

## C<sub>19</sub> STÉROÏDES URINAIRES DANS UNE LUTEOSE OVARIENNE GRAVIDIQUE

RENÉ-JEAN BÈGUE, JEAN-MARCEL BRUN, MADELEINE MORINIÈRE et  
PRUDENT PADIEU

Laboratoire de Biochimie Médicale, Université de Dijon, Faculté de Médecine,  
7, boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France

(Received 2 April 1976)

### SUMMARY

C<sub>19</sub> steroids were analysed by gas chromatography and mass spectrometry in the urine of a patient who developed virilizing luteoma during the 8th month of pregnancy. Thirty-nine C<sub>19</sub> steroids were isolated. The structure of twenty-eight of them was established: sixteen 17-oxosteroids, five androstane-3,16,17-triol, three 5-androstene-3,17-diol, 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, 4-androstene-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androst-16-ene, 16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-4-androsten-3-one, and 5-androstene-3 $\beta$ ,16,17 $\beta$ -triol; two of the other catabolites were 5 $\xi$ -androstane-2 $\xi$ ,3 $\xi$ ,17 $\xi$ -triol and two 5-androstene-3 $\xi$ ,15 $\xi$ ,17 $\xi$ -triol were also present.

The total excretion of 17-oxosteroids amounted to 167 mg per day and some 90% was due to five metabolites: 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one (95.6 mg), 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-one (35.6 mg), 3 $\beta$ -hydroxy-5-androsten-17-one (8.5 mg), 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one (6.3 mg) and 3 $\alpha$ ,18-dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one (5.6 mg). Other principal metabolites induced: 4-androstene-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol and 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol with respectively daily excretions of 8.9, 5.1, 2.85 and 2.4 mg and a total of 5-androstene-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (4.6 mg/24 h).

These results confirmed the hyperproduction of 4-androsten-3,17-dione, 17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-one and 3 $\beta$ -hydroxy-5-androsten-17-one which were responsible for the maternal virilization syndrome. On the other hand the absence of any symptom of foetal virilization may be explained by the co-occurrence of several factors, in particular the date of the appearance activity of strong androgens, the general metabolic activity of the patient and presumably the role of the placenta in the metabolism of the hormones.

To determine precisely the role of luteal tissue in C<sub>19</sub> steroids production we believe, that, in the future, intratumoral steroids have also to be analysed.

### INTRODUCTION

C'est dans le but de préciser les altérations du profil d'excrétion des stéroïdes survenant en pathologie gravidique que nous avons, dans un travail précédent [1] décrit une méthode qui, en associant la chromatographie sur Sephadex LH-20 analyses en phase gazeuse (chromatographie gaz-liquide et chromatographe gaz-liquide couplée à la spectrométrie de masse) permet d'identifier et de doser, dès la sixième semaine de la gestation les C<sub>18</sub>, C<sub>19</sub> et C<sub>21</sub> stéroïdes urinaires.

Dans ce travail nous avons appliqué cette méthode à l'analyse systématique des stéroïdes excrétés par une malade présentant un lutéome de grossesse [2] afin de préciser les aspects qualitatifs et quantitatifs du contingent métabolique lié à la production tumorale d'hormones stéroïdes ou de précurseurs hormonaux. Cependant, le contexte clinique de virilisation maternelle, comme l'importance des éliminations stéroïdiennes nous ont conduit, dans un premier temps, à limiter notre étude à celle de l'excrétion des C<sub>19</sub> stéroïdes.

#### Matériel et méthodes

1. L'échantillon urinaire provient d'une malade de

26 ans ayant présenté une grossesse d'évolution normale jusqu'au 8ème mois. A cette époque l'examen clinique révèle un virilisme pileux associé à une masse ovarienne droite d'allure tumorale, évoquant le diagnostic de lutéose ovarienne. Le dosage des stéroïdes urinaires révèle une excrétion des 17-oxostéroïdes à 162 mg/24 h et une excrétion des 17-hydroxystéroïdes à 1 mg/24 h. Celle du 5 $\beta$ -prégnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol et de l'oestriol, respectivement à 65 et à 47 mg/24 h sont normales en regard de l'âge de la grossesse. Une césarienne pratiquée à terme extrait une fille normale de 2930 g. L'examen extemporané de la pièce opératoire fait porter le diagnostic de cystadénome mucineux. Une ovariectomie droite et une biopsie ovarienne gauche sont pratiquées.

La pièce d'ovariectomie droite, après ponction de 1250 ml de liquide pèse 3350 g. La tumeur d'aspect plurikystique est constituée d'innombrables cavités de 1 à 10 cm de diamètre comblées par un matériel d'aspect mucoïde. L'examen histologique confirme un cystadénome mucineux associé à une lutéose stromale majeure, sans image histologique d'allure maligne.

La biopsie ovarienne gauche intéresse le corps gestatif qui montre des images dégénératives habituelles à terme. Trois kystes folliculaires en voie de matur-

ation cernés par une mince thèque interne lutéinisée voisinent avec quelques follicules atrétiques quiescents ou subissant une reviviscence gestative de leur thèque. Plusieurs îlots de déciduose ectopique soulèvent le revêtement germinatif de l'ovaire.

L'aspect histologique du placenta est celui d'un placenta congestif présentant des altérations dégénératives modérées. Le syncytiotrophoblaste donne parfois naissance à quelques îlots de déconnexion et recouvre des villosités placentaires de petite taille. L'axe conjonctivovasculaire de ces derniers est oedématisé et dépourvu de cellules de Hofbauer.

2. Les  $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy- $5\alpha$ -androstane-17-one et  $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy- $5\beta$ -androstane-17-one nous ont été donnés par le Docteur J. A. Gustafsson, Karolinska Institutet, Stockholm. Le  $5\beta$ -cholestan- $3\alpha$ -ol et le  $5\alpha$ -androstane- $3\beta,17\beta$ -diol proviennent de Sigma-Chemical, Saint Louis, Missouri, U.S.A. Les autres stéroïdes de référence proviennent de Ikapharm, Ramat-Gan, Israël. Le Sephadex LH-20 (granulométrie 25 à 100  $\mu$ m) provient de Pharmacia, France SA, rue de Marly, Parly 2, F18150 Le Chesnay. Le suc digestif d'*hélix pomatia* (SHP, utilisé en solution à 5000 unités Fishman par ml de  $\beta$ -glucuronidase dans le tampon acide acétique, acétate de sodium, 0,1M, pH 5,20) provient de l'Industrie biologique Française, 35 quai du Moulin de Cage, 92. Gennevilliers. Les autres produits, les solvants, les réactifs silylants, comme l'ensemble du matériel utilisé: chromatographe en phase gazeuse, chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse, compteur à scintillation liquide ont été décrits précédemment [3].

3. *Préparation des extraits urinaires.* Elle a été effectuée sur un vol. urinaire correspondant au 1/40 de la diurèse des 24 heures. Après extraction des stéroïdes conjugués selon la méthode de Okerholm *et al.*[4], l'acétate d'éthyle contenant les stéroïdes conjugués est évaporé à sec, sous vide partiel à 50°. Le résidu obtenu, dissout dans 25 ml d'acétate d'éthyle acide, est soumis à une solvolysse selon la méthode de Vihko[5].

Après 24 h à 39°, l'acétate d'éthyle est évaporé à sec. Le résidu obtenu, dissout dans 20 ml d'eau distillée est soumis à une hydrolyse enzymatique en utilisant, dans ses conditions optimales d'efficacité, et à raison de 2000 unités Fishman de  $\beta$ -glucuronidase par ml d'urines. Après 48 h à 37°, les stéroïdes libres sont extraits deux fois par l'acétate d'éthyle (2:1, v/v) et une fois par l'éther éthylique (1:1, v/v). Les phases organiques réunies, lavées deux fois avec 10 ml d'eau distillée, sont séchées sur du sulfate de sodium anhydre puis évaporées à sec, sous vide partiel, à 50°. Le résidu obtenu est dissout dans 1 ml d'un mélange de chloroforme-heptane-méthanol (5:5:1, by vol.) Après action des ultrasons, la solution est appliquée sur une colonne de 0,7 cm de diamètre contenant 6 g de Sephadex LH-20 préparé dans le même mélange de solvant.

L'éluion des stéroïdes neutres est réalisée avec

70 ml du mélange de chloroforme-heptane-méthanol. Celle des stéroïdes polaires est effectuée avec 30 ml d'un mélange de chloroforme-méthanol (1:2, v/v). Quarante fractions de 2,5 ml chacune ont été recueillies. Chaque fraction est évaporée à sec sous courant d'azote de le résidu obtenu est dissout dans 0,15 ml d'un mélange de pyridine-N,O-bis-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (1:3, v/v). Après une heure à 60°, les solutions obtenues sont analysées par cgl et par cgl-sm.

4. *Analyses par cgl et par cgl-sm.* Les analyses par cgl ont été effectuées en programmation de température sur une colonne d'OV-1 et sur une colonne d'OV-17 et en isotherme à 230° sur une colonne de SE-30. Les analyses par cgl-sm ont été effectuées en programmation de température, sur une colonne d'OV-1. L'énergie de bombardement des électrons était fixée à 22,5 eV et le courant d'ionisation à 60  $\mu$ A.

5. *Critères analytiques.* L'identité des stéroïdes est reconnue pour certaine lorsque les diverses coordonnées chromatographiques: valeurs en unité méthylène (UM) [6] et indices de rétention par rapport au  $5\alpha$ -cholestane d'une part, et les spectres de masse d'autre part, sont identiques à ceux obtenus avec les composés de référence.

6. *Analyse quantitative.* Le rendement d'extraction des stéroïdes libres et le rendement de la chromatographie sur sephadex LH-20 ont été déterminés dans deux séries d'expériences séparées. Celui des stéroïdes libres a été déterminé en ajoutant 5.10<sup>5</sup> d.p.m. de [ $7\alpha$ -<sup>3</sup>H]-déhydroépiandrostérone (activité spécifique 22 Ci/mmol) à l'échantillon obtenu après hydrolyse enzymatique. Les comptages ont été effectués sur des vol. correspondants respectivement au 1/25 du vol. de l'hydrolysate et au 1/100 de vol. de la solution obtenue, avant la chromatographie sur Sephadex LH-20.

Le rendement de la chromatographie sur Sephadex LH-20 a été déterminé par cgl selon une méthode décrite précédemment [1] en utilisant une solution méthanolique à 100  $\mu$ g/ml de chacun des stéroïdes de référence suivants:  $3\alpha$ -hydroxy- $5\alpha$ -androstane-17-one,  $3\alpha$ -hydroxy- $5\beta$ -androstane-17-one,  $3\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -androstane-17-one,  $3\alpha,11\beta$ -dihydroxy- $5\alpha$ -androstane-17-one,  $5\alpha$ -androstène- $3\beta,17\beta$ -diol,  $5\alpha$ -androstène- $3\beta,16\alpha,17\beta$ -triol,  $3\beta,16\alpha$ -dihydroxy- $5\alpha$ -androstane-17-one,  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol,  $5\alpha$ -androstane- $3\beta,17\beta$ -diol et de cholestérol.

Le dosage par cgl des stéroïdes identifiés dans les diverses fractions analysées a été effectué, après détermination du coefficient de réponse des stéroïdes de référence en utilisant le  $5\beta$ -cholestan- $3\alpha$ -ol comme standard interne [3].

## RESULTATS

1. *Analyse qualitative.* Les C19 stéroïdes isolés dans chacune des fractions LH-20 analysées, et leurs critères d'identification par cgl et par cgl-sm sont

Tableau 1. Stéroïdes identifiés par cgl-sm et stéroïdes dosés par cgl dans l'extrait urinaire étudié

Fraction LH-20	Composé no.	UM/OV-1	M <sup>+</sup>	Analyses par cgl-sm Pics prédominants	Stéroïdes identifiés	Q mg/24 h	
5 et 6	1	24,32	362	107, 129, 155, 271, <u>272</u> , 277	3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one	95,60	
	2	24,50	362	107, 108, 244, 257, <u>272</u>	3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-one	35,60	
	3	24,81	434	142, <u>143</u> , 329, 419, 434	4-androstène-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol	8,90	
	4	24,87	360	<u>129</u> , 231, 270, 304	3 $\beta$ -hydroxy-5-androsten-17-one	8,50	
8	5	24,26	346	<u>241</u> , 331, 346	3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androst-16-ène	0,75	
	6		434	<u>129</u> , 213, 254, 344	5-androstène-3 $\alpha$ ,17 $\xi$ -diol		
	7	25,59	448	117, 129, 199, <u>214</u> , 304	3 $\alpha$ ,16 $\xi$ -dihydroxy-5-androsten-17-one	1,85	
8 et 9	8	24,99	436	129, 215, 241, <u>256</u> , 346	5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol	5,10	
	9	25,29	450	<u>270</u> , 360, 435	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one	2,50	
	10	25,73	450	117, 162, 201, <u>216</u> , 270, 345, 360	3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-one	2,30	
	11	25,87	450	106, 107, 108, 117, 201, <u>216</u> , 306	3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one	6,30	
	12	26,08	450	<u>156</u> , 184, 199	3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one		
	13	26,28	450	117, 201, <u>216</u> , 306	3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one	2,90	
	14	26,38	450	<u>129</u> , 215, 216, 435	3 $\xi$ ,17 $\xi$ -dihydroxy-5 $\xi$ -androstan-16-one	2,85	
9 et 10	15	25,19	434	129, 213, <u>215</u> , 239, 254, 329, 344	5-androstène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol		
	16	26,10	450	<u>103</u> , 169, 215, 270, 360, 420	3 $\alpha$ ,18-dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one	5,60	
	17	26,94	450	103, 169, 215, <u>420</u>	3 $\beta$ ,18-dihydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-one	2,80	
10	18	25,29	434	<u>129</u> , 213, 215, 239, 254, 344	5-androstène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	4,60	
	19	25,45	450	<u>270</u> , 345, 360	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-one	1,10	
	20	25,72	450	<u>257</u> , 270, 360, 435	3 $\alpha$ ,19-dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one	0,35	
	21	26,31	450	103, 169, 360, <u>420</u>	3 $\alpha$ ,18-dihydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-one	0,75	
	22	26,68	448	117, 129, 175, 199, <u>214</u> , 304	3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihydroxy-5-androsten-17-one	0,60	
	23	26,84	450	270, 360, <u>435</u>	3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one		
	24	27,65	448	191, 253, 268, 269, 343, <u>358</u> , 433	16 $\xi$ ,17 $\xi$ -dihydroxy-4-androsten-3-one		
	25	27,80	448	191, 253, 268, 269, 343, <u>358</u> , 433	16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-4-androsten-3-one	1,15	
	11 et 12	26	26,37	524	129, 142, 143, <u>255</u> , 344, 434	5 $\xi$ -androstan-2 $\xi$ ,3 $\xi$ ,17 $\xi$ -triol	
		27	26,59	524	129, 142, 143, 255, 345, 434	5 $\xi$ -androstan-2 $\xi$ ,3 $\xi$ ,17 $\xi$ -triol	
		28	27,31	524	117, <u>191</u> , 434	5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol	
	12	29	25,42	522	<u>432</u>	5-androstène-3 $\xi$ ,7 $\xi$ ,17 $\xi$ -triol	
12 et 13	30	26,97	524	<u>191</u>	5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol	2,40	
	31	27,11	524	<u>191</u>	5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol	2,85	
13 et 14	32	26,00	524	<u>191</u>	5 $\xi$ -androstan-3 $\xi$ ,16 $\xi$ ,17 $\xi$ -triol		
14 et 15	33	26,21	524	117, 129, <u>191</u>	5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol	0,60	
	34	26,45	522	<u>432</u>	5-androstène-3 $\xi$ ,7 $\xi$ ,17 $\xi$ -triol		
15	35	28,10	524	191	5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol		
	36	28,11	522	129, 213, 239, 329, 342, <u>432</u>	5-androstène-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol	1,30	
16 et 17	37	26,44	522	129, 191, 211, 213, 217, 301, 303	5-androstène-3 $\xi$ ,15 $\xi$ ,17 $\xi$ -triol		
19,20 et 21	38	26,36	522	117, 129, 147, 191, 211, 213, 217, 237, <u>252</u> , 327	5-androstène-3 $\xi$ ,15 $\xi$ ,17 $\xi$ -triol		
	39	28,22	522	129, 147, 213, 239, 252, 329, 342, <u>432</u>	5-androstène-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol	0,80	

La colonne 1 indique le numéro de la fraction LH-20 dans laquelle les stéroïdes sont élués. La colonne 3 indique la valeur en unité méthylène du composé analysé sur une colonne d'OV-1. Les colonnes 4 et 5 indiquent respectivement l'ion moléculaire (M<sup>+</sup>) et la séquence analytique caractérisant sous forme de leurs éthers triméthylsilylés, les métabolites mentionnés dans la colonne 6. Dans la colonne 5, la valeur *m/e* correspondant au fragment le plus abondant (pic de base) est soulignée. La colonne 7 indique, en milligrammes par 24 heures, le résultat du dosage des C<sub>19</sub> stéroïdes prédominants.

donnés dans le Tableau 1. Les 11-désoxy-17-oxo-stéroïdes: 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one, 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-one et 3 $\beta$ -hydroxy-5-androsten-17-one [5] sont identifiés dans les fractions LH-20 no. 5 et 6. Le composé no. 5 présente un spectre de masse dont le pic moléculaire à *m/e* = 346 et la séquence à *m/e* = 241 (pic de base) et 331: M-(90 + 15) l'identifie au 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androst-16-ène [7]. Quatre composés sont identifiés à des androstène-3,17-diols. Ce sont: Le composé no. 3 dont le spectre de masse est caractéristique des 4-androstène-3,17 $\beta$ -diol [8]: pic moléculaire à *m/e* = 434 et pic de base à *m/e* = 143. Il est identifié par cgl au 4-androstène-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol. Les trois autres présentent des spectres de masse dont le pic moléculaire à *m/e* = 434 et la séquence à *m/e* = 129, 213,

215, 254 et 344 les rapportent à des 5-androstène-3,17-diols [5]. Ils sont identifiés par cgl aux 5-androstène-3 $\alpha$ ,17 $\xi$ -diol (composé no. 6), 5-androstène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol [9] (composé no. 15) et 5-androstène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (composé no. 18).

Le composé no. 8 présente des valeurs en UM et un spectre de masse dont le pic moléculaire à *m/e* = 436, la séquence à *m/e* = 129, 215, 241, 256 (pic de base) et 346 l'identifient au 5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol [5].

Deux composés présentent des spectres de masse caractéristiques des 3,16-bis-triméthylsilyl-5-androsten-17-one [5]: pic moléculaire à *m/e* = 448 et séquence à *m/e* = 117, 129, 199, 214 (pic de base) et 304. Le premier de ces deux composés (composé no. 7) élué dans la fraction LH-20 no. 8 est rapporté à

une 3 $\alpha$ ,16 $\xi$ -dihydroxy-5-androsten-17-one. Le second (composé no. 22) élué dans la fraction LH-20 no. 10 est identifié à la 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihydroxy-5-androsten-17-one [5].

Trois composés présentent des spectres de masse caractéristiques des 3,7-bis-triméthylsilyl-androstan-17-one [10]: pic moléculaire à  $m/e = 450$  et séquence à  $m/e = 270, 360$  et 435. Le premier de ces composés (composé no. 9) est identifié par cgl à la 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one (10) dans les fractions LH-20 no. 8 et 9. L'incrément des valeurs en UM calculé pour les 3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one et 3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-one, permet d'identifier le composé no. 19 à la 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-one, tandis que le composé no. 23 dont le spectre de masse diffère des deux précédents par son pic de base à  $m/e = 435$  est rapporté à la 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one [11].

Trois composés présentent des spectres de masse caractéristiques des 3,16-bis-triméthylsilyl-androstan-17-one [11]: pic moléculaire à  $m/e = 450$ , pic de base à  $m/e = 216$  et séquence typique  $m/e = 106, 117, 201, 216, 270$  et 306, avec pour le composé no. 10 un pic à  $m/e = 162$  traduisant pour ce type de composé une configuration en 5 $\beta$ . Il est identifié à la 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-one, tandis que les composés no. 11 et 13 sont identifiés aux 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one et 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one [11].

Le spectre de masse du composé no. 12 présente un pic moléculaire à  $m/e = 450$  et une séquence à  $m/e = 156$  (pic de base), 184, 199, 270, 360 et 394 l'identifiant à la 3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one [10]. Le spectre de masse du composé no. 14 avec un pic moléculaire à  $m/e = 450$  et une séquence à  $m/e = 129$  (pic de base), 215, 216 et 435 le rapporte à une 3 $\xi$ ,17 $\xi$ -dihydroxy-5 $\xi$ -androstan-16-one [11].

Trois composés présentent des spectres de masse caractéristiques des 3,18-bis-triméthylsilyl-androstan-17-one: pic moléculaire à  $m/e = 450$ , et séquence à  $m/e = 103, 169, 215, 270, 360$  et 420 [12]. L'analyse par cgl les identifie au 3 $\alpha$ ,18-dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one (composé no. 16) au 3 $\beta$ ,18-dihydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-one (composé no. 17) et au 3 $\alpha$ ,18-dihydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-one (composé no. 21).

Le composé no. 20 est identifié à la 3 $\alpha$ ,19-dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one [10]: pic moléculaire à  $m/e = 450$  et séquence caractéristique à  $m/e = 239, 257$  (pic de base), 270, 360 et 435.

Le spectre de masse des composés no. 24 et 25 présente un pic moléculaire à  $m/e = 448$  et une séquence à  $m/e = 191, 253, 268, 343, 358$  (pic de base) et 433 indiquant qu'il s'agit de 16,17-bis-triméthylsilyl-androsten-3-one [13]. Ils sont identifiés respectivement aux 16 $\xi$ ,17 $\xi$ -dihydroxy-4-androsten-3-one et 16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-4-androsten-3-one [14].

Les composés no. 26 et 27, avec des spectres de masse dont le pic moléculaire à  $m/e = 524$ , la séquence à  $m/e = 129, 142, 143$ , caractéristique des stéroïdes ayant une configuration en 2,3-bis-triméthyl-

silyl, 255 (pic de base), 344, 434, et 509, sont rapportés à deux 5 $\xi$ -androstane-2 $\xi$ ,3 $\xi$ ,17 $\xi$ -triol [15].

Six composés sont identifiés à des androstane-3,16,17-triol sous forme de leur dérivé Tris-triméthylsilylé: pic moléculaire à  $m/e = 524$  et séquence typique à  $m/e = 191$  (pic de base), 239, 344, 419, 434 et 509 [15, 16]. Cinq sont identifiés par cgl. Ce sont les 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol [17], 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol [18], 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol [17], 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol [14, 18] et 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol [17].

Les composés no. 29 et 34 présentent des spectres de masse, avec un pic de base à  $m/e = 432$  (M-90), identiques à ceux obtenus pour les 5-androstène-3 $\beta$ ,7,17 $\beta$ -triol [19]. A défaut des stéroïdes de référence, ces métabolites sont rapportés à des 5-androstène-3 $\xi$ ,7 $\xi$ ,17 $\xi$ -triols.

Les composés no. 36 et 39 présentent des spectres de masse dont le pic moléculaire à  $m/e = 522$  et la séquence à  $m/e = 129, 213, 239, 329, 342$  et 432 les rapportent à des 5-androstène-3,16,17-triol [16]. Ils sont identifiés par cgl aux 5-androstène-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol et 5-androstène-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol [17].

Les composés no. 37 et 38 avec un spectre de masse semblable à celui du dérivé-Tris-triméthylsilyl du 5-androstène-3 $\beta$ ,15 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol [20]: pic moléculaire à  $m/e = 522$ , et séquence à  $m/e = 129, 191, 211, 213, 217, 237, 252$  (pic de base) 301, 303, 327, 342 et 432 sont rapportés à des 5-androstène-3 $\xi$ ,15 $\xi$ ,17 $\xi$ -triol.

2. *Analyse quantitative.* Le rendement d'extraction des stéroïdes libres a été de 86%  $\pm$  4 (valeur moyenne pour trois déterminations). Ceux de la chromatographie sur Sephadex LH-20 sont compris entre 63%  $\pm$  6 pour la 3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-one et 88%  $\pm$  4 pour les 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol et 5-androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Compte tenu de ces facteurs de correction, le dosage par cgl des stéroïdes mentionnés dans le Tableau 1 a été effectué.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

L'analyse des stéroïdes urinaires excrétés en fin de gestation par une malade présentant un lutéome virilisant, nous a permis d'identifier par cgl et par cgl-sm trente neuf C19-stéroïdes. Parmi ces composés, seize sont des 17-oxostéroïdes. Dosés par cgl, l'excrétion globale de ces derniers, à 167 mg/24 h s'inscrit dans les valeurs habituellement trouvées dans les lutéoses ovariennes gravidiques [21-28].

Le dosage spécifique de ces composés montre qu'ils sont représentés pour 80% par les catabolites hépatiques de la 4-androstène-3,17-dione: 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one et 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-one. Excrétés respectivement pour 95,60 et 35,60 mg/24 h, l'importance même de ces excrétions traduit, indépendamment de l'interconversion périphérique DHA  $\rightarrow$  4-androstène-3,17-dione  $\rightleftharpoons$  testostérone une sécrétion tumorale importante de 4-androstène-3,17-dione. De fait, s'il ne nous a pas été donné de pouvoir effectuer les dosages tumoraux et plasmatiques de

cette hormone, cette hypothèse est cependant confirmée, indépendamment de l'invasion urinaire des catabolites de la 17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone par les travaux de Rice *et al.*[29] lesquels, analysant *in vitro*, les stéroïdes contenus dans des coupes de lutéome ne détectent que la seule 4-androstène-3,17-dione. De même, il est logique de rapporter à une origine tumorale la majoration des excréctions de la 3 $\beta$ -hydroxy-5-androsten-17-one (DHA) et du 5-androstène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, et de la rapprocher des résultats obtenus *in vitro* par O'Malley *et al.*[30].

En effet, ces derniers, dosant par cgl les stéroïdes endogènes d'un lutéome virilisant trouvent qu'ils sont essentiellement représentés par la testostérone, le sulfate de DHA, la DHA et la 4-androstène-3,17-dione, et montrent que la biosynthèse intratumorale de testostérone s'effectuerait principalement par la voie des sulfates de 3 $\beta$ -hydroxy-5-ène-stéroïdes et du 5-androstène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Nos résultats confirment *in vivo* ceux de O'Malley et les précisent notamment pour ce qui concerne la synthèse et la sécrétion tumorale du sulfate de 5-androstène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Cependant, il n'est pas possible de préciser, par des résultats affectant les seuls dosages urinaires, l'importance quantitative de la sécrétion tumorale de ces composés, et partant de la voie des sulfates de 3 $\beta$ -hydroxy-5-ène-stéroïdes. En effet, et indépendamment de sa conversion périphérique, il est probable que la fraction métabolique de ces composés parvenant au placenta est après action des 3 $\beta$ -sulfatase placentaire [31, 32] transformée en 4-androstène-3,17-dione, testostérone, et en oestrogènes [33].

Nous remarquons également que l'excrétion du 4-androstène-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, à 8,90 mg/24 h met ce composé au rang des catabolites urinaires quantitativement prédominants. Il est probable que ce composé résulte de l'action des 3 $\alpha$ -hydroxystéroïde-oxidoréductase sur une fraction du pool hépatique de testostérone, action qui peut être expliquée par un déficit de débordement des 5 $\alpha$  et 5 $\beta$ -stéroïde oxidoréductase. Enfin, ce composé peut être, au même titre que la 17 $\beta$ -hydroxy-5 $\beta$ -androstane-3-one, le précurseur du 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol excrété quant à lui pour 5,10 mg/24 h.

Indépendamment des métabolites précités les excréctions des 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstane-17-one, 3 $\alpha$ ,18-dihydroxy-5 $\alpha$ -androstane-17-one et 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstane-17-one, respectivement à 6,30, 5,60 et 2,50 mg/24 h sont également majorées, les valeurs trouvées dans ce travail étant 7 à 10 fois supérieures à celles déterminées, chez des femmes normales, au 8<sup>ème</sup> mois de leur gestation. Ils résultent du catabolisme des dérivés hydroxylés de la 4-androstène-3,17-dione et de la testostérone, comme l'ont montré, *in vitro*, Gustafsson et Lisboa [34] et Einarsson *et al.* [35]. Pour ces composés, comme pour les 11-désoxy-17-oxostéroïdes, la prédominance des métabolites réduits en 5 $\alpha$ , sur ceux réduits en 5 $\beta$ , implique une dissociation catabolique s'exprimant en faveur de l'activité 5 $\alpha$ -réductasique, dissociation qu'il n'est pas

possible d'expliquer ne serait-ce que par la diversité des sécrétions hormonales mises en jeu et susceptibles de moduler le niveau d'activité de ces enzymes.

En dehors des 5-androstène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol et du 4-androstène-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, nous avons identifié les 5-androstène-3 $\alpha$ ,17 $\xi$ -diol et 5-androstène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol, mais ces composés, éliminés à l'état de traces n'ont pu être dosés par cgl.

Cinq androstane-3,16,17-triol essentiellement représentés les 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol et 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol ont pu être identifiés. Excrétés respectivement pour 2,85 et 2,40 mg/24 h, ces deux métabolites proviennent du catabolisme de la testostérone et de la 16 $\alpha$ -hydroxytestostérone excrétée quand à elle pour 1,15 mg/24 h, voir de l'hydroxylation en 16 $\alpha$  des 5-androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol [32]. En effet, dans ce travail nous n'avons pas trouvé de 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, ce qui peut être expliqué, indépendamment de l'action inhibitrice de la progesterone sur la transformation de la testostérone en 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone, par la transformation quantitative du 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol en 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol. Enfin l'identification des deux 5 $\alpha$ -androstane-3,16 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol est à rapprocher des résultats de Gustafsson[36] montrant, pour les C19 stéroïdes qu'une configuration en 16 $\beta$ /17 $\alpha$  impliquait la transformation d'un 16-désydro-C19-stéroïde en un 16 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihydroxy-C19-stéroïde par l'intermédiaire d'un 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -époxy-C19-stéroïde. Le 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androst-16-ène identifié dans la fraction LH-20 no. 8 pourrait donc être, dans cette hypothèse, le précurseur du 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol.

Dans ce travail, l'analyse systématique des C19-stéroïdes urinaires réalisée chez une malade associant un syndrome de virilisation maternelle [2, 23-28, 37-39], lié à une tumeur ovarienne unilatérale [28, 38, 39] et conduisant à l'extraction par césarienne d'une fille normale [2, 24, 26] est à rapprocher des travaux publiés par Sternberg et Barclay [2], Mandel *et al.* [24] et par Jewelewicz *et al.* [26]. Les autres résultats s'en distinguent par le fait que le nouveau-né est soit une fille virilisée [23, 28, 38, 39], soit un garçon normal [25, 27, 37].

Si le dosage global des 17-oxostéroïdes urinaires [23, 27] est parfois affiné par celui des 11-désoxy-17-oxostéroïdes [26], par celui de la DHA et du 5 $\beta$ -prégnane-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -triol [27], par celui du 5 $\beta$ -prégnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol et de l'oestriol [28], l'analyse spécifique de l'ensemble des C19-stéroïdes excrétés n'avait à notre connaissance jamais été effectuée.

Nos résultats montrent l'importante diversité des C19-stéroïdes excrétés par cette malade, avec notamment une invasion massive des métabolites de la 4-androstène-3,17-dione: 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstane-17-one et 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -androstane-17-one, de ceux de la testostérone: 16 $\alpha$ -hydroxy-testostérone, 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol et 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol, comme de leurs dérivés hydroxylés en C7 et en C18: 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstane-17-one et 3 $\alpha$ ,18-dihydroxy-5 $\alpha$ -andros-

tan-17-one. En regard de l'excrétion des catabolites de la 4-androstène-3,17-dione, celle des 3 $\beta$ -hydroxy-5-androsten-17-one et 5-androstène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol n'est que plus discrètement majorée en valeur absolue. Cependant, les résultats du dosage urinaire de ces composés ne reflètent qu'un aspect global de leur catabolisme. A cet égard, le rôle du placenta nous semble devoir, par son équipement enzymatique orientant leur métabolisme vers la synthèse d'androgènes actifs et d'oestrogènes, être souligné. Dans cette hypothèse, la testostérone effectivement responsable par son métabolisme local au sein des organes cibles, des signes de virilisation maternelle observés, reconnaîtrait à la fois une origine tumorale, placentaire et périphérique, les enzymes présidant à l'interconversion S-DHA  $\rightarrow$  DHA  $\rightarrow$  4-androstène-3,17-dione  $\rightleftharpoons$  testostérone se retrouvant dans chacun des compartiments métaboliques précités. Enfin, le système d'aromatisation placentaire, doit, en orientant le métabolisme des androgènes actifs en oestrogènes, soustraire le foetus de leur action. Ainsi, les signes de virilisation foetale parfois observés seraient déterminés par le sécrétion tumorale d'androgènes ou de leurs précurseurs hormonaux, s'installant suffisamment tôt pour que la maturité enzymatique placentaire ne soit pas encore installée ou insuffisante à l'inactivation complète de l'excès d'androgènes parvenant jusqu'à lui.

*Remerciement*—Nous remercions le Professeur J. Jahier (Clinique Obstétrique, Faculté de Médecine de Dijon) qui a bien voulu nous confier l'observation de cette malade.

Les examens anatomopathologiques ont été effectués par le Professeur R. Michiels (Laboratoire d'anatomie pathologique, Faculté de Médecine de Dijon).

Ce travail a été réalisé grâce au CNRS (ERA 267), à l'INSERM (AU 76.1.356) et à l'Université de Dijon.

#### BIBLIOGRAPHIE

- Begue R. J., Desgres J., Gustafsson J. Å. and Padieu P.: *J. steroid Biochem.* **7** (1976) 211–221.
- Sternberg W. H. and Barclay D. L.: *Am. J. Obstet. Gynaec.* **95** (1966) 165–184.
- Desgres J., Begue R. J. and Padieu P.: *Clin. chim. Acta* **52** (1974) 381–405.
- Okerholm R. A., Chatteraj S. C., Pinkus J. L., Charles D. and Wotiz H. H.: *Steroids* **16** (1970) 66–68.
- Vihko R.: *Acta endocr., Copenh. suppl.* **109** (1966) 1–67.
- Horning E. C.: In *Gas Chromatography of Steroids* (Edited by K. B. Eik-Ness and E. C. Horning). Springer Verlag, Berlin (1968) p. 30.
- Brooksbank B. W. L., Brown R. and Gustafsson J. Å.: *Experientia* **30** (1974) 864–865.
- Lisboa B. P. and Gustafsson J. Å.: *Eur. J. Biochem.* **14** (1970) 556–559.
- Laatikainen T. and Vihko R.: *Eur. J. Biochem.* **13** (1970) 534–538.
- Gustafsson J. Å. and Sjövall J.: *Eur. J. Biochem.* **6** (1968) 227–235.
- Gustafsson J. Å. and Lisboa B. P.: *Eur. J. Biochem.* **16** (1970) 475–480.
- Gustafsson J. Å. and Lisboa B. P.: *Steroids* **15** (1970) 723–735.
- Lisboa B. P., Gustafsson J. Å. and Sjövall J.: *Eur. J. Biochem.* **4** (1968) 496–505.
- Gustafsson J. Å.: *Biochim. biophys. Acta* **296** (1973) 179–188.
- Gustafsson J. Å., Lisboa B. P. and Sjövall J.: *Eur. J. Biochem.* **6** (1968) 317–324.
- Laatikainen T.: *Steroids* **15** (1970) 139–150.
- Janne O.: *J. steroid Biochem.* **2** (1971) 33–41.
- Brooksbank B. W. L., Wilson D. A. A. and Gustafsson J. Å.: *Steroids Lipid. Res.* **3** (1972) 263–285.
- Björkhem I., Gustafsson J. Å. and Gustafsson S. A.: *Eur. J. Biochem.* **16** (1970) 557–566.
- Janne O. A. and Vihko R. K.: *Eur. J. Biochem.* **17** (1970) 134–140.
- Searle W. N., Haines M. and Baker J. K.: *J. Obstet. Gynec. Br. Commonw.* **55** (1948) 125–141.
- Friedman I. S., Mackles A. and Daichman I.: *J. clin. Endocr. Metab.* **15** (1955) 1281–1290.
- Malinak L. R. and Miller G. V.: *Am. J. Obstet. Gynaec.* **91** (1965) 251–259.
- Mandel C. H., Floyd W. S., Cohen S. L., Goodman P. A.: *Am. J. clin. Path.* **47** (1967) 148–153.
- Shuster E. and Leake F. M.: *Obstet. Gynaec.* **32** (1968) 637–642.
- Jewelewicz R., Perkins R. P., Dyrenfurts I. and Wande Wiele R. L.: *Am. J. Obstet. Gynaec.* **109** (1971) 24–28.
- Thomas E., Mestman J., Henneman C., Anderson G. and Hoffman R.: *Obstet. Gynaec.* **39** (1972) 577–584.
- Wolff E., Glasser M., Gordon G. G., Olivo J. and Southern A. L.: *Am. J. Med.* **54** (1973) 229–233.
- Rice B. F., Barclay D. L. and Sternberg W. H.: *Am. J. Obstet. Gynaec.* **15** (1969) 871–878.
- O'Malley B. W., Lipsett M. B. and Jackson M. A.: *J. clin. Endocr. Metab.* **27** (1967) 311–317.
- Warren J. C. and French A. P.: *J. clin. Endocr. Metab.* **25** (1965) 278–282.
- Pasqualini J. R., Cedard L., Nguyen B. L. and Alsat E.: *Biochim. biophys. Acta.* **139** (1967) 177–179.
- Ryan K. J.: *J. biol. Chem.* **234** (1959) 268–272.
- Gustafsson J. Å. and Lisboa B. P.: *Acta endocr., Copenh.* **65** (1970) 84–94.
- Einarsson K., Gustafsson J. Å., Ihre T., Ingelman-Sunderberg M.: *J. clin. Endocr. Metab.* **43** (1976) 56–63.
- Gustafsson J. Å.: *Biochim. biophys. Acta.* **296** (1973) 179–188.
- Krause D. E. and Stembridge V. A.: *Am. J. Obstet. Gynaec.* **95** (1966) 192–206.
- Laffargue P., Payan H., Rampal M., Coignet J. and Piana L.: *Presse Médicale* **76** (1968) 155–158.
- Jenkins M. E., Surana R. B. and Russel-Cutts C. M.: *Am. J. Obstet. Gynaec.* **1** (1968) 923–928.