

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE STÉROÏDES CHEZ LES VERTÉBRÉS INFÉRIEURS ET LES OISEAUX

R. OZON

*Laboratoire d'Embryologie,
Faculté des Sciences, 9, quai Saint-Bernard, Paris - 5^e*

SOMMAIRE

A. — Corticostéroïdes.

B. — Progestérone :

1^o *Progestérone d'origine testiculaire.*

2^o *Progestérone d'origine ovarienne.*

C. — Stéroïdes sexuels androgènes et œstrogènes :

1^o *Stéroïdes androgènes C-19.*

2^o *Stéroïdes œstrogènes C-18.*

D. — Dosage des hormones stéroïdes œstrogènes dans le sang périphérique des Poissons, des Amphibiens et des Oiseaux.

E. — Conclusions.

Si la majorité des Vertébrés réagissent aux stéroïdes isolés des tissus des Mammifères, leur présence restait hypothétique chez les Poissons, les Amphibiens, les Reptiles et les Oiseaux. Depuis quelques années, un grand nombre de chercheurs ont abordé ce problème et les récentes recherches biochimiques résumées ici démontrent que les hormones du tissu interrénal et des gonades sont des stéroïdes chez les Vertébrés inférieurs comme chez les Mammifères. L'isolement d'hormones stéroïdes, chez les Vertébrés inférieurs, représente une voie récente de recherche en Endocrinologie comparée et ce mémoire expose l'état présent de la question.

Nomenclature systématique et noms usuels des stéroïdes cités dans ce travail

Nomenclature systématique	Noms usuels
prégna-5-ène-3 β -ol-20-one	prégnénolone
prégna-5-ène-3 β , 17 α -diol-20-one	17 α -hydroxyprégnénolone
prégna-4-ène-3,20-dione	progestérone
prégna-4-ène-17 α -ol-3,20-dione	17 α -hydroxyprogestérone
prégna-4-ène-20 β -ol-3-one	20 β -hydroxyprégna-4-ène-3-one
prégna-4-ène-21-ol-3,20-dione	désoxycorticostérone
prégna-4-ène-21,14 β -diol-3,20-dione	corticostérone
prégna-4-ène-21-ol-3,11-20-trione	11-déshydrocorticostérone
prégna-4-ène-11 β , 17,21-triol-3,20-dione	cortisol
prégna-4-ène-17,21-diol-3, 11,20-trione	cortisone
prégna-4-ène-11 β , 21-diol-18-al-3,20-dione	aldostérone
androsta-4-ène-17 β -ol-3-one	testostérone
androsta-4-ène-3,17-dione	androsténone
androsta-5-ène-3 β -ol-17-one	déhydroépiandrostérone
androsta-4-ène-3,11, 17-trione	11-cétoandrosténone
œstra-1,3,5(10)-triène-3-ol-17-one	œstrone
œstra-1,3,5(10)-triène-3,17 β -diol	œstradiol-17 β
œstra-1,3,5(10)-triène-3,17 α -diol	œstradiol-17 α
œstra-1,3,5(10)-triène-3,16 α , 17 β -triol	œstriol
œstra-1,3,5(10)-triène-3,16 β , 17 β -triol	16-épi-œstriol
œstra-1,3,5(10)-triène-3,6 α , 17 β -triol	6 α -hydroxyœstradiol-17 β
œstra-1,3,5(10)-triène-3,17 β -ol-16-one	16-cétoœstradiol-17 β

A. — CORTICOSTÉROÏDES.

(tableau 1)

Poissons

Jusqu'en 1954, la présence de corticostéroïdes chez les Vertébrés inférieurs restait hypothétique. HATEY (1954) montra pour la première fois que des extraits plasmatiques du Saumon, *Salmo salar* possédaient une activité biologique comparable à celle des stéroïdes issus du cortex surrénalien de Mammifères. Depuis, la présence de corticostéroïdes fut recherchée systématiquement dans le plasma des Poissons : chez les Cyclostomes (CHESTER JONES et PHILLIPS, 1960 ; LELOUP-HATEY, 1964 ; PHILLIPS et *al.*, 1962), chez les Elasmobranches (PHILLIPS, 1959 ; LELOUP-HATEY, 1964 ; CHESTER JONES et PHILLIPS, 1960 ; CHESTER JONES et *al.*, 1959), chez les Téléostéens (PHILLIPS, 1959 ; LELOUP-HATEY, 1964 ; CHESTER JONES et *al.*, 1959 ; BONDY et *al.*, 1957 ; SCHMIDT et IDLER, 1962 ; IDLER et *al.*, 1959 ; PHILLIPS et *al.*, 1959 ; HANE et ROBERTSON, 1959), enfin chez les Dipneustes (PHILLIPS et CHESTER JONES, 1957 ; LELOUP-HATEY, 1964).

D'excellentes revues récapitulent l'ensemble de ces travaux (HOLMES et *al.*, 1963 ; PHILLIPS et BELLAMY, 1963 ; LELOUP-HATEY, 1964 ; GOTTFRIED, 1964). Dans presque toutes les espèces étudiées, le cortisol est présent dans le plasma ; la corticostérone et la cortisone n'ont été dosées que dans le plasma de quelques espèces. La présence d'aldostérone n'a jamais été démontrée formellement chez un Poisson. Il est nécessaire de remarquer que les critères utilisés pour l'identification des corticostéroïdes plasmatiques (migration chromatographique et réactions colorées principalement) sont souvent insuffisants. IDLER et ses collaborateurs ont réalisé l'étude la plus complète

du point de vue chimique des corticostéroïdes présents dans le plasma d'un Poisson Téléostéen *Oncorhynchus nerka*. Ils identifièrent par de nombreux critères chimiques le cortisol, la cortisone, la corticostérone, le 11-désoxycorticostérone, la 17 α -hydroxyprogestérone, la 20 β , 17 α -hydroxy-pregn-4-ène-3-one et l'adrénostérone ; lorsque les quantités d'hormones étaient suffisantes, ces composés furent identifiés par spectrographie infrarouge (IDLER et al., 1959 ; IDLER et al., 1960 a ; IDLER et al., 1960 b). D'autre part, ils étudièrent les variations de la concentration plasmatique de ces hormones au cours de la vie sexuelle (SCHMIDT et IDLER, 1962). La 11-désoxycorticostérone est présente en très grande quantité dans le sperme du Chien de mer, *Squalus acanthias* (SIMPSON et al., 1963 a). La présence de corticostéroïdes d'origine testiculaire sera discutée plus loin.

TABLEAU I

Corticostéroïdes isolés du plasma des Vertébrés inférieurs et les Oiseaux

Espèces	Cortisol	Corticostérone	Cortisone	Aldostérone	Références
Poissons					
Cyclostomes	+	+ ^a			1, 2, 3
Élasmobranches	+	+ ^a			2, 3, 4, 5
Téléostéens	+	+ ^a	+ ^b	+ ^b ₁ (?)	2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
Dipneustes	+				2, 11
Amphibiens					
Urodèles	+	+			5
Anoures	+(?)	+		+ ^c	2, 11, 12
Reptiles	+	+			11
Oiseaux	+ ^a	+		+ ^d	11, 13

a : hormone dont la présence n'a pas été démontrée dans toutes les espèces étudiées.

b : uniquement chez *Oncorhynchus nerka* (8,9) et chez *Anguilla anguilla* (2).

b₁ : uniquement chez *Oncorhynchus nerka* (9).

c : uniquement chez *Bufo marinus* (12).

d : uniquement chez *Gallus domesticus* (11).

1. CHESTER JONES et PHILLIPS (1960) ; 2. LELOUP-HATEY (1964) ; 3. PHILLIPS et al. (1962) ; 4. PHILLIPS (1959) ; 5. CHESTER JONES et al. (1959) ; 6. BONDY et al. (1957) ; 7. SCHMIDT et IDLER (1962) ; 8. IDLER et al. (1959) ; 9. PHILLIPS et al. (1959) ; 10. HANE et ROBERTSON (1959) ; 11. PHILLIPS et CHESTER JONES (1957) ; 12. CRABBÉ (1961) ; 13. NAGRA et al. (1960).

Amphibiens

Dans leur travail de 1957, PHILLIPS et CHESTER JONES signalent la présence de cortisol dans le sang veineux surrénalien de *Xenopus laevis*. Le cortisol et la corticostérone ont été trouvés dans le plasma des mâles et des femelles d'une Salamandre *Amphiuma tridactyla* (CHESTER JONES et al., 1959). CRABBÉ (1961) isola la corticostérone et l'aldostérone dans le plasma de *Bufo marinus*. Il faut aussi signaler les travaux de DALE (1962), qui étudiant l'excrétion des larves de *Rana pipiens* identifia des corticostéroïdes dans l'eau d'élevage. La cortisone et le cortisol sont aussi des produits d'excrétion des adultes de *Xenopus laevis* et de *Bufo bufo* (PESONEN et RAPOLA, 1962). De nombreuses preuves indirectes par incubation confirment la sécrétion de corticostéroïdes par le tissu interrénal des Amphibiens.

Reptiles

Le cortisol et la corticostérone ont été dosés après injection d'ACTH dans le sang veineux surrénalien de *Natrix natrix* (PHILLIPS et CHESTER JONES, 1957). D'autres preuves directes de la présence de corticostéroïdes chez les Reptiles ne semblent pas avoir été apportées depuis.

Oiseaux

Toujours dans leurs recherches comparatives de 1957, PHILLIPS et CHESTER JONES signalent la présence de cortisol et de corticostérone dans le sang veineux surrénalien de *Gallus domesticus*; l'aldostérone apparaît après injection d'ACTH. NAGRA et al., (1960) n'ont mis en évidence, même après stimulation par l'ACTH, que la corticostérone dans le sang périphérique ou surrénalien de *Gallus domesticus*, de *Phasianus colchicus* et de *Catheturus*.

B. — PROGESTÉRONÉ

(tableau 2)

Le corps jaune de l'ovaire des Mammifères sécrète principalement de la progestérone; d'autres organes endocrines tels que le cortex surrénalien et le testicule contiennent aussi cette hormone mais elle ne représente probablement, dans ce cas, qu'un intermédiaire dans la synthèse des corticostéroïdes et des androgènes.

TABLEAU 2

*Progestérone isolée par chromatographie dans les ovaires
et les testicules des Vertébrés inférieurs et des Oiseaux*

Espèces	Source des stéroïdes	Concentration	Références
<i>Petromyzon marinus</i>	ovaire		1
<i>Squalus suckleyi</i>	ovaire		2
<i>Torpedo marmorata</i>	ovaire		3
<i>Conger conger</i>	ovaire	15 µg/kg	4
<i>Protopterus annectens</i>	ovaire	68 µg/kg	5
<i>Serranus scriba</i>	gonade hermaphrodite	92 µg/kg	6
<i>Bufo vulgaris</i>	ovaire	16 µg/kg	3
<i>Phalaropes</i> sp.	ovaire		7
<i>Gallus domesticus</i>	ovaire		8
<i>Scyliorhinus stellaris</i>	testicule	100 µg/kg	9
<i>Squalus acanthias</i>	sperme	progestérone 80 gµ/kg + prégnénolone 140 µg/kg	10
<i>Triturus cristatus</i>	testicule (zone glandulaire)	(¹)	11
<i>Bufo vulgaris</i>	testic. + organe de Bidder	—	12, 3
<i>Phalaropes</i> sp.	testicule	—	7

(¹) Incomplètement identifiée.

1. BOTTICELLI et al. (1963); 2. WOTIZ et al. (1960); 3. CHIEFFI et LUPO (1963); 4. LUPO et CHIEFFI (1963);
5. DEAN et CHESTER JONES (1959); 6. LUPO et CHIEFFI (1965); 7. HÖHN (*communication personnelle*);
8. LAYNE et al. (1957); 9. CHIEFFI et LUPO (1961 a); 10. SIMPSON et al. (1963 a); 11. DELLA CORTE
et COSENZA (1965); 12. CHIEFFI et LUPO (1961 b).

1. Progestérone d'origine testiculaire

CHIEFFI et LUPO (1961 a) mirent en évidence pour la première fois de la progestérone dans les testicules d'un Poisson, *Scyliorhinus stellaris*. Chez un Poisson hermaphrodite, *Serranus scriba*, ces mêmes auteurs (1965) isolèrent de la gonade des androgènes, des œstrogènes et de la progestérone. SIMPSON et al. (1963 a) isolèrent du sperme de *Squalus acanthias* de la progestérone, de la prégnénone et de la 11-désoxycorticostérone. La présence de stéroïde C-21 dans le sperme d'un Poisson Elasmobranch est remarquable si l'on considère que ces stéroïdes d'origine testiculaire ne sont probablement pas uniquement des précurseurs des androgènes. Cependant, la présence de stéroïde C-21 du sperme de *Squalus acanthias* ne doit pas être considérée comme générale ; aucun stéroïde n'a été extrait du sperme de quatre autres Elasmobranches (SIMPSON et al., 1963 c). La 17 α -hydroxyprogestérone, précurseur immédiat d'origine testiculaire de l'androstènedione, est un stéroïde du plasma de *Oncorhynchus nerka* (IDLER et al., 1959). L'organe de Bidder et le testicule de *Bufo vulgaris* contiennent de la progestérone (CHIEFFI et LUPO, 1961 b). Chez les Oiseaux (HÖHN, communication personnelle), la progestérone serait présente dans les testicules de plusieurs espèces.

2. Progestérone d'origine ovarienne

La progestérone a été isolée des ovaires de Vertébrés inférieurs (tabl. 2). Son importance au cours de la gestation des Mammifères suggère immédiatement une relation entre l'acquisition d'une fonction endocrine par le corps jaune et la reproduction vivipare. Les travaux de BRAGDON et al. (1954) confirment le rôle physiologique de la progestérone dans la gestation d'un Reptile vivipare *Natrix sipedon* ; la concentration en progestérone, mesurée par le test de HOOKER FORBES, 0,3-1,0 $\mu\text{g}/100$ ml de sérum, augmente jusqu'à 8 $\mu\text{g}/100$ ml en fin de gestation. Cependant, la sécrétion de progestérone par le « corps jaune » de Vertébrés vivipares demeure une hypothèse. Quant à son rôle endocrinien chez les Vertébrés ovipares, il reste obscur.

C. — STÉROÏDES SEXUELS ANDROGÈNES ET ŒSTROGÈNES

1. Stéroïdes androgènes

La présence d'hormones androgènes n'a été démontrée que récemment chez les Vertébrés inférieurs. Le tableau 3 résume l'ensemble des travaux actuellement parus.

Des androgènes, principalement la testostérone et l'androstènedione, ont été isolés chez les Poissons, les Amphibiens et dernièrement chez les Oiseaux. L'identification de stéroïdes androgènes à partir du tissu testiculaire nécessite une purification chimique spécifique ; le cholestérol et les lipides sont des impuretés difficiles à éliminer. Seules la testostérone et la 11-cétotestostérone ont pu être isolées sous forme cristalline du plasma de *Oncorhynchus nerka* (GRAJČER et IDLER, 1961 ; IDLER et al., 1960 a) puis identifiées par spectrographie infrarouge. Dans la plupart de ces travaux, la valeur du Rf en chromatographie sur papier est le seul critère d'identification. Chez les Reptiles et chez les Oiseaux, des androgènes d'origine testiculaire ont été mis en évidence par des tests biologiques (Revue in FORBES, 1961 ; VAN TIENHOVEN, 1961).

2. Stéroïdes œstrogènes

WEISMAN et al. (1937) démontrèrent en utilisant des Mammifères, que des extraits d'ovaires de *Xiphias gladius* possèdent une activité biologique œstrogène. DONAHUE (1941) montra de la même façon que les ovaires de *Pseudopleuronectes americanus* contenaient de petites quantités

TABLEAU 3

Hormones stéroïdes androgènes isolées chez les Vertébrés inférieurs et les Oiseaux

Espèces	Source des stéroïdes	Stéroïdes identifiés	Concentration	Identification	Références
Poissons					
<i>Scyliorhinus stellaris</i>	testicule	testostérone androsténone	50 µg/kg 70 µg/kg	chr.	1
<i>Squalus acanthias</i>	sperme	androsténone androstérone DHA	2 µg/100 g 5 µg/100 g 2 µg/100 g	chr. dérivés UV	2
<i>Serranus scriba</i>	gonade hermaphrodite	testostérone androsténone testostérone-conj.	5 µg/ 65 g 15 µg/ 65 g 3 µg/ 65 g	chr. UV	3
<i>Salmo irideus</i>	testicule	testostérone	—	chr.	4
<i>Cyprinus carpio</i>	testicule	testostérone	—	chr.	4
<i>Oncorhynchus nerka</i>	testicule	testostérone	27 µg/kg	chr. dérivés UV	5
<i>Oncorhynchus nerka</i>	sang	testostérone testostérone- glucuronide 11-cétotestostérone	7,7 µg/100 ml 7,6 µg/100 ml 12 µg/ 10 ml	crist. IR crist. IR	6 7
Amphibiens					
<i>Xenopus laevis</i>	eau d'élevage (adulte)	17-cétostéroïdes	—	chr.	8
<i>Rana pipiens</i>	eau d'élevage (larve)	17-cétostéroïdes	—	chr.	9
Oiseaux					
<i>Phalaropus</i> sp.	testicule	androsténone testostérone	—	—	10

chr. : chromatographie ; dérivés : formation de dérivés par des réactions microchimiques ; UV : spectre ultra-violet ; IR : spectre infrarouge ; crist. : isolé sous forme cristalline.

1. CHIEFFI et LUPO (1961 a) ; 2. SIMPSON et al. (1963 a) ; 3. LUPO et CHIEFFI (1965) ; 4. GALZIGNA (1961) ; 5. GRAJČER et IDLER (1963) ; 6. GRAJČER et IDLER (1961) ; 7. IDLER et al. (1960 a) ; 8. RAPOLA (1963) ; 9. DALE (1962) ; 10. HÖHN (communication personnelle).

TABLEAU 4

Hormones stéroïdes œstrogènes isolées chez les Vertébrés inférieurs et les Oiseaux

Espèces	Source des stéroïdes	Stéroïdes identifiés	Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Identification	Références
Poissons					
<i>Petromyzon marinus</i>	ovaire	œstradiol-17 β œstrone	16 —	chr.	1
<i>Squalus suckleyi</i>	œufs ovariens	œstradiol-17 β	100	chr.	2
<i>Squalus suckleyi</i>	ovaire	œstradiol-17 β œstrone	120 —	cris. IR cris. IR	3
<i>Squalus acanthias</i>	œufs ovariens ovaire	œstradiol-17 β œstrone	32 3	chr. dérivés	4
<i>Scyliorhinus caniculus</i>	ovaire	œstradiol-17 β œstrone	19 19	chr. dérivés	5
<i>Scyliorhinus stellaris</i>	testicule	œstradiol-17 β	20	chr.	6
<i>Torpedo marmorata</i>	ovaire	œstradiol-17 β œstrone	30 55	chr.	7
<i>Salmo irideus</i>	ovaire	œstradiol-17 β œstriol 16-épi-œstriol?	—	chr.	8
<i>Cyprinus carpio</i>	ovaire	œstradiol-17 β	—	chr.	8
<i>Gadus callarias</i>	ovaire	œstradiol-17 β œstrone	4,8 1,0	chr. dérivés	9
<i>Conger conger</i>	ovaire	œstradiol-17 β œstrone œstriol	— 80 50	chr.	10
<i>Serranus scriba</i>	gonade hermaphrodite	œstradiol-17 β œstrone œstriol	— 123 430	chr.	11
<i>Protopterus annectens</i>	ovaire	œstradiol-17 β œstrone œstriol	— 70 70	chr.	12
Amphibiens					
<i>Xenopus laevis</i>	ovaire	œstradiol-17 β œstrone	20	chr. fluorescence	13
<i>Rana pipiens</i>	eau d'élevage des larves	œstradiol-17 β	—	chr.	14
<i>Bufo vulgaris</i>	organe de Bidder	œstradiol-17 β œstrone œstriol	— — —	chr.	15
	ovaire	œstradiol-17 β œstrone œstriol	40 41 60	chr.	16

TABLEAU 4 (suite)

Espèces	Source des stéroïdes	Stéroïdes identifiés	Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Identification	Références
Oiseaux					
<i>Gallus domesticus</i> adulte	ovaire	œstradiol-17 β œstrone œstriol	— — —	chr.	17
	excrément	œstradiol-17 β	—	crist. IR	18
	urine	œstrone œstradiol-17 β 16-épi-œstriol	— — —	crist. IR crist. crist. pf	19 20 21
embryon	ovaire gauche à l'éclosion et à 10 jours d'incubation	œstradiol-17 β œstrone	— —	chr. fluorescence	22
<i>Phalaropes</i> sp.	gonades	œstradiol-17 β œstrone œstriol	— — —	—	23

chr. : chromatographie ; dérivés : formation de dérivés par des réactions microchimiques ; IR : spectre infrarouge ; crist. : isolé sous forme cristalline ; fluorescence : spectre de fluorescence ; pf : mesure du point de fusion.

1. BOTTICELLI *et al.* (1963) ; 2. WOTIZ *et al.* (1958) ; 3. WOTIZ *et al.* (1960) ; 4. SIMPSON *et al.* in GOTTFRIED (1964) ; 5. SIMPSON *et al.* (1963 *b*) ; 6. CHIEFFI et LUPO (1961 *a*) ; 7. CHIEFFI et LUPO (1963) ; 8. GALZIGNA (1961) ; 9. GOTTFRIED *et al.* (1962) ; 10. LUPO et CHIEFFI (1963) ; 11. LUPO et CHIEFFI (1965) ; 12. DEAN et CHESTER-JONES (1959) ; 13. GALLIEN et CHALUMEAU-LE FOULGOC (1960) ; 14. DALE (1962) ; 15. CHIEFFI et LUPO (1961 *b*) ; 16. CHIEFFI et LUPO (1963) ; 17. LAYNE *et al.* (1958) ; 18. MAC RAE *et al.* (1959) ; 19. AINSWORTH et COMMON (1962) ; 20. HERTELENDY *et al.* (1965) ; 21. HERTELENDY et COMMON (1964) ; 22. GALLIEN et LE FOULGOC (1958) ; 23. HÖHN (*communication personnelle*).

d'œstrogènes. Ces résultats indiquent que des substances à propriétés œstrogènes peuvent être isolées à partir d'ovaires de Poisson ; mais ils ne contiennent aucune indication quant à la nature chimique de ces substances.

Des œstrogènes n'ont été isolés chimiquement et identifiés chez les Vertébrés inférieurs que depuis cette dernière décennie. Le tableau 4 contient l'ensemble des travaux parus sur ce sujet. Certaines des hormones indiquées dans ce tableau sont incomplètement identifiées. Le travail fondamental de WOTIZ *et al.* (1960) démontra définitivement la présence de stéroïdes œstrogènes chez les Poissons. Ils isolèrent chimiquement sous forme cristalline l'œstrone et l'œstradiol-17 β de l'ovaire de *Squalus suckleyi*.

GRANT (1937) signala, sans donner de références techniques, qu'une substance œstrogène pouvait être extraite de l'ovaire des Amphibiens. Le premier travail, mettant en évidence chimiquement des œstrogènes dans l'ovaire d'un Amphibien, fut présenté par GALLIEN et CHALUMEAU-LE FOULGOC en 1960. Il démontre la présence de l'œstrone et de l'œstradiol-17 β dans l'ovaire de *Xenopus laevis*. DALE (1962) signala la présence de trace d'œstradiol-17 β dans l'eau d'élevage des larves de *Rana*

pipiens. L'œstriol, l'œstradiol-17 β et l'œstrone ont été trouvés dans l'organe de Bidder (CHIEFFI et LUPO, 1961 *b*) et dans l'ovaire de *Bufo vulgaris* (CHIEFFI et LUPO, 1963).

L'injection journalière de 0,1 ml de liquide folliculaire extrait de l'ovaire de *Crotalus terrificus* provoque l'œstrus chez une souris castrée (FRAENKEL et MARTIN, 1938). Chez les Reptiles, des œstrogènes n'ont été mis en évidence que par des dosages biologiques (VALLE et VALLE, 1943). Aucune identification chimique de stéroïdes sexuels n'a été réalisée à partir de tissus de Reptiles.

TABLEAU 5

Hormones stéroïdes œstrogènes isolées chez les Invertébrés

Espèces	Source des stéroïdes	Stéroïdes identifiés	Références
Échinodermes <i>Strongylocentrotus franciscanus</i>	ovaire	œstradiol-17 β progestérone	1
<i>Pisaster ochraceus</i>	ovaire	œstradiol-17 β progestérone	2
Mollusques <i>Pecten hericius</i>	ovaire	œstrogènes progestérone	1
<i>Maetra (spisula) solidissima</i>	ovaire	œstrogènes	3
Arthropodes <i>Homarus americanus</i>	œufs	œstradiol-17 β	4,5

1. BOTTICELLI et al. (1961); 2. BOTTICELLI et al. (1960); 3. HAGERMAN et al. (1957); 4. DONAHUE (1948); 5. LISK (1961).

Chez les Oiseaux, MARLOW et RICHERT (1940), par des tests biologiques, montrèrent une sécrétion de substances œstrogènes dans l'ovaire de la Poule. A partir de 1958, COMMON et ses élèves démontrèrent chimiquement que la Poule pondeuse sécrète des œstrogènes. L'ovaire contient de l'œstrone, de l'œstradiol-17 β et de l'œstriol (LAYNE et al., 1958). Poursuivant leur étude, ils isolèrent de l'urine, sous forme cristalline, l'œstrone (AINSWORTH et COMMON, 1962), l'œstradiol-17 β (HERTELENDY et al., 1965) et le 16-épi-œstriol (HERTELENDY et COMMON, 1964); des fèces, l'œstradiol-17 β (MAC RAE et al., 1959). Ces résultats démontrent définitivement la présence d'hormones stéroïdes œstrogènes chez les Oiseaux. HÖHN (1965) signale la présence de 5 stéroïdes dans les gonades des Phalaropes et de certains autres Oiseaux; parmi ces stéroïdes, l'œstrone, l'œstradiol-17 β et l'œstriol (HÖHN, communication personnelle).

GALLIEN et LE FOULGOC (1958) mirent en évidence, par le test d'ALLEN et DOISY et par chromatographie, des œstrogènes dans l'ovaire gauche de l'embryon de Poulet à 21, 13 et 10 jours d'incubation. WENIGER (1965 *a*) a extrait une substance œstrogène du milieu sur lequel des gonades de Poulet femelle à 7 jours d'incubation furent cultivées pendant 24 heures. Cette substance serait un stéroïde phénolique (WENIGER, 1965 *b*).

La présence d'hormones stéroïdes a aussi été signalée chez des Invertébrés (tabl. 5.) Parmi les Échinodermes, l'ovaire de l'Étoile de mer, *Pisaster ochraceus* et celui de l'Oursin, *Strongylocentrotus franciscanus*, contiennent de l'œstradiol-17 β et de la progestérone (BOTTICELLI et al., 1960; BOTTICELLI et al., 1961). Des œstrogènes ont aussi été isolés dans l'ovaire du Pecten, *Pecten hericius* (BOTTICELLI

et *al.*, 1961). Enfin LISK (1961) a extrait de l'œstradiol-17 β des œufs du Homard, *Homarus americanus*. Si la présence de stéroïdes est confirmée dans les glandes génitales d'Invertébrés, il semblerait raisonnable d'admettre qu'ils interviennent dans la physiologie normale. Ces résultats encore incertains établiraient que des stéroïdes identiques à ceux qui se trouvent chez tous les Vertébrés peuvent aussi être synthétisés chez des Invertébrés. Il est intéressant de faire remarquer que deux hormones biologiquement actives des Insectes, l'ecdysone et l'ecdystérone sont des stéroïdes à 27 atomes de carbone.

D. — DOSAGE DES HORMONES STÉROÏDES ŒSTROGÈNES DANS LE SANG PÉRIPHÉRIQUE DES POISSONS, DES AMPHIBIENS ET DES OISEAUX

L'existence d'hormones stéroïdes œstrogènes chez les Vertébrés inférieurs, nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, est certaine. Ces hormones ont été identifiées chimiquement à partir du tissu ovarien, d'excréments, et d'urine. Il était intéressant de rechercher leur présence dans le sang périphérique et d'étudier la variation de leurs concentrations en fonction des conditions physiologiques.

Poissons

CEDARD et NOMURA (1961) dosèrent, par une technique fluorimétrique après chromatographie, des œstrogènes dans le sang de : *Anguilla anguilla*, *Conger conger*, *Murena helena*. Des œstrogènes furent décelés dans le sang des mâles et des femelles. Les concentrations en œstrone et en œstradiol-17 β étaient généralement plus faibles chez le mâle que chez la femelle. Chez le Saumon de montée (CEDARD et *al.*, 1961) la teneur totale en œstrogène est faible. Elle s'élève chez le Saumon frayant (4,3 $\mu\text{g}/100$ ml). Chez le Saumon frayant seulement, l'œstriol ou une hormone de polarité voisine apparaît. SIMPSON et *al.* (1963 *b*) signalent aussi la présence d'œstrone (1 $\mu\text{g}/\text{l}$) et d'œstradiol-17 β (3-4 $\mu\text{g}/\text{l}$) dans le sang de *Scyliorhinus canicula*. Plus récemment ELEFTHERIOU et *al.* (1966) ont étudié les hormones stéroïdes œstrogènes chez un Poisson-chat américain *Ictalurus punctatus* ; six hormones sont présentes dans le sang : l'œstradiol-17 β , l'œstradiol-17 α , l'œstrone, l'œstriol le 16-épi-œstriol et le 16-céto-œstradiol (?). La concentration plasmatique de ces hormones varie en fonction du poids de l'ovaire ; celle du 16-céto-œstradiol (?) par exemple augmente de 2 $\mu\text{g}/100$ ml jusqu'à 19,97 $\mu\text{g}/100$ ml de plasma ; la concentration en œstrone n'augmente dans les mêmes conditions que de 1,7 μg à 5,7 $\mu\text{g}/100$ ml. Il est important de remarquer que seuls des critères chromatographiques ont servi à l'identification des hormones étudiées dans ce travail. Une étude qualitative plus détaillée à notre avis serait nécessaire avant de réaliser une analyse quantitative (portant sur de très faibles concentrations).

Amphibiens

GALLIEN et CHALUMEAU-LE FOULGOC (1960) étudiant chez le Xénope, le cycle des œstrogènes au cours de la ponte, signalent la présence d'œstrone et d'œstradiol-17 β dans le sang circulant (4 $\mu\text{g}/100$ ml). En collaboration avec L. CEDARD (CEDARD et OZON, 1962), nous avons recherché chez *Rana temporaria* la teneur en œstrogènes au cours du cycle sexuel. L'œstrone et l'œstradiol-17 β ont été dosés par la mesure de la fluorescence après purification chimique et chromatographique sur colonne de célite. En novembre la concentration totale des œstrogènes est faible (0,8 à 1 $\mu\text{g}/100$ ml) en revanche à l'époque de la ponte elle s'élève à 2 $\mu\text{g}/100$ ml. En plus de l'œstrone et de l'œstradiol-17 β une substance phénolique de même polarité que l'œstriol est aussi présente ; il s'agit vraisemblablement d'un mélange de dérivés monohydroxylés de l'œstradiol-17 β ; comme nous l'avons montré (OZON et BREUER, 1963) le foie de *Rana temporaria* possède en effet une 6 α - et une 16 α -hydroxylase ; ces enzymes sont actives *in vitro* et *in vivo*. En conclusion chez *Rana temporaria*, espèce à cycle annuel, la recherche des œstrogènes dans le sang, montre deux états remarquables. En no-

vembre, époque où les gonades ont atteint leur pleine maturité sexuelle, laquelle restera stabilisée tout l'hiver, il existe dans le sang des taux faibles d'œstrogènes. Au moment de la ponte ce taux subit une augmentation significative.

Oiseaux

L'œstrone est présente sous forme conjuguée dans le sang de la Poule pondeuse (LAYNE *et al.*, 1958). O'GRADY et HEALD (1965) identifièrent l'œstradiol-17 β et l'œstrone toujours à partir du sang par une technique de double marquage isotopique. Poursuivant cette étude nous avons dosé dans le sang de la Poule l'œstrone, l'œstradiol-17 β et l'œstriol par une technique de dosage fluorimétrique après chromatographie de partage (OZON, 1965).

Chez la Poule adulte, la concentration totale en œstrogène est voisine de 2 $\mu\text{g}/100$ ml. L'œstriol n'a pas été identifié par O'GRADY et HEALD, cependant un stéroïde phénolique de polarité voisine est présent. Il s'agit d'après une étude chromatographique du 16-épi-œstriol ; ce composé phénolique a d'ailleurs été isolé sous forme cristalline de l'urine de Poule pondeuse (HERTELENDY et COMMON, 1964). Quant à la fraction œstradiol nous avons pu montrer qu'elle contenait vraisemblablement un mélange des deux isomères ; œstradiol-17 β et œstradiol-17 α ; l'œstradiol-17 α est un métabolite important chez la Poule (OZON et BREUER, 1965).

KORNFIELD et NALBANDOV (1954) démontrèrent la présence de substances œstrogènes par des tests biologiques dans le sang de Poulets femelles de 16 jours à 20 jours d'incubation. Nous avons trouvé chez le jeune Poulet femelle de 21 jours une concentration totale en œstrogènes plasmatiques de 6,6 $\mu\text{g}/100$ ml (OZON 1965). La fraction polaire phénolique était la plus importante : ces résultats ne sont pas étonnants car le foie de l'embryon de Poulet à 16 jours d'incubation présente une 16 α -et une 16 β -hydroxylase très actives (OZON, inédit).

E. — CONCLUSIONS

Depuis la découverte des hormones stéroïdes vers 1930, leurs propriétés sont connues chez les Vertébrés ; cependant jusqu'à cette dernière décennie, elles n'avaient été isolées que chez les Mammifères. En conclusion, il est maintenant possible d'affirmer que des hormones stéroïdes sont présentes chez tous les Vertébrés, des Cyclostomes à l'Homme.

Cependant, nous devons préciser que nombre de ces travaux d'isolement et d'identification reposent sur des analyses chimiques incomplètes et même parfois erronées. La très faible quantité d'hormones dans les tissus représente la difficulté principale pour leur isolement. Les méthodes chromatographiques, qui se sont révélées particulièrement utiles pour la séparation de quelques microgrammes de substances purifiées, sont aussi très souvent insuffisantes.

Les techniques d'extraction et d'isolement de ces très petites quantités d'hormones, à partir des tissus de Vertébrés inférieurs, doivent être sensibles et spécifiques ; malheureusement cela n'a pas toujours été le cas. Le biochimiste, s'il veut faire une identification chimique suffisante (spectre IR, cristaux), doit travailler sur de grandes quantités de tissus, donc sur un grand nombre d'individus. Par exemple, quelques microgrammes d'œstrogènes sont isolés d'un kilogramme d'ovaire de Poisson. Ces expériences d'extraction ne donnent aussi que des résultats qualitatifs pour une hormone présente chez un ensemble d'animaux. L'étude des variations physiologiques des hormones (quelques fractions de μg) chez un même animal pose des problèmes méthodologiques qui ne peuvent encore être résolus parfaitement. Plus la technique est spécifique et sensible, plus le pourcentage de récupération s'abaisse.

C'est pourquoi, nous heurtant à des problèmes techniques d'isolement et d'identification de faibles quantités d'hormones, nous avons orienté nos recherches vers l'étude de la biosynthèse et du métabolisme des hormones stéroïdes chez les Vertébrés inférieurs (BREUER et OZON, 1965). En

effet, comme nous l'avons fait remarquer non seulement les auteurs n'ont isolé que de très faibles quantités de stéroïdes, mais aussi ils n'ont recherché que des stéroïdes classiques déjà connus chez les Mammifères. L'œstrone, l'œstradiol-17 β , la testostérone par exemple, ont été isolés chez les Vertébrés inférieurs, par des méthodes d'analyses mises au point chez les Mammifères.

La présence d'une nouvelle hormone en faible concentration peut rarement être décelée avec certitude dans une espèce. En revanche, l'étude des systèmes enzymatiques de la biosynthèse et du métabolisme intermédiaire permet de mettre en évidence la formation de métabolites, presque impossibles à isoler des tissus ; leur concentration est trop faible, ou leur métabolisme ultérieur très rapide (durée de vie brève dans l'organisme). Un exemple illustre ce point : chez la Poule adulte, l'œstrone et l'œstradiol-17 β ont été isolés de l'ovaire, des excréments et de l'urine ; jamais l'œstradiol-17 α . Cependant, le foie métabolise l'œstrone en œstradiol-17 α et en œstradiol-17 β dans les proportions 1-3. Il contient donc une 17 α - et une 17 β -hydroxystéroïde oxydoréductase. Puisque l'œstrone a été isolé chez la Poule, l'œstradiol-17 α peut être considéré comme un métabolite des œstrogènes, bien qu'il n'ait jamais été identifié dans ses tissus (OZON et BREUER 1965).

On peut aussi se demander quand un organe contient une hormone, s'il la sécrète réellement, ou s'il l'emmagasine seulement. Enfin, cette hormone peut ne représenter qu'un précurseur d'autres métabolites.

L'identification de stéroïdes dans les tissus de Vertébrés n'est pas une fin en soi, elle ne représente qu'un point de vue statique d'événements biochimiques et physiologiques. Il est nécessaire de connaître les mécanismes qui contrôlent la biosynthèse des hormones stéroïdes, d'analyser leur métabolisme intermédiaire, ainsi que leur mode d'élimination dans les différentes Classes où ces hormones ont été isolées.

Reçu pour publication en août 1966.

SUMMARY

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF STEROID HORMONES IN LOWER VERTEBRATES AND BIRDS

From the literature here discussed including our own results, it is now possible to assert that steroid hormones are present in the whole range of Vertebrates, from cyclostomata to men. Corticosteroids have been identified in the peripheral blood of every class of Vertebrates. Gonadal steroids : progesterone, testosterone and α stradiol-17 β have been isolated in tissues of Fishes, Amphibia and Birds. Estrogens have been estimated in the peripheral blood of several species of Fishes, in the Frog (*Rana temporaria*) and Fowl.

The metabolism and biosynthesis of steroid hormones are not considered here.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AINSWORTH L., COMMON R. H., 1962. Crystalline œstrone isolated from urine of the laying hen. *Nature, London*, **195**, 77.
- BONDY P. K., UPTON G. V., PICKFORD G. F., 1957. Demonstration of cortisol in fish blood. *Nature, London*, **179**, 1354-1355.
- BOTTICELLI C. R., HISAW JR. F. L., ROTH W. D., 1963. Estradiol-17 β , estrone and progesterone in the ovaries of the lamprey, *Pretromyzon marinus*. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **114**, 255-256.
- BOTTICELLI C. R., HISAW JR. F. L., WOTIZ H. H., 1960. Estradiol-17 β , and progesterone in the ovaries of starfish (*Pisaster ochraceus*). *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **103**, 875-877.
- BOTTICELLI C. R., HISAW JR. F. L., WOTIZ H. H., 1961. Estrogens and progesterone in the sea-urchin (*Strongylocentrotus franciscanus*) and Pecten (*Pecten hercicus*). *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **106**, 887-888.
- BRAGDON D. E., LAZO-WASEM E. A., ZARROW M. X., HISAW F. L., 1954. Progesterone-like activity in the plasma of ovoviviparous snakes. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **86**, 477-480.

- BREUER H., OZON R., 1965. Métabolisme des hormones stéroïdes androgènes et œstrogènes chez les Vertébrés inférieurs. *Archs. Anat. microsc. Morph. exp.* **54**, 17-33.
- CEDARD L., NOMURA T., 1961. Dosage fluorimétrique après chromatographie de partage des œstrogènes dans le sang de certains Téléostéens. *Bull. Inst. Océanogr.*, **1196**, 1-8.
- CEDARD L., OZON R., 1962. Teneur en œstrogènes du sang de la Grenouille rousse (*Rana temporaria* L.). *C. R. Soc. Biol.*, **156**, 1805-1806.
- CEDARD L., FONTAINE M., NOMURA T., 1961. Sur la teneur en œstrogène du sang du Saumon adulte (*Salmo salar* L.) en eau douce. *C. R. Acad. Sci.*, **252**, 2656-2657.
- CHESTER JONES I., PHILLIPS J. G., 1960. Adrenocorticosteroids in fish. *Symp. zool. Soc.*, Lond, n° 1, 17-32.
- CHESTER JONES I., PHILLIPS J. G., HOLMES W. N., 1959. Comparative physiology of the adrenal cortex. In *Comparative Endocrinology* A. Gorbman ; edit. Wiley and Sons, New York, 582-612.
- CHIEFFI G., LUPO C., 1961 a. Identification of estradiol-17 β , testosterone and its precursors from *Scyliorhinus stellaris* testes. *Nature, London*, **190**, 169-170.
- CHIEFFI G., LUPO C., 1961 b. Identificazione degli ormoni steroidi nei testicoli e negli organi di Bidder di *Bufo vulgaris*. *Atti. Accad. naz. Lincei*, **30**, 399-402.
- CHIEFFI G., LUPO C., 1963. Identification of sex hormones in the ovarian extracts of *Torpedo marmorata* and *Bufo vulgaris*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **3**, 149-152.
- CRABBÉ J., 1961. Stimulation of active sodium transport across the isolated toad bladder after injection of aldosterone to the animal. *Endocrinology.*, **69**, 673-682.
- DALE E., 1962. Steroid excretion by larval frogs. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **2**, 171-176.
- DEAN S. D., CHESTER JONES I., 1959. Sex steroids in the lungfish, *Protopterus annectens* (OWEN). *J. Endocrinol.*, **18**, 366-371.
- DELLA CORTE F., COSENZA L., 1965. Sur la présence d'hormones stéroïdes dans les testicules de *Triturus cristatus carnifex* (LAUR.). (Abstr., 33). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **5**, 679.
- DONAHUE J. K., 1941. Occurrence of estrogens in the ovaries of the winter flounder. *Endocrinology.*, **28**, 519-520.
- DONAHUE J. K., 1948. Fluorimetric and biological determination of estrogens in the eggs of the american lobster (*Homarus americanus*). *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **69**, 179-181.
- ELEFThERIOU B. E., BOEHLKE K. W., TIEMEIER O. W., 1966. Free plasma estrogens in the channel catfish. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* **121**, 85-88.
- FORBES T. R., 1961. Endocrinology of reproduction in cold-blooded vertebrates. in W. C. Young « Sex and internal secretion ». Edits. : Baillières, Tindall and Cox, London, vol II, 1 035-1 087.
- FRAENKEL L., MARTIN T., 1938. Sur le corps jaune des serpents vivipares. *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 466-468.
- GALLIEN L., CHALUMEAU-LE FOULGOC M. T., 1960. Mise en évidence de stéroïdes œstrogènes dans l'ovaire juvénile de *Xenopus laevis* DAUDIN et cycle des œstrogènes au cours de la ponte. *C. R. Acad. Sci.*, **251**, 460-462.
- GALLIEN L., LE FOULGOC M. T., 1958. Activité œstrogène de l'ovaire embryonnaire du Poulet. Vérification par le test biologique de la Ratte castrée (ALLEN et DOISY) de l'identification chimique d'hormones stéroïdes œstrogènes dans l'ovaire gauche du Poulet à 21 jours. *C. R. Acad. Sci.*, **247**, 1776-1778.
- GALZIGNA L., 1961. Analisi cromatografica degli steroidi estratti da gonadi adulte di *Salmo irideus* e di *Cyprinus carpio*. *Atti Accad. naz. Lincei*, **31**, 92-95.
- GOTTFRIED H., 1964. The occurrence and biological significance of steroids in lower Vertebrates. *A review. Steroids*, **3**, 219-242.
- GOTTFRIED H., HUNT S. V., SIMPSON T. H., WRIGHT R. S., 1962. Sex hormones in the fish. The estrogens of cod (*Gadus callarias*). *J. Endocrinol.*, **24**, 425-430.
- GRAJČER D., IDLER D. R., 1961. Testosterone, conjugated and « free » in the blood of spawned fraser river sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Can. J. Biochem.*, **39**, 1 585-1593.
- GRAJČER D., IDLER D. R., 1963. Conjugated testosterone in the blood and testes of spawned fraser river sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Can. J. Biochem.*, **41**, 23-30.
- GRANT R., 1937. Effect of estrone of the oviducts of *Triturus viridescens*. *Anal. Rec., Suppl.* **67**, 20.
- HAGERMAN D. D., WELLINGTON F. M., VILLEE C. A., 1957. Estrogens in marine invertebrates. *Biol. Bull.*, **112**, 180-183.
- HANE S., ROBERTSON O. H., 1959. Changes in plasma 17- δ hydroxycorticostéroïds accompanying sexual maturation and spawning of the pacific salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Proc. nation. Acad. Sci.*, **45**, 886-893.
- HATEY J., 1954. Sur l'extraction de substances à activité gluconéogénique du type corticosurrénalien contenues dans le plasma de Saumon (*Salmo salar* L.). *Arch. internation. Physiol.*, **62**, 313-321.
- HERTELENDY F., COMMON R. H., 1964. Isolation of crystalline 16-epiestriol from hen urine. *Can. J. Biochem.*, **42**, 1177-1182.
- HERTELENDY F., TAYLOR T. G., MATHUR R. S., COMMON R. H., 1965. Isolation of estradiol-17 β from hen's urine and its characterization as the cristalline 3-methyl ether. *Can. J. Biochem.*, **43**, 1379-1385.
- HÖHN E. O., 1965. Gonadal steroid hormones in phalaropes and certain other birds in relation to plumage and sex behaviour in Phalaropes. *Acta. endocrinol., Suppl.* **100**, 206.

- HOLMES W. N., PHILLIPS P. G., CHESTER-JONES I., 1963. Adrenocortical factors associated with adaptation of vertebrates to marine environments. *Rec. Progr. Hormone Research.*, **19**, 619-672.
- IDLER D. R., RONALD A. P., SCHMIDT P. J., 1959. Biochemical studies on sockeye salmon during spawning migration. VII. Steroid hormones in plasma. *Can. J. Biochem.*, **37**, 1227-1238.
- IDLER D. R., SCHMIDT P. J., RONALD A. P., 1960 a. Isolation and identification of 11-ketotestosterone in salmon plasma. *Can. J. Biochem.*, **38**, 1 053-1 058.
- IDLER D. R., FAGERLUND U. H. M., RONALD A. P., 1960 b. Isolation of pregn-4-ene-17 α , 20 β -diol-3-one from the plasma of pacific salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **2**, 133-137.
- KORNFELD W., NABLANDOV A. V., 1954. Endocrine influence on the development of the rudimentary gonad of fowl. *Endocrinology.*, **55**, 751-761.
- LAYNE D. S., COMMON R. H., MAW W. A., FRAPS R. M., 1957. Presence of progesterone in extracts of ovaries of laying hens. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* **94**, 528-529.
- LAYNE D. S., COMMON R. H., MAW W. A., FRAPS R. M., 1958. Presence of estrone, estradiol and estriol in extracts of ovaries of laying hens. *Nature (London)*, **181**, 351-352.
- LELOUP-HATEY J., 1964. Fonctionnement de l'interréal antérieur de deux Téléostéens : le Saumon atlantique et l'Anguille européenne. *Ann. Inst. Océanogr.*, **42**, 221-337.
- LISK R. D., 1961. Estradiol-17 β in the eggs of the american lobster *Homarus americanus*. *Can. J. Biochem.*, **396**, 659-662.
- LUPO C., CHIEFFI G., 1963. Estrogens and progesterone in ovaries of the marine teleost *Conger conger*. *Nature, London*, **197**, 596.
- LUPO C., CHIEFFI G., 1965. Identification of steroid hormones in the gonadal extract of the hermaphrodite teleost. *Serranus scriba*. Abstr. 71. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **5**, 698.
- MAC RAE H. F., ZAHARIA W., COMMON R. H., 1959. Isolation of crystalline estradiol-17 β from dropping of laying hens. *Poult. Sci.*, **38**, 318-321.
- MARLOW W. H., RICHERT D., 1940. Estrogens of the fowl. *Endocrinology.*, **26**, 531-534.
- NAGRA C. L., BAUM G. J., MEYER R. K., 1960. Corticosterone levels in adrenal effluent blood of some gallinaceous birds. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **105**, 68-70.
- O'GRADY J. E., HEALD P. J., 1965. Identification of estradiol and estrone in avian plasma. *Nature, London*, **205**, 390.
- OZON., 1965. Mise en évidence d'hormones stéroïdes œstrogènes dans le sang de la Poule adulte et chez l'embryon de poulet. *C. R. Acad. Scid.* **261** 5664-5666.
- OZON R., BREUER H., 1963. Untersuchungen über den Stoffwechsel von Steroidhormonen bei Vertebraten. II. Hydroxylierung von Östradiol-(17 β) zu 6 α -Hydroxy-östradiol- (17 β) und Östriol in der Leber von Amphibien. *Z. Physiol. Chem.*, **333**, 282-285.
- OZON R., BREUER H., 1965. Untersuchungen über den Stoffwechsel von Steroidhormonen bei Vertebraten. V. Stoffwechsel phenolischer Steroide in der Leber der Hühnes *in vitro*. *Z. Physiol. Chem.*, **341**, 239-248.
- PESONEN S., RAPOLA J., 1962. Observations on the metabolism of adrenal and gonadal steroids in *Xenopus laevis* and *Bufo bufo*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **2**, 425-432.
- PHILLIPS J. G., 1959. Adrenocorticosteroids in fish. *J. Endocrinol.*, **18**, XXXVII-XXXIX.
- PHILLIPS J. G., BELLAMY D., 1963. Adrenocortical hormones. In « *Comparative Endocrinology* », H. Heller et U. S. von Euler, edits. Academic Press, New York, vol. **1**, 208-257.
- PHILLIPS J. G., CHESTER-JONES I., 1957. The identity of adrenocortical secretion in lower vertebrates. *J. Endocrinol.*, **16**, III
- PHILLIPS J. G., CHESTER-JONES I., BELLAMY D., GREEP R. O., DAY L. R., HOLMES W. N., 1962. Corticosteroid in the blood of *Myxine glutinosa* L. (Atlantic hagfish). *Endocrinology*, **71**, 329-331.
- PHILLIPS J. G., HOLMES W. N., BONDY P. K., 1959. Adrenocorticosteroids in salmon plasma (*Oncorhynchus nerka*). *Endocrinology*, **65**, 811-818.
- RAPOLA J., 1963. The adrenal cortex and metamorphosis of *Xenopus laevis* DAUDIN. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **3**, 412-421.
- SCHMIDT P. J., IDLER D. R., 1962. Steroid hormones in the plasma of salmon at various states of maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **2**, 204-214.
- SIMPSON T. H., WRIGHT R. S., GOTTFRIED H., 1963 a. Steroids in the semen of dogfish (*Squalus acanthias*) *J. Endocrinol.*, **26**, 489-498.
- SIMPSON T. H., WRIGHT R. S., HUNT S. V., 1963 b. Sex hormones in fish. Part. II. The estrogens of *Scyliorhinus caniculus*. *J. Endocrinol.*, **26**, 499-507.
- SIMPSON T. H., WRIGHT R. S., HUNT S. V., 1963 c. Steroids of the semen of elasmobranch fish. *J. Endocrinol.*, **27**, 131-132.
- VAN TIENHOVEN A., 1961. Endocrinology of reproduction in birds. in W. C. YOUNG, *Sex and internal secretion*. Edits. : Baillière, Tindall and Cox, London, vol. **11**, 1088-1169.
- VALLE J. R., VALLE L. A. R., 1943. Gonadal hormones in snakes. *Science*, **97**, 400.
- WEISMAN A. I., MISHBIND D. I., KLEINER I. S., COASTES C. W., 1937. Estrogenic hormones in the ovaries of swordfish. *Endocrinology*, **21**, 413-414.

- WENIGER J. P., 1965 *a*. Extraction d'une substance œstrogène (test d'Allen et Doisy positif) de milieux sur lesquels les gonades d'embryons de Poulet femelle de 7 jours furent cultivées pendant 24 h. *C. R. Acad. Sci.*, **261**, 809-812.
- WENIGER J. P., 1965 *b*. L'hormone sexuelle de l'embryon de Poulet femelle est-elle un stéroïde phénolique. *C. R. Acad. Sci.*, **261**, 1427-1429.
- WOTIZ H. H., BOTTICELLI C., HISAW F. L., JR, RINGLER I., 1958 Identification of estradiol-17 β from dogfish ova (*Squalus suckleyi*). *J. Biol. Chem.*, **231**, 589-592.
- WOTIZ H. H., BOTTICELLI C. R., HISAW F. L., JR, OLSEN A. G., 1960. Estradiol-17 β , estrone and progesterone in the ovaries of dogfish (*Squalus suckleyi*). *Proc. nation. Acad. Sci.*, **46**, 580-583.
-