

## Comparaison du métabolisme des stéroïdes par les testicules et les ovaires de l'embryon de Rat de 19 jours en culture *in vitro*.

J.-P. WENIGER, A. ZEIS

Laboratoire de Zoologie et d'Embryologie expérimentale,  
Université Louis-Pasteur,  
12, rue de l'Université, 67000 Strasbourg, France.

---

**Summary.** *A comparative study of steroid metabolism by the gonads of the 19-day old rat embryo in organ culture.*

Oestrone was the main oestrogen formed by the ovaries from both dehydroepian-drosterone and testosterone ; oestradiol was only formed minimally. Much less oestrogen was formed in the testes, oestradiol being predominant. Androstenedione was the prevailing androgen in the ovaries and testosterone in the testes.

These results obtained *in vitro* are probably also true *in vivo*. They show high aromatase activity in the ovaries.  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase favored androstenedione formation, and hence oestrone formation, in the ovaries and testosterone formation, and hence oestradiol formation, in the testes.

Different results might be obtained at different embryonic stages.

---

### Introduction.

Le métabolisme des stéroïdes par l'ovaire embryonnaire de Mammifère a déjà fait l'objet d'un certain nombre de travaux, mais dont le côté quantitatif était généralement absent. Seuls Milewich *et al.* (1977) et George et Wilson (1978) indiquent que la testostérone et l'androstènedione étaient transformées préférentiellement en œstradiol, aussi bien par l'ovaire embryonnaire de Lapin que par l'ovaire fœtal humain, l'œstrone ne représentant pour ainsi dire qu'un sous-produit. Aussi, était-il surprenant que l'ovaire embryonnaire de Rat formât presque exclusivement de l'œstrone à partir de testostérone (Weniger *et al.*, 1984).

D'autre part, les transformations de stéroïdes par le testicule embryonnaire de Mammifère, et en particulier l'aromatation des androgènes, ont été peu étudiées. Là, la formation d'œstradiol était prépondérante (Weniger et Zeis, 1983). Devant ce chassé-croisé, une étude comparative des transformations que les gonades des deux sexes étaient capables de faire subir aux stéroïdes paraissait intéressante. Dans le présent article, nous exposons les résultats d'une telle étude, où il s'agissait de déterminer l'importance de certains métabolites, et

nommément des œstrogènes, formés par les gonades de l'embryon de Rat de 19 jours à partir de testostérone, d'androstènedione ou de déhydroépiandrostérone radioactives.

### Matériel et méthodes.

Les embryons de Rat utilisés étaient de race Wistar et avaient 19 jours. Testicules et ovaires ont été sectionnés en deux et cultivés *in vitro* sur le milieu gélosé de Wolff et Haffen (1952) en présence de testostérone  $^3\text{H}$ -1,2,6,7 (CEA), d'androstènedione  $^3\text{H}$ -1,2,6,7 (Amersham) ou de déhydroépiandrostérone  $^3\text{H}$ -1,2,6,7 (Amersham) dont la pureté radiochimique, vérifiée par chromatographie sur couche mince de gel de silice, était  $\geq 95\%$  et dont l'activité spécifique variait entre 65 et 95 Ci/mmol. Le marquage dans les positions  $1\beta$  et  $2\beta$ , d'où le  $^3\text{H}$  est éliminé au cours de l'aromatization, variait entre 0 et 15 %, et il n'a pas été tenu compte de cette perte d'activité dans le calcul du pourcentage de transformation.

Les substances radioactives étaient dissoutes dans le mélange propane-1,2-diol-liquide de Tyrode 1 : 3 à une concentration voisine de  $4\ \mu\text{Ci}/10\ \mu\text{l}$ . Chaque expérience portait sur 40 paires de testicules, qui ont été baignés dans  $20\ \mu\text{l}$  de solution radioactive, ou sur 20 paires d'ovaires, qu'il a suffi, étant donné leur taille beaucoup plus petite, de baigner dans  $5\ \mu\text{l}$  de solution.

Après 24 h de culture à  $37\ ^\circ\text{C}$ , les milieux sont soumis à l'analyse. Celle-ci, qui a déjà été décrite en détail (Weniger et Zeis, 1983 ; Weniger *et al.*, 1983), comprend les étapes suivantes : 1) hydrolyse par l'acide chlorhydrique à chaud, afin d'obtenir une phase liquide homogène se prêtant à l'extraction par l'éther ; 2) extraction de l'hydrolysate par l'éther éthylique ; 3) fractionnement de l'extrait en une fraction « androgènes » et une fraction « œstrogènes » ; 4) séparation de la testostérone et de l'androstènedione par chromatographie sur couche mince ; 5) méthylation de la fraction « œstrogènes » et séparation chromatographique de l'œstrone et de l'œstradiol méthylés ; 6) formation de dérivés acétylés ou réduits ; 7) recristallisation à activité spécifique constante après addition de 15-20 mg de la substance non radioactive au dernier éluat. C'est sur la valeur constante de l'activité spécifique par rapport au  $^3\text{H}$  qu'est basé le calcul du pourcentage de transformation. Celui-ci est corrigé par le pourcentage de récupération que l'addition d'une quantité traceuse de la substance marquée au  $^{14}\text{C}$  permet de déterminer. Les exemples du tableau 2 illustrent les différentes étapes du calcul.

### Résultats et discussion.

Les résultats, consignés dans le tableau 1, donnent lieu aux remarques suivantes. La différence entre les testicules et les ovaires, en ce qui concerne le métabolisme des stéroïdes, semble découler du fait que la  $17\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase favorise la formation de testostérone dans le cas des testicules, celle d'androstènedione dans le cas des ovaires. A partir de là, même si l'aroma-

tase est incomparablement moins active dans les testicules que dans les ovaires, on comprend que la formation d'œstradiol prédomine dans les premiers, celle d'œstrone dans les seconds. L'œstrone étant l'œstrogène principal formé par les ovaires aussi bien à partir de déhydroépiandrostérone que de testostérone, il est facile de prévoir qu'avec l'androstènedione comme substrat le résultat serait le

TABLEAU 1

*Pourcentages de transformation de la testostérone (T), de l'androstènedione (A) et de la déhydroépiandrostérone (DHA) radioactives en œstrone (E<sub>1</sub>), œstradiol (E<sub>2</sub>), testostérone et androstènedione.*

Substrats	T A.S. : 95 Ci/mmol c : 3,9 $\mu$ Ci/10 $\mu$ l			A A.S. : 72 Ci/mmol c : 3,9 $\mu$ Ci/10 $\mu$ l			DHA A.S. : 65 Ci/mmol c : 4,1 $\mu$ Ci/10 $\mu$ l			
	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	A	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	T	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	T	A
Testicules	0,009	0,052	1,8	0,058	0,076	11	0,018	0,056	14	1,8
Ovaires	4,5	0,094	19	—	—	—	3,4	0,078	0,20	15

A.S. : Activité spécifique ; c : concentration radioactive.

TABLEAU 2

*Exemples d'identification de métabolites par recristallisation à activité spécifique constante et calcul du pourcentage de transformation.*

Substrat Gonades Métabolite	Déhydroépiandrostérone Testicules Oestrone		Déhydroépiandrostérone Testicules Oestradiol		Testostérone Ovaires Androstènedione	
	14 <sub>C</sub>	3 <sub>H</sub>	14 <sub>C</sub>	3 <sub>H</sub>	14 <sub>C</sub>	3 <sub>H</sub>
	Cristaux 1	294	22	287	81	98
Eaux-mères 1	320	338	308	659	97	10 200
Cristaux 2	268	13,4	290	65	99	6 561
Eaux-mères 2	309	56	299	172	96	6 586
Cristaux 3	265	11,7	292	58	100	6 643
Eaux-mères 3	287	13,5	306	110	103	6 326
Cristaux 4	269	12,5	280	51		
Eaux-mères 4	281	16,1	291	77		
Cristaux 5	267	12,3	276	50		
Eaux-mères 5	—	—	289	67		
A.S. constante	267	12,2	286	50,5	99	6 531
% constance	0,84 %	3,8 %	3,6 %	1,0 %	4,2 %	3,1 %
Activité totale (× 15) 4 005		183	(× 15) 4 290	758	(× 20) 1 980	130 620
Activité départ	15 600	3 979 000	12 500	3 979 000	5 900	2 050 000
% récupération	26 %		34 %		34 %	
% transformation		0,018 %		0,056 %		19 %

Activité spécifique des cristaux et des eaux-mères exprimée en coups par minute par milligramme. Les valeurs constantes sont encadrées.

même. Ajoutons que d'autres métabolites identifiés sont la dihydrotestostérone dans le cas des testicules et l'androstérone dans le cas des ovaires, mais en l'absence d'utilisation de traceurs marqués au  $^{14}\text{C}$  leur pourcentage de transformation ne peut être indiqué qu'assez grossièrement comme étant de l'ordre d'1 %.

On peut se demander dans quelle mesure ces résultats obtenus *in vitro* s'appliquent aux conditions *in vivo*. L'aromatisation de la testostérone par les testicules est certaine, puisqu'elle est présente en abondance (Warren *et al.*, 1973 ; Naessany *et al.*, 1981). Dans le cas des ovaires, la production endogène d'œstradiol a pu être démontrée, mais seulement après stimulation par l'AMPc (Benhaim *et al.*, 1983). Il est vraisemblable que l'œstrone serait décelée plus facilement.

## Conclusion.

En conclusion, chez l'embryon de Rat de 19 jours, l'activité aromatisique est notable dans les ovaires, insignifiante dans les testicules. La  $17\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase déplace l'équilibre de la réaction réversible androstènedione  $\rightleftharpoons$  testostérone vers la testostérone dans les testicules, vers l'androstènedione dans les ovaires ; il s'ensuit que l'équilibre œstrone  $\rightleftharpoons$  œstradiol évolue vers l'œstrone dans les ovaires, vers l'œstradiol dans les testicules. A ce sujet, on remarque que le testicule, qui assure la masculinisation de l'appareil génital (Jost, 1946-47) sécrète justement l'androgène le plus actif, alors que l'ovaire, qui ne semble jouer aucun rôle dans la différenciation sexuelle (Jost, 1946-47), produit l'œstrogène le moins actif. Le rôle de la  $17\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase dans la différenciation sexuelle semble donc capital. Il est à noter qu'on connaît dans l'espèce humaine des cas de masculinisation incomplète par insuffisance d'activité  $17\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénasique d'origine génétique (Zurbrugg, 1974).

Reçu en novembre 1984.

Accepté en janvier 1985.

## Références

- BENHAIM A., GANGNERAU M.-N., PICON R., 1983. Sécrétion *in vitro* d'œstradiol- $17\beta$  par les gonades de fœtus femelles de Rat en présence de différents précurseurs et de dibutyryl AMPc. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **297**, Sér. III, 247-250.
- GEORGE F. W., WILSON J. D., 1978. Conversion of androgen to estrogen by the human fetal ovary. *J. clin. Endocrin. Metab.*, **47**, 550-555.
- JOST A., 1946-47. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de Lapin. III. Rôle des gonades fœtales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, **36**, 271-315.
- MILEWICH L., GEORGE F. W., WILSON J. D., 1977. Estrogen formation by the ovary of the rabbit embryo. *Endocrinology*, **100**, 187-196.
- NAESSANY S., HABERT R., PICON R., 1981. Effects of androgen injections and decapitation on the pituitary-gonadal axis and genital tract of fetal rats at the end of gestation. *J. Endocrin.*, **88**, 359-366.

- WARREN D. W., HALTMEYER G. C., EIK-NES K. B., 1973. Testosterone in the fetal rat testis. *Biol. Reprod.*, **8**, 560-565.
- WENIGER J.-P., CHOURAQUI J., ZEIS A., 1983. Synthèse d'œstrogènes par l'ovaire embryonnaire de Poulet à partir de divers précurseurs radioactifs : comparaison des taux de synthèse. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, **23**, 995-1002.
- WENIGER J.-P., CHOURAQUI J., ZEIS A., 1984. Conversion of testosterone and progesterone to oestrone by the ovary of the rat embryo in organ culture. *J. Steroid Biochem.*, **21**, 347-349.
- WENIGER J.-P., ZEIS A., 1983. Aromatisation de la testostérone par le testicule embryonnaire de Rat. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **296**, Sér. III, 293-296.
- WOLFF E., HAFFEN K., 1952. Sur le développement et la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires d'Oiseau en culture *in vitro*. *J. exp. Zool.*, **119**, 381-399.
- ZURBRÜGG R. P., 1974. Inborn errors in testosterone biosynthesis with special reference to 17-oxosteroid reductase deficiency. *Helv. paediat. Acta*, Suppl. **34**, 63-77.
-