig. 5) : elle augmente progressivement jusque vers le 140^e jour de gestation. A ce moment les valeurs de l'excrétion d'œstrone augmentent rapidement. Les valeurs maximales sont également obtenues dans les derniers jours de la gravidité (63,4 µg/24 h, deux jours avant la mise bas), mais elles restent inférieures à celles d'œstradiol 17α.

TABLEAU I

Excrétion urinaire d'œstrogènes
(Les données sont exprimées en µg par 24 h)

| Jours de gestation. | 97 | 111 | 118 | 125 | 132 | 139 | 146 | 148 |
|--------------------------------|-------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| Œstradiol 17α | 18,1 | 48,5 | 69,4 | 48,6 | 57,2 | 43,9 | 76,3 | 78,6 |
| Œstrone | 6,5 | 13,0 | 23,4 | 28,0 | 32,4 | 31,7 | 45,6 | 63,4 |
| Fraction « œstriol » (1) | 8,35 | 12,7 | 21,0 | 39,7 | 26,2 | 13,6 | 29,1 | 33,7 |
| Total | 32,95 | 74,2 | 113,8 | 116,3 | 115,8 | 89,2 | 151,0 | 175,7 |

(1) Valeurs non corrigées, le pourcentage de récupération n'étant connu que pour l'œstriol.

TABLEAU 2

Variation individuelle de l'œstradiol 17α urinaire chez deux brebis
(Les données sont exprimées en µg par 24 h)

| Jours de gestation | 90 | 97 | 111 | 118 | 125 | 132 | 139 | 146 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Brebis 6522 | 15,6 | 26,4 | 53,1 | 79,7 | 37,1 | 86,7 | 58,9 | 141,2 |
| Brebis 6537 | 8,3 | 8,8 | 22,3 | 73,3 | 43,7 | 48,2 | 45,7 | 74,0 |

TABLEAU 3

Variation de l'excrétion urinaire d'œstrogènes totaux selon le nombre de fœtus
(Les données sont exprimées en µg par 24 h)

| Jours de gestation | 97 | 111 | 118 | 125 | 132 | 139 | 146 | 148 |
|------------------------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Brebis 2170 (1 fœtus) | 16,5 | 30,1 | 73,0 | 82,9 | 97,7 | 36,7 | 68,2 | 98,1 |
| Moyenne de 3 animaux (2 fœtus).... | 39,5 | 88,7 | 127,2 | 127,5 | 121,8 | 106,8 | 178,9 | 196,2 |

L'excrétion des stéroïdes contenus dans la fraction « œstriol » a une cinétique voisine de celle de l'œstradiol 17 α (tabl. 1), avec des valeurs élevées vers le 125^e jour de gestation, puis une chute au 140^e jour suivie d'une remontée les derniers jours précédant la mise bas. Rappelons que l'étude qualitative nous a permis de voir que l'œstriol vrai représente moins de 50 p. 100 de ces valeurs.

L'excrétion urinaire d'œstrogènes chez la Brebis présente des variations individuelles (tabl. 2). On ne peut donc pas affirmer, sur quelques animaux, que les variations d'excrétion entre le 125^e et le 140^e jour de gestation sont significatives. Toutefois, SKRZECKOWSKI (1964) utilisant une méthode d'hydrolyse différente a trouvé des variations comparables aux nôtres.

On note également une grande différence entre les brebis qui ont donné naissance à 2 agneaux et la brebis qui n'a eu qu'un seul agneau (tabl. 3, fig. 6-7).

DISCUSSION

L'œstrone est vraisemblablement l'hormone sécrétée par l'ovaire et les placentas chez la Brebis (SKRZECKOWSKI, 1964). Les variations d'excrétion d'œstradiol 17 α au cours de la gestation pourraient s'expliquer par des modifications de l'interconversion œstrone \rightleftharpoons œstradiol 17 α . La somme œstrone + œstradiol urinaires reste en effet à peu près constante entre le 118^e jour et le 139^e jour de gestation. Cependant, si l'on considère les œstrogènes totaux urinaires on constate que l'excrétion passe toujours par un minimum très net vers le 139^e jour, juste avant la brusque remontée de fin de gestation (tabl. 3). Cette chute précédant la brusque remontée finale a déjà été observée chez la Truie par ROMBAUTS (1962) et chez la Vache par ROMMEL (1961).

Le métabolisme des œstrogènes chez la Brebis semble, d'ailleurs, assez voisin de celui de la vache (EL-ATTAR et TURNER, 1957 ; ROMMEL, 1961). En effet, outre la similitude de la cinétique de l'excrétion, on peut constater que, pour ces deux espèces, le métabolite principal est l'œstradiol 17 α . MELLIN, ERB et ESTERGREEN (1965) ont en effet montré que, chez la Vache, l'élimination urinaire d'œstradiol 17 α est plus importante que celle d'œstrone, bien que cette dernière soit, au cours de la gestation, relativement grande. Certains auteurs dont ROMMEL (1961) avaient trouvé que le métabolite essentiel était l'œstrone, mais ils utilisaient l'hydrolyse acide qui détruit l'œstradiol 17 α .

L'excrétion des stéroïdes hormonaux œstrogènes urinaires chez la Brebis est très faible si on la compare à celle d'autres grands mammifères. Ainsi, en ne considérant que le métabolite principal, nous avons :

- 50 à 130 μ g d'œstradiol 17 α par jour chez la Brebis ;
- 6 000 à 12 000 μ g d'œstrone par jour chez la Truie (ROMBAUTS, 1962).
- 25 000 à 30 000 μ g d'œstriol par jour chez la Femme (BROWN, 1959).

On ne peut cependant pas conclure à une faible sécrétion hormonale durant la gestation. D'autres voies d'élimination sont en effet possibles et en particulier la voie biliaire et fécale. EL-ATTAR et TURNER (1957) ont montré que chez la Vache l'excrétion fécale était de même ordre que l'excrétion urinaire et que la bile était une voie importante de l'élimination des œstrogènes. WRIGHT (1962) estime que

pour la Brebis la voie fécale est 20 fois plus importante que la voie urinaire. Les premiers résultats d'une expérience en cours semblent mettre en évidence la part plus importante de l'élimination fécale des œstrogènes, mais son importance relative serait moindre que celle qui fut trouvée par WRIGHT : l'excrétion urinaire représenterait 10 p. 100 de l'excrétion totale.

Nous avons vu qu'en fin de gestation l'élimination des œstrogènes totaux passait par un minimum très net juste avant la brusque remontée précédant la parturition. On ne peut cependant pas conclure encore à une modification de la synthèse hormonale. Cette variation peut, en effet, être due à des modifications de l'utilisation de ces hormones par les organes cibles ou à des modifications de l'excrétion biliaire, de la circulation entéro-hépatique ou même du fonctionnement rénal.

Reçu pour publication en janvier 1966.

SUMMARY

URINARY EXCRETION OF ŒSTROGENS BY THE PREGNANT EWE

Urinary excretion of œstrogens by the pregnant ewe was studied. 17α -œstradiol, œstrone and « œstriol » were identified by means of absorption spectra (fig. 1, 2 and 3), thin-layer chromatography and specific colorations (fig. 4).

A modified BROWN'S chemical method was used to separate these metabolites and the Kober's reaction with the extraction proposed by ITTRICH, to quantify these œstrogens. The main urinary metabolite was found to be the 17α -œstradiol but there is a considerable amount of œstrone and fewer « œstriol » (table 1). The 17α -œstradiol excretion pattern is particular (fig. 5) : the values increase from 70th day to 115th day of pregnancy, decrease thenceforth to 139th day and increase again until parturition. The highest values are reached at the end of pregnancy (78,6 μ g daily two days before delivery).

The meaning of these results is discussed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADLERCREUTZ H., LUUKKAINEN T., 1965. Isolation and identification of 17α -œstradiol in the bile of a pregnant cow. *J. Reprod. Fertil.*, **9**, 137-147.
- AXELROD L. R., PULLIAM J. E., 1960. Color tests for the detection of sterols and estrogens on filter paper. *Arch. Bioch. Biophys.*, **89**, 105-109.
- BACHMAN C., 1939. Photometric determination of estrogens. II. A new color reaction for estriol. *J. Biol. Chem.*, **131**, 463-468.
- BASSET E. G., SEWELL O. K., WHITE E. P., 1955. Sex hormone studies on Sheep. *New. Zeal. J. Sci. Technol.*, **36**, 437-449.
- BAULD W. S., 1956. A method for the determination of œstriol, œstrone and œstradiol- 17β in human urine by partition chromatography and colorimetric estimation. *Biochem. J.*, **60**, 488-495.
- BECK A. B., 1950. Studies on the excretion of œstrogens by pregnant ewes. *Austral. J. agric. Res.*, **1**, 322-337.
- BICKOFF E. M., LIVINGSTON A. L., HENDRICKSON A. P., BOOTH A. N., 1962. Relative potencies of several estrogen-like compounds found in forages. *J. Agric. Food. Chem.*, **10**, 410-412.
- BRADBURY R. B., WHITE D. E., 1954. Estrogens and related substances in plants. In *Vitamins and Hormones*, **12**, 207-233 — Academic Press Inc., New York.
- BROWN J. B., 1955. A chemical method for the determination of œstriol, œstrone and œstradiol in human urine. *Biochem. J.*, **60**, 185-193.
- BROWN J. B., BULBROOK R. D., GREENWOOD F. C., 1957. An evaluation of a chemical method for the estimation of œstriol, œstrone and œstradiol- 17β in human urine. *J. Endocrinol.*, **16**, 41-48.

- BROWN J. B., 1959. Estrogen excretion of the pregnant woman. In LLOYD C. W., *Recent progress in the endocrinology of reproduction*, 335-344, Academic Press Inc., New York and London.
- DAVID K., 1934-35. Eine charakteristische Farbreaktion der Marrian-Kristalle (Trihydroxyœstrin). *Acta Brevia Neerlandica*, **4**, 64-65.
- EL-ATTAR T., TURNER C. W., 1957. Spectrophotofluorometric determination of estrogens in the urine and feces of cows during different stages of pregnancy. *Missouri Agric. Exper. Stn. Res. Bull.*, n° 641.
- GREENE J. W., TOUCHSTONE J. C., 1963. Urinary estriol as an index of placental function. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, **85**, 1-9.
- ITTRICH G., 1958. Eine neue Methode zur chemischen Bestimmung der östrogenen Hormone im Harn. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, **312**, 1-14.
- ITTRICH G., 1960. Untersuchungen über die Extraktion des roten Kober-Farbstoffe durch organische Lösungsmittel zur Östrogenbestimmung im Harn. *Acta Endocr.*, **35**, 34-48.
- JAYLE M. F., SCHOLLER R., JARRIGE P., METAY S., 1959. Hydrolyse des phénolstéroïdes conjugués urinaires. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **41**, 1593-1603.
- KÄGI H., MIESCHER K., 1939. Über Steroide. 20. Mitt. Eine neue Farbreaktion in der Steroidreihe Beiträge zur ihren Chemismus. *Helv. Chim. Acta*, **22**, 683.
- KLYNE W., WRIGHT A. A., 1956. Isolation of œstradiol-17 α and equol from pregnant goat's urine (Abst.). *Biochem. J.*, **62**, 21P.
- KLYNE W., WRIGHT A. A., 1957. Steroids and other lipids of pregnant goat's urine. *Biochem. J.*, **66**, 92-101.
- KLYNE W., WRIGHT A. A., 1959. Steroids and other lipids of pregnant cow's urine. *J. Endocrinol.*, **18**, 32-45.
- LECLERCQ M., DERIVAUX J., 1962. Détermination des œstrogènes urinaires chez la Vache en fin de gestation. *Ann. Endocrin.*, **23**, 103-109.
- LISBOA B. P., DICZFALUSY E., 1962. Separation and characterisation of steroid œstrogens by means of thin-layer chromatography. *Acta Endocr.*, **40**, 60-81.
- LUNAAS T., 1961. A new method for the detection and estimation of urinary œstrogens in the sow and its application for the early pregnancy diagnosis. *Acta vet. Scand.*, **2**, 301-310.
- LUNAAS T., 1964. Spectrophotometric methods for the analysis of mixtures of œstradiol-17 α and œstradiol-17 β . *Acta Chem. Scand.*, **18**, 321-328.
- MAZURCZAK J., 1964., cité par SKRZECZKOWSKI, L., 1964. *Métabolisme des œstrogènes chez la brebis* (polonais). Thèse de doctorat, Jablonna Kolo Warszawy.
- MELLIN T. N., ERB R. E., 1965. Estrogens in the bovine — A review — *J. Dairy Sci.*, **48**, 687-700
- MELLIN T. N., ERB R. E., ESTERGREEN V. L., 1965. Quantitative estimation and identification of estrogens in bovine urine. *J. Dairy Sci.*, **48**, 895-902.
- NELSON D. W., SMITH E. P., 1963. Urinary excretion of estrogenic compounds during estrus and gestation by the bovine as determined by three assay methods. *J. Dairy., Sci.*, **46**, 135-139.
- ROMBAUTS P., 1962. Excrétion urinaire d'œstrogènes chez la Truie pendant la gestation. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **2**, 151-156.
- ROMMEL P., 1961. *Untersuchungen zum quantitativen chemischen Östrogennachweis im Urine beim geschlechtstreifen weiblichen Rind und Pferd*. Thesis, Leipzig.
- SKRZECZKOWSKI L., 1964. *Métabolisme des œstrogènes chez la Brebis* (polonais). Thèse de Doctorat, Jablonna Kolo Warszawy.
- VELLE W., 1958 a. On the chromatographic isolation of two different Kober chromogens from pregnant cow's urine, with some remarks on the analytical procedure. *Acta Endocr.*, **27**, 64-72.
- VELLE W., 1958 b. *Recherches sur les œstrogènes naturels chez les ruminants et les porcins* (norvégien). Thèse doct., Norges Veterinaer-hogskole, Oslo.
- VELLE W., 1963. Gonadal hormones in domestic animals. In *Advances in veterinary science*, **8**, 115-187, Academic Press Inc., New York.
- WRIGHT A. A., 1962. Metabolism of œstradiol-17 β by an ovariectomized ewe. *J. Endocr.*, **24**, 291-297.