

DU RÔLE DE L'HYPOPHYSE ET DES OVAIRES DANS LA BIOSYNTHÈSE DES ŒSTROGÈNES AU COURS DE LA GESTATION CHEZ LA TRUIE

J. FÈVRE, P.-C. LÉGLISE et P. ROMBAUTS
avec la collaboration technique d'Odette REYNAUD

*Station centrale de Physiologie animale,
Station centrale de Recherche de Nutrition,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas
Institut national de la Recherche agronomique*

SOMMAIRE

Dans l'intention de connaître l'origine de la synthèse des œstrogènes durant la gestation chez la Truie, nous avons suivi l'excrétion urinaire d'œstrone chez deux truies hypophysectomisées le 2^e ou le 3^e jour de la gestation et chez deux truies ovariectomisées après la saillie. La gestation a été maintenue par l'injection quotidienne de 300 mg de progestérone. Malgré l'absence d'ovaires ou d'hypophyse, l'excrétion urinaire d'œstrone présente une cinétique identique à celle que l'on peut trouver chez des animaux gestants intacts, avec un premier maximum précoce à la fin du premier mois de gestation, puis, à partir du 80^e jour, les valeurs maximales de la gestation.

Des résultats, il ressort que :

- dès la fin du premier mois de gestation la synthèse des œstrogènes n'est pas ovarienne ;
- l'élimination d'œstrone semble proportionnelle au nombre de fœtus dans des conditions physiologiques identiques ;
- la synthèse des œstrogènes pendant la gravidité n'est pas sous la dépendance de l'hypophyse maternelle.

On peut conclure que, au cours de la gestation chez la Truie, l'ensemble foeto-placentaire possède les activités enzymatiques nécessaires à la synthèse des œstrogènes.

INTRODUCTION

L'excrétion urinaire d'œstrogènes chez la Truie gestante a été bien étudiée dans les conditions normales de la gestation, notamment par ROMBAUTS (1962), LUNAAS (1962) et RAESIDE (1963). Ces auteurs ont mis en évidence l'importance de l'excrétion d'œstrone et la présence d'un premier maximum d'élimination à la fin du premier mois de gestation. ROMBAUTS, puis RAESIDE ont montré que l'excrétion n'aug-

mente ensuite de nouveau qu'à partir du 80^e jour de gestation pour se maintenir à de fortes valeurs jusqu'à la parturition. En nous reportant à nos résultats antérieurs sur truies intactes (ROMBAUTS, 1962), nous trouvons pour les truies 1245 et 1251 gestantes de 11 et 12 fœtus, une excrétion journalière moyenne de 0,54 mg d'œstrone par porcelet et pour une autre gestation de la Truie 1251 avec 19 fœtus, 0,58 mg. Les valeurs de RAESIDE (1963) pour une truie portant 14 fœtus donnent une moyenne de 0,71 mg par porcelet, valeur comparable aux nôtres si l'on effectue la correction pour les pertes au cours de l'analyse. Chez l'animal intact, compte tenu de l'élimination par la voie fécale et des métabolites autres que l'œstrone, on peut donc estimer l'excrétion journalière d'œstrogènes en fin de gestation chez la Truie à environ 1 mg par fœtus.

L'origine des fortes quantités d'œstrogènes est encore mal connue, particulièrement en début de gestation, car l'on n'avait encore jamais observé d'augmentation de la sécrétion à cette époque chez les autres Mammifères.

Par différents critères, notamment des réductions utérines en début de gestation et des ovariectomies en fin de gestation, l'un de nous a montré que la synthèse des œstrogènes, était vraisemblablement d'origine fœto-placentaire et non ovarienne, chez la Truie (ROMBAUTS, 1964). Nous avons cherché à confirmer ces résultats en évaluant la sécrétion d'œstrogènes chez des truies privées d'hypophyse ou d'ovaires dès les premiers jours de la gestation. Nous avons adopté comme critère de la sécrétion, la mesure de l'excrétion urinaire d'œstrone ; cette hormone représente en effet, 67 p. 100 des métabolites des œstrogènes de l'urine et son excrétion se fait à 95 p. 100 par la voie urinaire chez la Truie (ROMBAUTS, TERQUI ET FÈVRE, 1966).

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Matériel

Deux truies de race *Large-White* furent hypophysectomisées, l'une le 2^e jour, l'autre le 3^e jour après la saillie. L'intervention chirurgicale fut réalisée par voie transfrontale sus-orbitaire selon la technique décrite par du MESNIL du BUISSON, LÉGLISE et CHODKIEWICZ (1964). Deux truies de race *Large-White* furent ovariectomisées, l'une 5 jours après la saillie, l'autre 8 jours après la saillie. Les animaux opérés furent maintenus en cage à métabolisme dans une salle climatisée (25°C ± 1°C). Le placenta ne sécrétant pas de progestérone chez la Truie, chaque animal reçut quotidiennement, pendant toute la gestation, une injection intramusculaire de 300 mg de progestérone.

Les truies hypophysectomisées subirent une césarienne, la parturition ne s'étant pas produite spontanément le 114^e jour de gestation. L'autopsie de ces animaux a permis de vérifier que l'hypophysectomie avait été totale. Chez la Truie, l'hypophyse peut être enlevée facilement *in toto*. Elle ne présente en effet aucune adhérence.

Les urines, séparées des fèces, furent recueillies quantitativement dans des bacs en polyéthylène avec une quantité d'acide chlorhydrique suffisante pour obtenir un pH final de 4 à 5, soit quotidiennement, soit en réalisant des échantillons moyens de 2 ou 3 jours en prélevant des parties aliquotes. 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.

Méthodes de dosage

Les œstrogènes ont été dosés selon une méthode chromatographique dérivée de celle de BROWN (1955). Nous avons apporté à la méthode originale les modifications suivantes :

— l'hydrolyse acide des sulfo- et glucuroconjugués fut remplacée par l'hydrolyse enzymatique

(JAYLE et al., 1959) : l'échantillon d'urine est amené à pH 4,8 ; on ajoute ensuite un tampon acétate 2 M (1/10 du volume de l'échantillon). L'échantillon est mis alors à incuber 22 h environ à 37°C avec du suc digestif d'*Helix pomatia* (1 000 unités Fishman de β -glucuronidase et 8 000 unités Roy de sulfatase par ml d'urine). A l'aide de stéroïdes conjugués radioactifs, nous avons vérifié que l'hydrolyse était totale.

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

Les déterminations colorimétriques furent réalisées, avec extraction de la coloration rose de Kober 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 ont été effectuées à 3 longueurs d'onde afin d'appliquer la correction d'Allen : 510-540 et 570 m μ .

Ces modifications ont amélioré la sensibilité de la méthode, ainsi abaissée à 5 μ g d'œstrogènes excrétés en 24 h. Les valeurs sont données sans correction pour les pertes au cours du dosage et peuvent être ainsi comparées directement à nos résultats antérieurs (ROMBAUTS, 1962). Le pourcentage de récupération de l'œstrone par cette méthode est en moyenne de 85 p. 100.

RÉSULTATS

L'injection journalière de 300 mg de progestérone a permis le maintien de l'état gravidique. Les truies hypophysectomisées ont eu, l'une (n° 2403) 8 porcelets vivants, l'autre (n° 2532) 1 porcelet vivant. Une truie ovariectomisée (n° 2215) a donné naissance à 6 porcelets vivants, l'autre (n° 2677) a eu 4 porcelets morts quelques jours avant la mise bas. La natalité est cependant faible, en particulier pour la truie 2215, qui, au cours de trois gestations précédentes, n'avait jamais eu moins de 15 porcelets par portée.

Comme chez l'animal intact, le principal œstrogène présent dans l'urine des truies en expérience est l'œstrone (estra 1-3-5 (10) triène-3 ol-17 one). La sensibilité de la méthode utilisée est insuffisante pour que les mesures des faibles quantités d'œstradiol 17- β (estra 1-3-5 (10) triène 3,17- β diol) soient significatives. Aussi nous sommes-nous limités à l'analyse de la fraction « œstrone ».

L'excrétion urinaire d'œstrone chez trois des quatre truies présente la même cinétique que celle des animaux gestants intacts (fig. 1, 2, 3). Nous avons trouvé en effet, à la fin du premier mois de gestation, un premier maximum d'excrétion, avec des valeurs supérieures à 2 mg d'œstrone par 24 h.

La dernière truie, hypophysectomisée, n'a pu être mise en expérience qu'à partir du 30^e jour de gestation en raison de son état de santé à la suite de l'opération. Les valeurs d'œstrone urinaire pour cette truie diminuent du 30^e au 35^e jour de gestation, ce qui semble bien montrer que l'on se trouve dans la phase décroissante après le premier maximum d'excrétion (fig. 4).

Du 35^e au 75^e jour de gestation, les valeurs sont faibles, en général inférieures à 50 μ g par jour. A partir du 75^e jour l'excrétion urinaire d'œstrone recommence à augmenter avec des valeurs maximales au cours des derniers jours de gestation. Cependant, chez la truie 2677, ovariectomisée (fig. 4) les valeurs ont baissé régulièrement à partir du 108^e jour de gestation jusqu'à la mise bas. Cette baisse peut s'expliquer par la mort des fœtus *in utero*. La parturition de la truie 2215 a été prématurée par suite de l'arrêt trop précoce des injections de progestérone (au 108^e jour). Il nous manque donc les valeurs finales en général élevées.

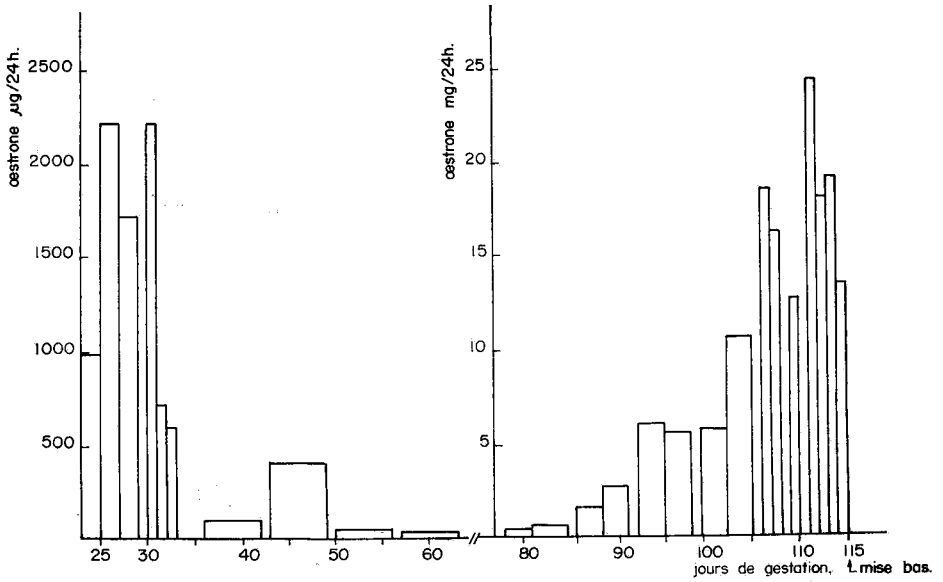


FIG. 1. — Excrétion urinaire d'oestrone
Truie 2403 — Hypophysectomisée

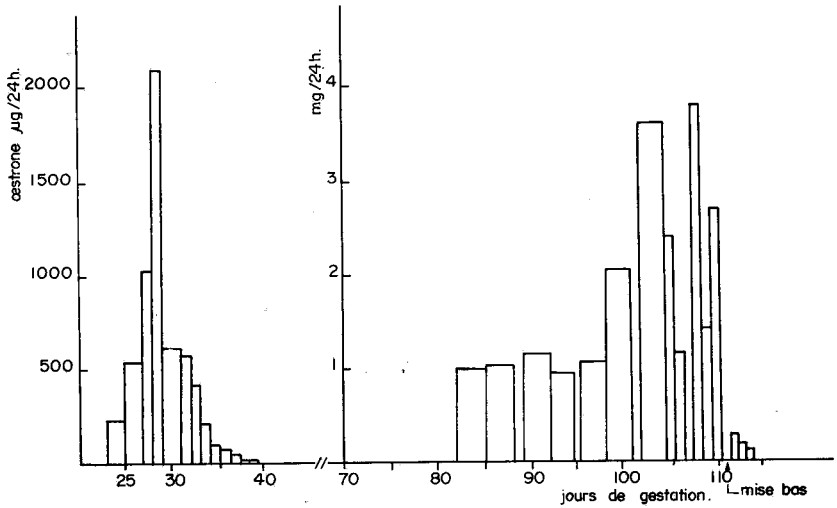


FIG. 2. — Excrétion urinaire d'oestrone
Truie 2215 — Ovariectomisée

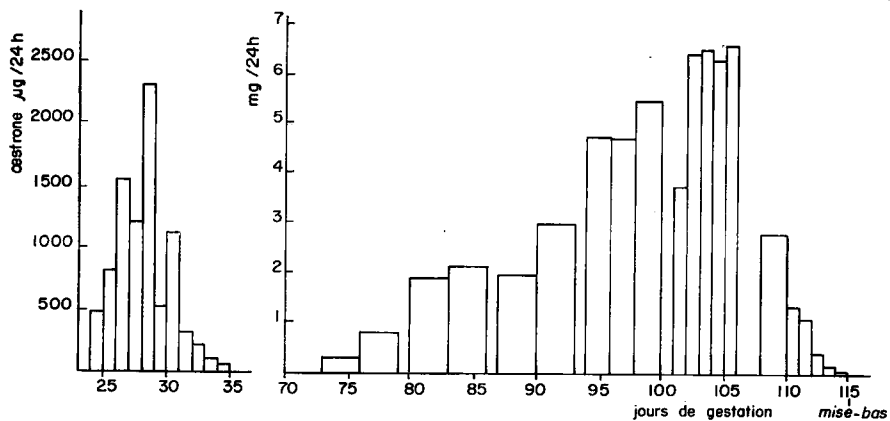


FIG. 3. — Excrétion urinaire d'œstrone
Truie 2677 — Ovariectomisée

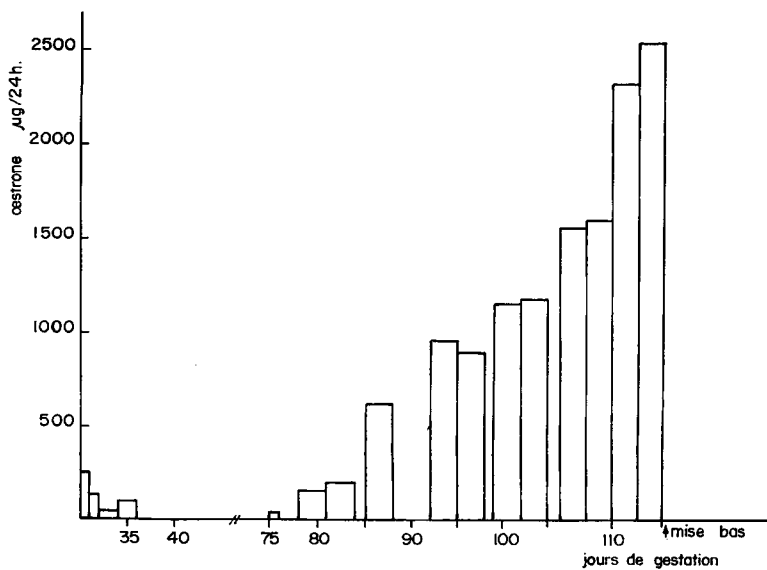


FIG. 4. — Excrétion urinaire d'œstrone
Truie 2532 — Hypophysectomisée

L'excrétion urinaire d'œstrone a été suivie après la mise bas chez la truie 2215, ovariectomisée (tabl. 1 et fig. 2). Le jour suivant la parturition, l'excrétion urinaire d'œstrone n'est plus que le 1/10 de ce qu'elle était avant et elle chute rapidement les jours suivants pour arriver à 0,02 mg le 4^e jour, comme chez l'animal intact (ROMBAUTS, 1962).

TABLEAU 1

Excrétion urinaire d'œstrone
(Truie 2215 ovariectomisée)

Avant parturition		Après parturition	
Jours	Œstrone (mg/24 h)	Jours	Œstrone (mg/24 h)
— 5 et — 6	1,77	+ 1	0,26
— 3 et — 4	3,04	+ 2	0,18
— 1 et — 2	1,98	+ 3	0,11
0	parturition	+ 4	0,02

Si la cinétique de l'excrétion est la même pour les quatre animaux, il en va tout autrement de son amplitude, particulièrement en fin de gestation. Les deux animaux hypophysectomisés ont un maximum d'élimination journalière d'œstrone très différent : 22,7 mg pour la truie 2403 et 2,9 mg pour la Truie 2532, mais, ramenée à un porcelet, l'excrétion est identique : 2,84 et 2,9 mg respectivement (tabl. 2). Ce fait pourrait permettre de penser qu'il y aurait une proportionnalité entre la sécrétion d'œstrogènes et le nombre de fœtus chez la Truie. Il faudrait évidemment répéter cette expérience sur un nombre plus important d'animaux pour vérifier cette relation.

TABLEAU 2

Excrétion urinaire d'œstrone en fonction du nombre de fœtus
(Résultats correspondant au maximum d'excrétion)

Numéro de l'Animal	Hypophysectomisées		Ovariectomisées	
	2403	2532	2215	2677
Nombre de fœtus	8	1	6	4
Œstrone : mg par jour	22,7	2,9	3,8	6,64
Œstrone : mg par jour et par fœtus	2,84	2,9	0,64	1,65

Bien qu'elles n'aient plus d'ovaires, les truies ovariectomisées présentent un premier maximum d'excrétion au 28^e jour de gestation, d'ampleur comparable à celle d'animaux intacts et à celle de l'hypophysectomisée 2403 (2,1 et 2,3 mg/24 h). En revanche, en fin de gestation, l'excrétion urinaire est relativement faible. Le maximum trouvé le 109^e jour de gestation chez l'animal 2215 est de 3,8 mg par 24 h.

La même truie au cours d'une gestation antérieure a présenté une excrétion urinaire d'œstrone de 7,96 mg par 24 h à J. 108 et de 9,21 mg par 24 h à J. 109. L'importance des portées n'était pas la même dans les deux cas : 6 porcelets lors de la gestation après ovariectomie et 17 porcelets pour l'autre. Si l'on considère l'excrétion urinaire d'œstrone par 24 h et par porcelet (tabl. 2), aux 108^e et 109^e jours de gestation chez cette truie, on a pour la gestation après ovariectomie, 0,64 mg et pour la gestation normale 0,54 mg. Ainsi, au même stade de gestation et à portée égale, nous trouvons des valeurs très voisines chez le même animal, avant et après ovariectomie. Pour la truie 2677 ovariectomisée, nous avons une excrétion maximale de 1,65 mg par jour et par fœtus. Cet animal maintenu dans une pièce chaude a reçu de l'eau de boisson à volonté et sa diurèse fut plus abondante que celle des animaux limités en eau.

DISCUSSION

A la fin du premier mois de gestation, la truie 2215 présente une excrétion urinaire d'œstrone de 2,10 mg par 24 h, valeur peu différente de celle de fin de gestation (3,04 mg par 24 h). Chez des animaux intacts ou même hypophysectomisés, les valeurs à ces deux périodes sont nettement différentes (5 à 10 fois plus fortes en fin de gestation). On pourrait penser que l'importance du premier maximum d'excrétion est indépendante de la taille de la portée. Cette hypothèse semble devoir être abandonnée. En effet, ROMBAUTS (1964), mesurant l'excrétion urinaire d'œstrone chez des truies qui avaient subi des réductions utérines au cours de la gestation, a trouvé des valeurs supérieures à celles du cycle œstral (ce qui confirmait l'état gestatif) mais nettement inférieures à celles que l'on rencontre dans les gestations des animaux intacts. Il faut plutôt penser qu'il y a eu entre la fin du premier mois de gestation et la parturition, des résorptions de fœtus, hypothèse confirmée par le nombre de corps jaunes présents au moment de l'ovariectomie : les ovaires de la truie 2677 présentaient 13 corps jaunes à la castration alors qu'il n'y a eu que quatre porcelets à la parturition.

Du MESNIL du BUISSON (1966) a constaté sur de nombreuses truies que, 8 jours après hypophysectomie, les ovaires n'ont plus de follicules en développement et qu'ils régressent très vite. On peut donc dire qu'au cours de notre expérience, aussi bien chez les animaux hypophysectomisés que chez les animaux ovariectomisés, les œstrogènes présents dans l'urine ont une origine extra-ovarienne. La progestérone exogène administrée aux truies ne modifie pas la production d'œstrogènes. En dehors des deux maximums d'excrétion, en effet, nous ne trouvons que très peu d'œstrone alors que les injections de progestérone étaient maintenues. ROMBAUTS (1964), après avoir ovariectomisé des truies vers le 100^e jour de gestation maintenait la gestation par l'injection de 200 mg de progestérone. Deux animaux ont avorté. Chez ces truies, bien que ce fût en fin de gestation, l'excrétion urinaire d'œstrone était très faible. Enfin, AINSWORTH et RYAN (1966) ont montré que *in vitro* des préparations de divers placentas de mammifères, en particulier de truies, n'étaient pas capables de synthétiser des œstrogènes en quantités détectables après incubation avec des stéroïdes

en C_{21} et principalement avec la progestérone, ce qui laisse supposer une activité 17-20 desmolase placentaire très faible ou même nulle.

La biosynthèse des œstrogènes au cours de la gestation chez la Truie a donc bien lieu dans l'ensemble fœto-placentaire, même à la période précoce du premier mois. Bien que le placenta de Truie soit de type épithéliochorial et qu'il soit incapable de synthétiser la progestérone nécessaire au maintien de la gestation, il possède des activités enzymatiques permettant la synthèse des œstrogènes. L'activité enzymatique du placenta de Truie a d'ailleurs été mise directement en évidence *in vitro* par AINSWORTH et RYAN (1966).

Nous avons vu que la quantité d'œstrogènes excrétés semblait proportionnelle au nombre de jeunes par portée et qu'en cas de gestation normale les valeurs de l'excrétion urinaire d'œstrone se situaient entre 0,5 et 0,7 mg par jour et par fœtus. Cependant une augmentation de la diurèse semble augmenter l'élimination des œstrogènes, ainsi que nous l'avons trouvé chez les animaux hypophysectomisés et chez un animal ovariectomisé.

Chez les animaux hypophysectomisés, nous avons trouvé 2,9 mg par porcelet, soit trois fois plus que chez les animaux intacts. Les truies hypophysectomisées ont un diabète insipide donc une diurèse élevée (10 à 15 litres d'urines par jour, soit deux à trois fois plus que la diurèse normale). La modification du fonctionnement rénal entraîne peut-être une accélération de l'élimination des stéroïdes œstrogènes, ce qui pourrait expliquer que la synthèse d'hormone s'accroisse. Cependant, il semble que ce ne soit pas le seul facteur qui intervienne dans l'excrétion accrue d'œstrone par les animaux hypophysectomisés. D'autres hypothèses peuvent aussi expliquer ce phénomène. Quel qu'en soit le mécanisme, cette augmentation de l'excrétion d'œstrogènes chez l'animal hypophysectomisé, si elle se confirme sur d'autres animaux, indique soit une synthèse accrue, soit que l'excrétion chez les animaux intacts ne correspond qu'à une partie des hormones sécrétées, part qui pourrait être modifiée par le fonctionnement hypophysaire et rénal.

Les hormones hypophysaires sont indispensables chez la Truie pour induire la sécrétion de progestérone des corps jaunes nécessaires au maintien de la gestation (ANDERSON et *al.*, 1965). Les résultats obtenus montrent que, si l'intégrité du fœtus et du placenta est respectée, la biosynthèse des œstrogènes s'effectue normalement, indépendamment de toute stimulation hypophysaire maternelle.

Cette expérience ne permet pas de connaître les rôles respectifs du fœtus et du placenta dans la biosynthèse des œstrogènes, ni de savoir si cette synthèse peut s'effectuer à partir d'acétate ou de cholestérol, ou si elle nécessite des précurseurs stéroïdes plus proches dans la voie de la biosynthèse. On peut penser que ces précurseurs sont, comme pour l'espèce humaine, des stéroïdes surrenaliens d'origine maternelle ou fœtale.

Nous poursuivrons donc cette étude par des essais de dissociations fœto-placentaires et des injections de précurseurs radioactifs, notamment la déhydroépiandrostérone et son conjugué sulfate, la Δ_4 -androstènedione, la testostérone, administrés soit dans le compartiment maternel, soit dans le compartiment fœtal.

SUMMARY

ROLE OF THE PITUITARY AND OVARIES IN ŒSTROGEN
BIOSYNTHESIS IN THE PREGNANT SOW

The origin of œstrogen synthesis during the pregnancy of the sow was studied. The urinary excretion of œstrone was estimated on four sows : two were hypophysectomized and two were ovariectomized at the beginning of their pregnancies. The four sows were intramuscularly injected with 300 mg of progesterone per day to prevent abortion.

In spite of the absence of ovaries and pituitary, the urinary excretion of œstrone followed a pattern similar to that of intact animals (fig. 1, 2, 3, 4). An excretory peak (2.10 mg per day) was recorded at the end of the first month. The highest values were reached towards the end of gestation after day 80. In both hypophysectomized sows, according to the number of fœtuses borne, the excretion was remarkably high (2.9 mg per day and per fœtus).

The urinary excretion of œstrone decreased sharply just after farrowing (table 1 and fig. 3).

The results of this experiment led us to the following conclusions :

— The urinary œstrogens present, from the end of the first month of pregnancy on, are not of ovarian origin.

— Œstrone excretion seems related to the number of fœtuses under identical physiological conditions.

— The synthesis of œstrogens during pregnancy is not under control of the maternal pituitary.

It can be concluded that, in the pregnant sow, the placenta and the fœtus are in possession of all the necessary enzymes and partake in the œstrogen synthesis. They may start from the initiating metabolite steroids of maternal or foetal origin.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AINSWORTH L., RYAN K. J., 1966. Steroid hormone transformations by endocrine organs from pregnant mammals. I. Estrogens biosynthesis by mammalian placental preparation *in vitro*. *Endocrinology*, **79**, 875-883.
- ANDERSON L. L., LÉGLISE P. C., DU MESNIL DU BUISSON F., ROMBAUTS P., 1965. Interaction des hormones gonadotropes et de l'utérus dans le maintien du tissu lutéal ovarien chez la Truie. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **261**, 3675-3678.
- BAULD W. S., 1956. A method for the determination of œstriol, œstrone and œstradiol 17- β in human urine by partition chromatography and colorimetric estimation. *Biochem. J.*, **63**, 488-495.
- 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 17- β in human urine. *J. endocrinol.*, **16**, 41-48.
- ITTRICH G., 1958. Eine neue Methode zur chemischen Bestimmung der œstrogen Hormone im Harn. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie.*, **312**, 1-14.
- ITTRICH G., 1960. Untersuchungen über die Extraktion des roten Kober-Farbstoffe durch organische Lösungsmittel zur Östrogensbestimmung 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.
- LUNAAS T., 1962. Urinary œstrogen levels in the Sow during œstrous cycle and early pregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, **4**, 13-20.
- DU MESNIL DU BUISSON F., LÉGLISE P. C., CHODKIEWICZ J. P., 1964. Technique de l'hypophysectomie par voie transfrontale sus-orbitaire chez le Porc. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, **4**, 229-237.
- DU MESNIL DU BUISSON F., 1966. Communication personnelle.
- RAESIDE J. I., 1963. Urinary œstrogen excretion in the Pig during pregnancy and parturition. *J. Reprod. Fertil.*, **6**, 427-431.
- ROMBAUTS P., 1962. Excrétion urinaire d'œstrogènes chez la Truie pendant la gestation. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, **2**, 151-156.
- ROMBAUTS P., 1964. Lieu de synthèse des hormones stéroïdes œstrogènes pendant la gestation de la Truie. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **258**, 5257-5259.
- ROMBAUTS P., TERQUI M., FÈVRE J., 1966. Site of œstrogens production and route of excretion in domestic animals. In *Second International Congress on hormonal steroids*, Milan, 1966, **283**, Excerpta medica Foundation, Amsterdam.