

MISE EN ÉVIDENCE DE STÉROÏDES OESTROGÈNES PAR  
CHROMATOPLAQUE DANS L'OVAIRE SALÉ  
DU COLIN D'ALASKA, *THERAGRA*  
*CHALCOGRAMMA PALLAS*\*

par

Tadasi NOMURA et Yasuhiko TSUCHIYA

*Laboratoire de Biochimie marine, Faculté d'Agriculture,  
Université de Tohoku, Sendai, Japon*

(Reçu, le 26 Février 1964)

Peu de travaux ont été effectués jusqu'à présent sur les œstrogènes des ovaires des poissons, bien que la majorité des publications concerne l'homme et les vertébrés supérieurs. Surtout, il n'y a jamais de travail chez les poissons au point de vue de chimie alimentaire.

En 1958, Wotiz et coll. (1), (2) ont confirmé la présence de l'œstrone, l'œstradiol-17 $\beta$  et de la progestérone dans l'ovaire de sélachiens, *Squalus suckleyi*, et ensuite Dean et Jones (3), en 1959, ont montré que l'ovaire de dipneustes, *Protopterus annectens*, contient des œstrogènes et la progestérone. Chieffi (4) les a également trouvés dans l'ovaire de *Torpedo marmorata* et de *Conger conger*. En 1961, Galzigna (20) a indiqué la présence de l'œstradiol-17 $\beta$  chez la truite arc-en-ciel, et l'œstradiol-17 $\beta$ , l'œstriol et 16-épicoestriol chez la carpe. Par ailleurs, Gottfried et coll. (21) ont établi que l'ovaire et le sac de l'ovaire de *Gadus callarias* contient des œstrogènes. Botticelli et coll. (22) ont récemment identifié la progestérone et l'œstradiol-17 $\beta$  à partir de l'ovaire de *Petromyzon marinus*.

En utilisant la chromatoplaque, contribué à l'évolution de ce procédé par Kirchner et coll. (5), Reitsem (6), Stahl (7), Demole (8), (9) et Barbier (10), il est possible de mettre en évidence de la présence de stéroïdes. En 1959, Barbier et coll. (11) ont réussi la séparation de quelques dérivés de stéroïdes par chromatoplaque et ensuite Barbier et Zavialof (12) ont attaqué des composées œstrogènes. Plus récemment, plusieurs travaux ont été exposés sur la technique de chromatoplaque des stéroïdes.

---

\* Travail réalisé grâce à la subvention de la recherche scientifique du Ministère de l'Éducation.

La note décrite ici a pour but d'étude, par chromatoplaque modifiée la méthode de Demole (9) et de Barbier et Zavialof (12), des œstrogènes dans l'ovaire de poisson de mer, *Theragra chalcogramma*, qui est habituée à manger en générale au Japon comme le produit salé (momijiko ou tarako, en japonais).

## Technique

### § Chromatoplaque

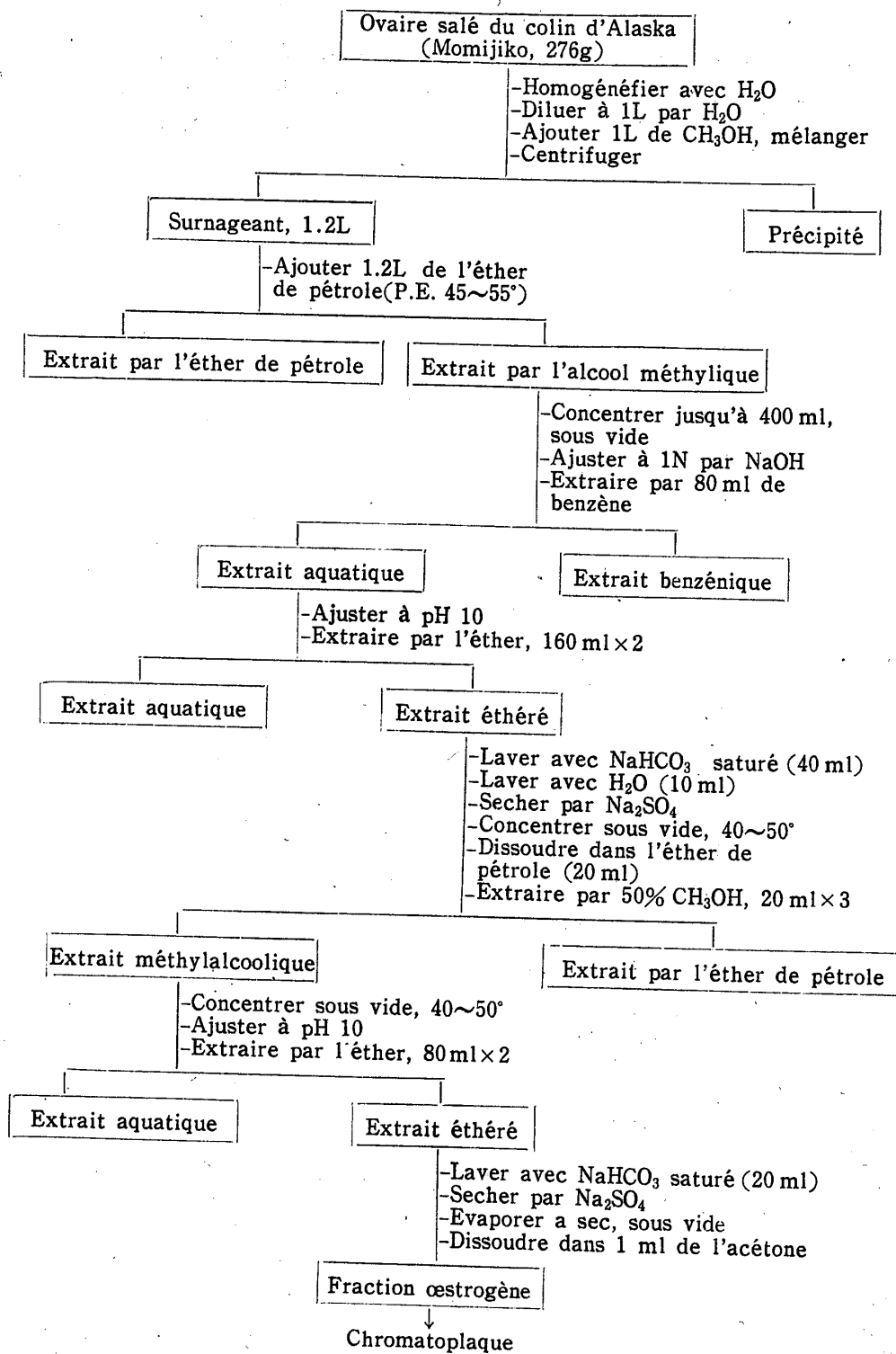
Nous avons utilisé des plaques de verre (15×10×0.3 cm) couvertes avec pâte du mélange: l'acide silicique (Mallinckrodt, tamisé 120 mesh) et l'amidon de pomme de terre insoluble (5% du mélange) et l'eau (1.8 fois la quantité du mélange). Bien malaxer le tout, chauffer au voisinage de l'ébullition sur bec de gaz jusqu'à obtenir l'épaississement maximum de la masse (2~3 minutes). Ensuite on dilue avec l'eau (environ 1.6 fois la quantité du mélange), chauffe à nouveau rapidement au voisinage de l'ébullition et laisse refroidir. Le mélange est prêt pour le recouvrement des plaques. On verse 11 ml de suspension d'acide silicique amidonné au centre de chaque plaque; le liquide est immédiatement réparti sur toute la surface du verre. Quelques secousses transversales achèveront la répartition régulière du film liquide. Après séchage partiel sur un plan bien horizontal, à température du laboratoire, les plaques peuvent être introduites dans une étuve réglée à 60° (90 minutes) ou bien à 100° (30 minutes). Les Rf sont influencés par la condition d'activation des plaques, mais les ordres d'arrangement des taches ne varient point.

Nous utilisons huit stéroïdes sexuels comme contrôle (Produit Sigma et Tokyo Kasei Co.). On dépose ces substances ou l'extrait de l'ovaire comme la technique de la chromatographie sur papier. Les chromatoplaques déposées ont été développées par le système de solvant; n-hexane 6: acétate d'éthyle 4 (v/v), dans la boîte en verre (18.5×12×7.5 cm). On utilise l'acide sulfurique fumant à 15% comme révélateur et on peut déceler de stéroïdes sexuels par couleur des taches ou par ses fluorescences.

### § La séparation de la fraction des œstrogènes de l'ovaire du colin d'Alaska

Nous avons acheté une paire de l'ovaire salé d'un colin d'Alaska, fabriqué par salage et conservé à environ 0° jusqu'à l'achat, à la poissonnerie de Sendai au commencement de mars. La saison de la ponte du colin d'Alaska est du décembre à l'avril. Ainsi, cet ovaire est just au moment de la ponte. La séparation des œstrogènes libres de l'ovaire a été effectuée par la technique de Dean et Jones (3), résumée schématique dans le tableau 1. Cette fraction obtenue a donné une réaction de Kober pleinement positive.

Tab. 1. Résumé schématique de la technique du partage de la fraction œstrogène.



### Résultats et Discussion

D'abord, nos essais ont porté sur l'œstrone, l'œstradiol-17 $\beta$  et l'œstriol par chromatoplaque. Elles sont bien séparées dans la condition décrite en haut, et les couleurs et les couleurs de fluorescences sont indiquées dans la figure 1 et le tableau 2. Sur huit stéroïdes sexuels authentiques, les Rf, la sensibilité de détection, les couleurs de fluorescences sont indiquées dans le tableau 2.

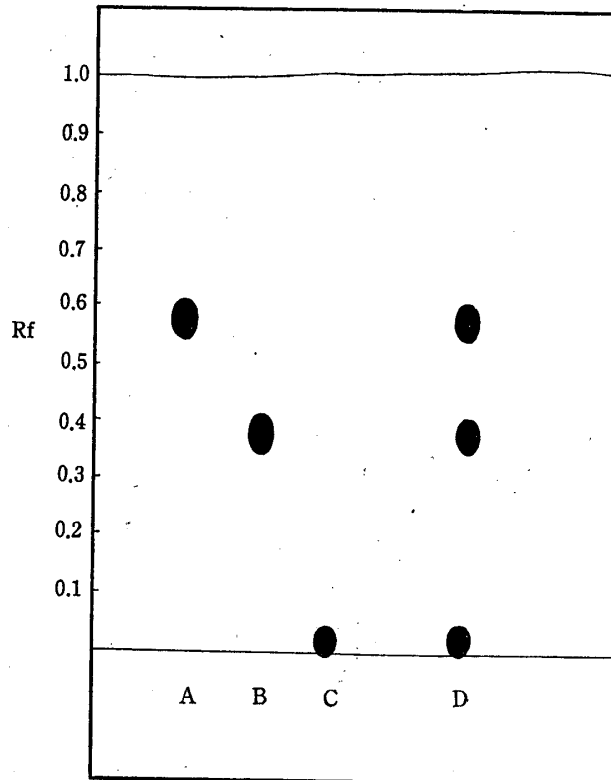


Fig. 1. Chromatoplaque des œstrogènes.  
Activation de plaque : 100°, 30 minutes  
A : œstrone (Rf 0.57)  
B : œstradiol-17 $\beta$  (Rf 0.37)  
C : œstriol (Rf 0.02)  
D : mélange

Tab. 2. Les propriétés de stéroïdes sexuels sur chromatoplaque.\*

Hormone sexuelle	Sensibilité de détection( $\mu$ g)	Rf	Couleur	Fluorescence
Oestrone	10	0.54	jaune orange	bleu
Oestradiol-17 $\beta$	5	0.37	" "	"
Oestriol	5	0.02	rosé	"
Progestérone	20	0	—	"
Stilbestrol	3-5	0.62	orange	—
Testostérone	20-30	0	—	bleu faible
Propionate de testostérone	20	0	—	" "
Méthyltestostérone**	1	0.28 ; 0	—	jaune vert

\* Activation des plaques : 60°, 3 hrs.

\*\* peut-être impur.

Une analyse chromatographique sur plaque peut être achevée en 40 minutes. La simplicité, la rapidité et aussi la sensibilité de la méthode sont préférables à la séparation par chromatographie sur papier. Cependant il y a plusieurs stéroïdes sexuels dans les tissus de l'organisme, et il est assez difficile de séparer de diverses hormones sexuelles et de identifier nettement dans le court trajet du développement sur plaque (tableau 2). Ainsi, nous avons effectué le partage de la fraction œstrogène par la méthode de Dean et Jones (3). La fraction œstrogène obtenue ne contient pas d'œstrogènes conjuguées. La chromatoplaque de cette fraction indique l'existence de l'œstrone, l'œstradiol-17 $\beta$  et trois substances non identifiées (Rf: 0; 0.04; 0.15) (figure 2). Nous n'avons pas pu distinguer entre l'œstriol (Rf 0.02) et la substance Rf 0.04 dans cette plaque, bien que l'existence de l'œstriol est possible dans l'ovaire de poisson comme les travaux des autres auteurs (19).

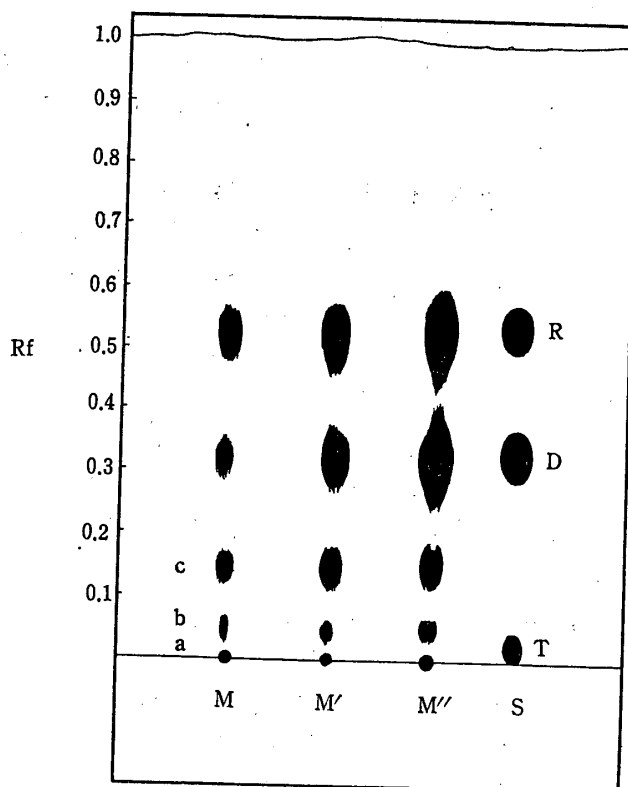


Fig. 2. Chromatoplaque de la fraction œstrogène non conjugué de Momijiko, l'ovaire salé du colin d'Alaska, *Theragra chalcogramma* PALLAS

Activation de plaque : 60°, 90 minutes

S : standard. R : œstrone (Rf 0.53). D : œstradiol-17 $\beta$  (Rf 0.32). T : œstriol (Rf 0.02), M : solution acétonique de la fraction œstrogène de momijiko; 0.02 ml. M' : 0.03 ml. M'' : 0.05 ml. a : non identifié (Rf 0). b : non identifié (Rf 0.04). c : non identifié (Rf 0.15)

Il est permis d'estimer que momijiko contient au moins 900  $\mu\text{g}/\text{kg}$ -tissu de l'œstrone et 450  $\mu\text{g}/\text{kg}$ -tissu de l'œstradiol-17 $\beta$  par la sensibilité sur chromatoplaque. En comparant aux résultats déjà exposés, il est remarquable que les teneurs en œstrogènes de momijiko sont très hautes : par exemple, les teneurs en œstrogènes pour Kg-tissu ; 1  $\mu\text{g}$  de l'œstrone et 4.8  $\mu\text{g}$  de l'œstradiol-17 $\beta$  chez *Gadus* (21), 80  $\mu\text{g}$  de l'œstrone et 50  $\mu\text{g}$  de l'œstriol chez *Conger* (23) (24), 70  $\mu\text{g}$  de l'œstrone et 700  $\mu\text{g}$  de l'œstriol chez *Protopterus* (3). Les ovaires des dipneustes, conservés un an dans le frigidaire, donnent la haute teneur en œstriol qui a été doutée par Gottfried et coll. (21). Notre momijiko à la ponte avait été légèrement salé et conservé à environ 0° pendant plusieurs jours. En générale, il est possible que la teneur en œstrogènes augmente lors de la maturation génitale, même dans le sang (16-18). Cependant, c'est bizarre que les ovaires, qui ne sont pas frais, contiennent également beaucoup des œstrogènes.

Quand on mange momijiko, il prend des œstrogènes *per os*. Dans le domaine des animaux domestiques, on donne assez souvent des stéroïdes sexuels pour l'élevage avantageux. Il est en question pour la santé de l'homme aux Etats Unis que l'on toujours mange des chaires contenant des hormones sexuelles.

Enfin, nous avons mise en évidence de la présence des œstrogènes dans momijiko au point de vue de chimie alimentaire. Il est nécessaire que l'on recherche sur le métabolisme des stéroïdes sexuels dans chaque stades de la maturation et sur les changements cadavériques des stéroïdes chez les poissons.

### Résumé

Nous décrivons dans la présente note la séparation sur chromatoplaque d'hormones sexuelles authentiques : l'œstrone, l'œstradiol-17 $\beta$ , l'œstriol, la testostérone, le propionate de la testostérone, la méthyltestostérone, la stilbestrol, et la progestérone.

Au point de vue de chimie alimentaire, nous avons extrait la fraction œstrogène non conjugué de momijiko, l'ovaire salé du colin d'Alaska, *Theragra chalcogramma* PALLAS et l'analysée par chromatoplaques. Les chromatogrammes sur plaques indiquent l'existence de l'œstrone, l'œstradiol-17 $\beta$ , et trois substances pas encore identifiées (Rf. 0 : 0.04 : 0.15).

### Remerciement

Nous sommes vivement reconnaissant au Professeur Lederer et aussi au Dr. Barbier, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette, pour les grandes facilités qu'ils nous ont dirigé sur la technique de chromatoplaque.

Nous voudrions également remercier le Professeur Fontaine, Institut Océanographique de l'Université de Paris, et le Dr. Cédard, Laboratoire de

Chimie, Clinique obstétricale de la Faculté de Médecine de l'Université de Paris. d'avoir nous envoyé des produits œstrogènes authentiques et pour la bienveillance nous ont été précieuses.

### Bibliographie

- 1) Wotiz, H.H., Botticelli, C.R.; Hisaw, F.L.Jr. et I. Ringler (1958). J. Biol. Chem. **231**, 589.
- 2) Wotiz, H.H., Botticelli, C.R., Hisaw, F.L. Jr. et A.G. Olsen (1960). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **46**, 580.
- 3) Dean, F.D. et I.C. Jones (1959). J. Endocr. **18**, 366.
- 4) Chieffi, G. (1962). Gen. and Comp. Endocr. suppl. **1**, 275.
- 5) Kirchner, I.G., Miller, J.M. et G. I. Keller (1951). Anal. Chem. **23**, 420.
- 6) Reitsema, R.H. (1954). Anal. Chem. **26**, 960.
- 7) Stahl, E. (1956). Pharmazie. **11**, 633.
- 8) Demole, E. (1958). J. Chromatog. **1**, 24.
- 9) Demole, E. (1956). Compt. rend. Acad. Sci. **243**, 1883.
- 10) Barbier, M., (1959). J. Chromatog. **2**, 649.
- 11) Barbier, M., Jäger, H., Tobias, H. et E. Wyss (1959). Helv. Chim. Acta. **42**, 2440.
- 12) Barbier, M. et S.I. Závialof (1960). Izvest. Akad. Nauk, S.S.S.R. Otdel. Khim. Nauk. (7), 1309.
- 13) Stahl, E. (1962). Dünnschicht-Chromatographie, S. 534, Springer-Verlag. Berlin.
- 14) Struck, H. (1961). Mikrochim. Acta, 634.
- 15) Hara, S. (1963). Japan Analyst. (en japonais), **12**, 2, 199.
- 16) Cédard, L. et T. Nomura (1961). Bull. Inst. Océanog. Monaco. **1196**, 15.
- 17) Cédard, L., Fontaine, M. et T. Nomura (1961). Compt. rend. Acad. Sci., **252**, 2656.
- 18) Nomura, T. (1962). Domaine de Chimie (Kagaku-no-Ryoiki, en japonais), **16**, 5, 23 : **16**, 6, 14.
- 19) Boscott, J.R. (1962). The Ovary. vol. II, p.18, ed. par Zuckerman, S., Academic Press.
- 20) Galzigna, L. (1961). Rend. Acad. Naz. Lincei., cl. sci. fis. mat. nat., **31**, 92.
- 21) Gottfried, H. Hunt, S. V., Simpson, T. H. et R. S. Wright (1962). J. Endocr., **24**, 425.
- 22) Botticelli, C.R., Hisaw, F. L. Jr. et W. D. Roth (1963). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **114**, 255.
- 23) Lupo, C. et G. Chieffi (1963). Nature, **197**, no. 4867, 596.
- 24) Chieffi, G. (1962). Bollettino di Zoologia, **XXIX**, fasc. II, 149.