

ACCUMULATION D'ŒSTRADIOL ET HEXŒSTROL TRITIÉS DANS LE CERVEAU ET QUELQUES AUTRES TISSUS CHEZ LA BREBIS

T. J. ROBINSON (1)

avec la collaboration technique de Liliane BOIVINEAU et Agnès BURÉ

*Station centrale de Physiologie animale,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)*

SOMMAIRE

Seize brebis ont été utilisées dans une expérience factorielle dans laquelle l'hexœstrol tritié (50 µg) ou l'œstradiol tritié (20 µg) était injecté par voie intramusculaire ou intraveineuse. Les animaux ont été abattus 30 minutes, une heure et demie, 4 heures et demie, 13 heures et demie après l'injection et les tissus suivants analysés pour la radioactivité : 1^o tissus généraux : sang, muscle ; 2^o tissus-cibles : hypophyse, utérus (endomètre et myomètre), cervix, vagin ; 3^o cerveau : 9 régions différentes. Aucune région du cerveau ne s'est montrée capable de retenir l'œstrogène tritié, l'activité observée était partout basse. Néanmoins, des différences significatives ($P = 0,02$) ont été observées entre quelques régions : les bulbes olfactifs avaient l'activité la plus élevée et le septum la plus basse.

Bien que la radioactivité de la dose d'hexœstrol ait été deux fois et demie plus forte que celle d'œstradiol, le niveau de radioactivité trouvé chez quelques tissus-cibles (utérus : endomètre, hypophyse) était comparable pour les deux substances. Dans les autres tissus (utérus : myomètre, cervix, vagin) le niveau trouvé après injection d'hexœstrol était beaucoup plus élevé que celui trouvé après injection d'œstradiol.

La durée du maintien de l'activité dans tous les tissus après l'injection intraveineuse d'hexœstroï était plus longue que la durée trouvée après injection d'œstradiol par la même voie. Par contre le maintien de l'activité des deux œstrogènes était comparable quand ils étaient injectés par voie intramusculaire.

On sait que certains tissus ont la capacité de retenir les œstrogènes après une seule injection. GLASCOCK et HOEKSTRA (1958, 1959), ont montré, chez la chevrete et l'agnelle, que l'utérus, le vagin, les glandes mammaires et l'hypophyse contiennent encore de l'hexœstrol tritié en quantités mesurables 8 heures après une seule injection de 25 µg. JENSEN et JACOBSEN (1962) ont constaté que l'œstradiol tritié est retenu dans les mêmes tissus chez la jeune ratte. Ces auteurs ont en outre indiqué

(1) *University of Sydney, Department of Animal Husbandry, Sydney, N. S. W., Australia.*

une différence entre l'œstradiol et l'œstrone dans la courbe d'incorporation dans l'utérus. Plus récemment, STONE (1963) et STONE, BAGGETT et DONNELLY (1963) ont trouvé chez la souris une différence dans l'incorporation et la disparition de ces deux œstrogènes pour certains tissus comme l'utérus et le foie.

ROBINSON et BRANDER (1962) ont montré une différence de sensibilité de la brebis aux œstrogènes synthétiques — hexœstrol, stilbœstrol — par rapport aux œstrogènes naturels — œstradiol, œstrone — ou à un pro-œstrogène -méthyléthyl stilbœstrol — selon la voie d'injection, intraveineuse ou intramusculaire. Utilisant les œstrogènes et pro-œstrogènes tritiés, STONE (1964) a trouvé une différence dans les activités des deux types de stéroïdes chez la souris en fonction de la voie d'injection. Les critères d'évaluation étaient les frottis vaginaux et la réduction de tétrazolium (MARTIN, 1960).

Le but de l'étude entreprise ici était d'étudier les courbes d'incorporation de l'hexœstrol ou de l'œstradiol tritiés dans les tissus-cibles ainsi que dans quelques régions du cerveau chez la brebis quand les œstrogènes sont injectés par les voies intramusculaire ou intraveineuse. Les études précédentes (GLASCOCK et HOEKSTRA, 1958, 1959), n'ont donné aucune apparence d'accumulation de l'œstrogène dans le cerveau mais il restait la possibilité d'une localisation dans une petite zone déterminée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les animaux

Seize brebis âgées de deux ans, de race *Ile-de-France*, étaient ovariectomisées quelques mois avant le commencement de l'expérience. Leur sensibilité aux œstrogènes à la suite de quelques injections de progestérone (ROBINSON, 1959) était bien établie : une dose d'environ 20 µg d'œstradiol ou 50 µg d'hexœstrol a été considérée comme une dose physiologique. Avant l'injection d'œstrogène tritié chaque animal recevait 6 injections de progestérone séparées par un intervalle de deux jours. L'œstrogène était administré deux jours après l'injection finale. Les quatre brebis abattues 13 heures et demie après l'injection d'œstrogène étaient en chaleur depuis 1 heure à 1 heure et demie.

1. *Hexœstrol tritié.*

Il était fourni par le Dr R. F. GLASCOCK sous la forme d'un mélange des acétates des deux isomères. L'hexœstrol tritié était séparé par la méthode de GLASCOCK et POPE (1960) immédiatement avant l'utilisation. L'activité spécifique dans notre appareil était 60 µCi/µg. Chaque brebis reçut 50 µg (= 3,0 mCi).

2. — *Œstradiol 2,4³H.*

Il a été fourni par le Dr J. MINEZ. Il avait une activité spécifique dans notre appareil de 60 µCi/µg. Chaque brebis reçut 20 µg (= 1,2 mCi).

Le plan expérimental

Les facteurs expérimentaux étaient

- 1° l'intervalle de l'injection à l'abattage : 0 heure 30 minutes, 1 $\frac{1}{2}$ heure 30, 4 heures 30 et 13 heures 30 :
- 2° le type d'œstrogène tritié (hexœstrol, œstradiol)
- 3° la voie d'injection (intraveineuse, intramusculaire).

Tissus analysés

Les 16 tissus suivants étaient analysés pour la radioactivité :

- 1° tissus généraux : sang, muscle ;
- 2° tissus-cibles : hypophyse, utérus : endomètre, utérus : myomètre, cervix, vagin ;
- 3° cerveau : hypothalamus antérieur, hypothalamus postérieur, cortex, septum, tractus olfactif noyau amygdalien, épithalamus-épiphyse, bulbes olfactifs, hippocampe.

Méthode d'analyse

Tous les tissus pour l'analyse étaient prélevés immédiatement après l'abattage. Le cerveau était disséqué à l'état frais. Les échantillons de chaque tissu étaient congelés à -15°C . Après décongélation, ils étaient coupés en petits morceaux et homogénéisés avec un peu d'eau et 100 μg d'hexœstrol non tritié agissant comme entraîneur dans la combustion suivante. Après l'homogénéisation, ils étaient lyophilisés et conservés dans un dessiccateur. Un fragment de 30 mg était mis dans une nacelle d'un appareil à combustion (25 mn à 750°C) de J. HERMANN-MORITZ. L'eau de combustion était condensée dans un tube U plongeant dans de la neige carbonique. L'eau de condensation était enlevée du tube avec 34 ml d'alcool et mise dans un flacon de comptage avec 16,5 ml d'une solution de toluène contenant 0,48 p. 100 de PPO (diphényl oxazole) et 12 mg p. 100 de POPOP (1,4-bis-2-5-phényl oxazolyl-benzène). L'activité était mesurée dans un « carbotrimètre » scintillateur. L'appareil était étalonné à l'aide d'une série de dilutions des deux œstrogènes tritiés. Il y avait une relation linéaire entre le log de l'activité réelle et le log des comptages entre 160 et 40 000 coups par minute (soit 0,45 à 105 m. Ci par échantillon. Pour moins de 160 c/mn il y avait un rapport entre l'activité et le nombre de coups observé mais la pente était plus faible et les estimations non quantitatives. Le « bruit de fond » (*background*) était de l'ordre de 10 à 30 c/mn.

Analyse statistique

Les résultats étaient évalués par « analyses de variance » des comptages obtenus sur les échantillons de 30 mg de tissu sec, après transformation logarithmique, utilisant le *sp.i plot* technique (SNEDECOR, 1946, p. 309). Trois analyses étaient faites, la première sur tous les tissus du cerveau, la deuxième sur tous les tissus-cibles et la troisième sur le sang, les muscles et les chiffres moyens des morceaux de cerveaux et des tissus-cibles.

RÉSULTATS

I. Généraux

Une première observation des chiffres montre qu'il n'y avait pas une grande différence entre les différentes régions du cerveau et du muscle. Les chiffres pour le sang et pour les tissus-cibles sont beaucoup plus élevés et il semble que leurs courbes avec le temps d'abattage soient différentes. Donc, trois analyses statistiques différentes ont été effectuées.

2. Les régions du cerveau

Le tableau 1 présente « l'analyse de variance » des comptages des régions du cerveau. Les niveaux d'activité sont très bas dans tous les tissus quel que soit l'intervalle de temps après l'injection, (moyenne 127 coups/min. : $< 0,015 \text{ m}\mu\text{Ci/mg}$ tissu sec). Ce niveau est plus élevé chez les animaux traités avec l'hexœstrol tritié que chez les animaux traités avec l'œstradiol tritié (160 : 95 coups/min. : $P < 0,02$). Cela n'est pas surprenant puisque la dose d'hexœstrol injecté était plus forte que

celle d'œstradiol. Il y a une diminution après chaque augmentation de l'intervalle de l'injection à l'abattage (199 : 136 : 94 : 80 coups/min : $P = 0,02$). Dans le cerveau, le bulbe olfactif a l'activité la plus élevée et le septum la plus basse (168 : 88 coups/min : $P = 0,02$). Il n'y a pas une grande différence entre les autres régions.

TABLEAU I

Analyse de variance des comptages obtenus à partir de 30 mg (poids sec) de 10 régions du cerveau après transformation logarithmique

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	F	P
<i>Lots principaux</i>					
Type d'œstrogène	1	23 948	23 948	31,55*	< 0,02
Méthode d'injection	1	1	1	—	—
Intervalle à l'abattage	(3)	19 803			
linéaire	1		19 230	25,33*	= 0,02
quadratique	1		33	—	—
cubique	1		540	—	—
Type × méthode	1	23 281	23 281	30,67*	< 0,02
Type × intervalle	3	1 645	548	—	—
Méthode × intervalle	3	30 423	10 141	13,36*	< 0,05
Erreur	3	2 278	759		
<i>Lots subordonnés</i>					
Région du cerveau	8	5 112	639	3,10*	= 0,02
Interactions de 1 ^{er} ordre	40	11 996	300	1,46	N.S.
Interactions de 2 ^e ordre	56	16 432	293	1,42	N.S.
Erreur	24	4 936	206		
Total	143	139 855	—	—	—

Deux interactions significatives ont été décelées (fig. 1 et 2). Les activités après l'injection d'hexœstrol ou d'œstradiol sont exactement les mêmes pour les injections intramusculaires mais après l'injection intraveineuse les niveaux sont plus élevés pour l'hexœstrol que pour l'œstradiol ($P < 0,02$). La deuxième interaction

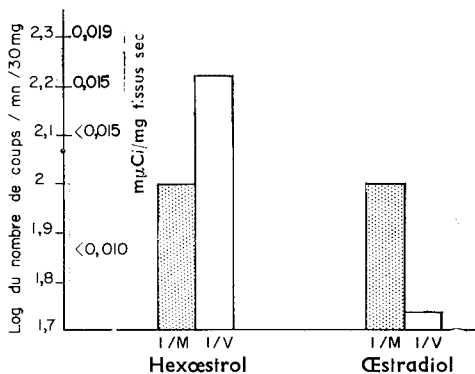


FIG. 1. — Influence du mode d'injection sur l'incorporation d'œstradiol et d'hexœstrol tritiés dans le cerveau de Brebis

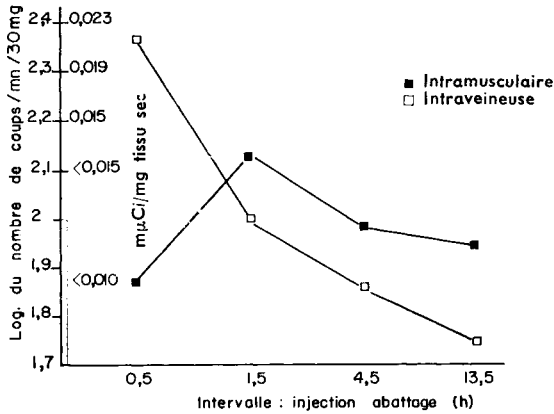


FIG. 2. — Variations en fonction du temps et du mode d'injection de la radioactivité du cerveau après injection d'œstrogène tritié chez la Brebis

TABLEAU 2

Moyennes des comptages réels donnés par 30 mg (poids sec) de 5 tissus-cibles ainsi que l'activité spécifique (par mg tissu sec)

Effet principal	Moyenne		
	Coups/min par échantillon de 30 mg		Activité spécifique en mµCi par mg tissu sec
1. Type d'œstrogène (n = 72)			
Hexœstrol tr.	900		0,085
Œstradiol tr.	463		0,043
P		N.S.	
2. Méthode d'injection (n = 72)			
Intramusculaire	472		0,044
Intraveineuse	891		0,084
P		N.S.	
3. Intervalle en h à l'abattage (n = 36)			
0,5	337		0,032
1,5	874		0,082
4,5	928		0,087
13,5	586		0,055
P linéaire		N.S.	
P quadratique		N.S.	
P cubique		N.S.	
4. Tissu-cible (n = 16)			
Hypophyse	885		0,083
Utérus endomètre	1 042		0,098
Utérus myomètre	505		0,047
Cervix	595		0,056
Vagin	376		0,035
P		< 0,001	
Moyenne	681		0,064

TABLEAU 3

Moyennes des comptages réels donnés par 30 mg (poids sec)
de 4 types de tissus ainsi que l'activité spécifique
(par mg tissu sec)

Effet principal	Moyenne		
	Coups/min par échantillon de 30 g		Activité spécifique en μCi par mg tissu sec
1. Type d'œstrogène (n = 72)			
Hexœstrol tr.	634		0,059
Œstradiol tr.	204		0,019
P		< 0,01	
2. Méthode d'injection (n = 72)			
Intramusculaire	267		0,025
Intraveineuse	571		0,054
P		< 0,05	
3. Intervalle en h à l'abattage (n = 36)			
0,5	511		0,048
1,5	466		0,044
4,5	450		0,042
13,5	249		0,023
P linéaire		N.S.	
P quadratique		N.S.	
P cubique		N.S.	
4. Type de tissu (n = 16)			
Sang	735		0,069
Muscle	131		< 0,015
Cerveau	127		< 0,015
Tissus-cibles	681		0,064
P		< 0,001	
Moyenne	419		

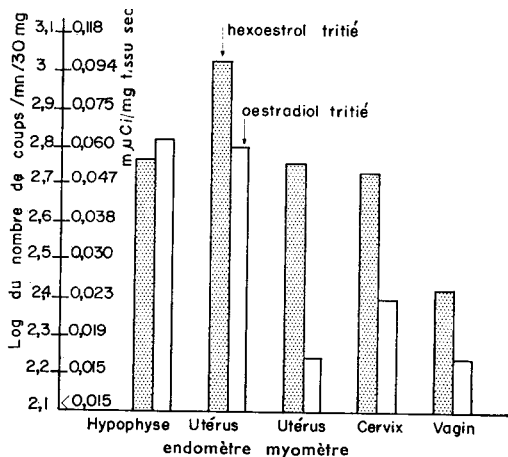


FIG. 3. — Influence du type d'œstrogène tritié et du tissu-cible sur la radioactivité de celui-ci

le trouve entre la méthode d'injection et l'intervalle à l'abattage ($P < 0,05$). Après injection intraveineuse le niveau le plus élevé se situe à une demi-heure suivant celle-ci; il diminue régulièrement à chaque intervalle. Au contraire, après l'injection intramusculaire, le niveau le plus élevé est une heure et demie. Ensuite, il tombe mais reste plus élevé qu'après traitement intraveineux.

3. Les tissus-cibles

Le tableau 2 présente les moyennes des comptages réels des 5 tissus-cibles. Tous ces tissus montrent une radioactivité beaucoup plus forte que celle du cerveau. Le niveau après injection d'hexœstrol est deux fois plus élevé que celui obtenu après injection d'œstradiol; mais la variabilité est si grande que la différence n'est pas significative ($0,2 > P > 0,1$). De même l'activité après injection par voie intraveineuse est presque deux fois plus grande que celle observée après injection intramusculaire ($0,2 > P > 0,1$). Le maximum d'activité est atteint une heure et demie et 4 heures et demie après l'injection, puis cette activité reste élevée jusqu'à 13 heures et demie ($0,2 > P > 0,1$) malgré une légère diminution.

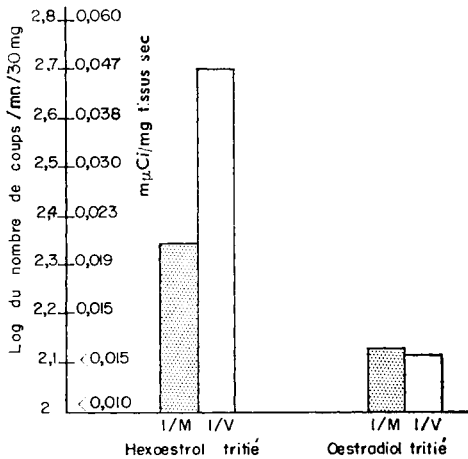


FIG. 4. — Influence du mode d'injection sur l'incorporation d'œstradiol et d'hexoestrol tritiés dans divers tissus chez la Brebis.

Les tissus les plus actifs sont l'endomètre et l'hypophyse tandis que le vagin est le moins actif ($P < 0,001$). Il y a aussi une interaction entre le type d'œstrogène et le tissu ($P < 0,05$, fig 3). Bien que la dose d'œstradiol injectée ait été beaucoup plus faible que celle d'hexœstrol, l'activité de l'hypophyse et de l'utérus endomètre est presque la même. Par contre, les activités de l'utérus myomètre, du cervix, et du vagin sont beaucoup moins fortes qu'après l'injection d'œstradiol qu'après celle d'hexœstrol.

4. Comparaison du sang, muscle, cerveau et des tissus-cibles

Le tableau 3 présente les moyennes des comptages réels des types de tissus. L'activité après injection d'hexœstrol est plus élevée que celle observée après injection d'œstradiol ($P < 0,01$) et il en est de même après injection intraveineuse par

rapport à l'injection intramusculaire ($P < 0,05$). Le niveau moyen dans le sang et dans les tissus-cibles est beaucoup plus fort que dans le muscle et le cerveau ($P < 0,001$). Il y a trois interactions très intéressantes.

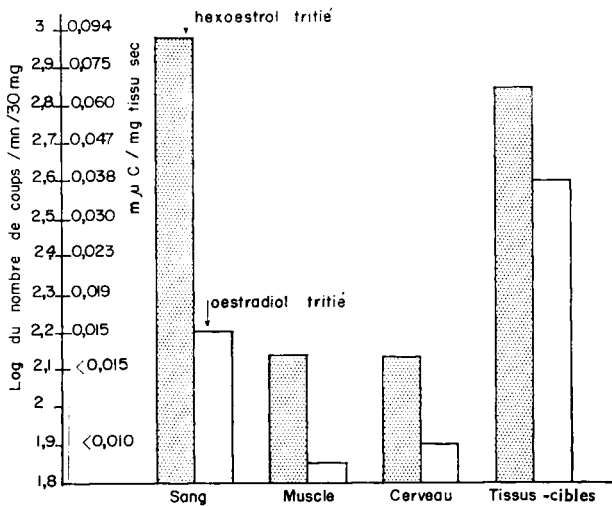


FIG. 5. — Radioactivité de différents tissus après injection d'œstradiol et d'hexœstrol tritiés chez la Brebis

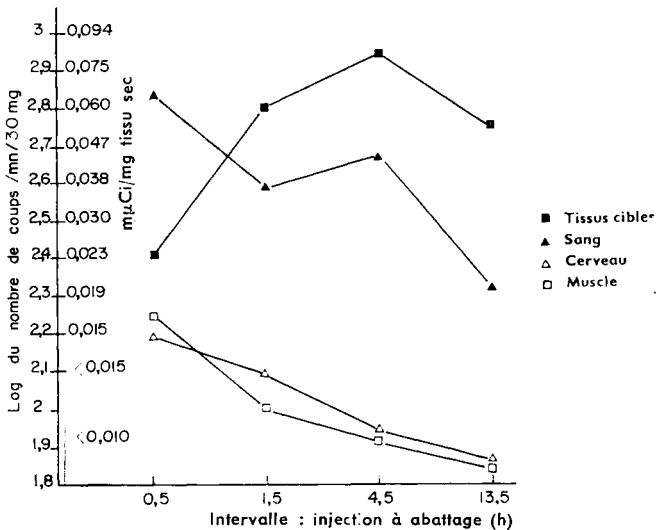


FIG. 6. — Variations en fonction du temps de la radioactivité de divers tissus après injection d'œstrogènes tritiés chez la Brebis

L'activité moyenne des tissus après injection d'hexœstrol par la voie intraveineuse est plus élevée qu'après injection intramusculaire. Par contre, l'œstradiol donne la même activité par les deux voies ($P < 0,05$, fig. 4). La deuxième interaction est entre le type d'œstrogène et le type de tissu. Le véhicule de transport

(le sang) et les deux tissus non-réactifs (le muscle, le cerveau) montrent une grande différence entre leurs activités après l'injection d'hexœstrol tritié ou d'œstradiol tritié. Par contre, l'accumulation chez les tissus-cibles est du même ordre de grandeur ($P < 0,01$, fig. 5). La troisième interaction est entre le type de tissu et l'intervalle de l'injection à l'abattage. Bien que le niveau d'activité dans le sang reste élevé jusqu'à 13 heures et demie, il diminue beaucoup après une demi-heure ; en particulier entre 4 heures et demie et 13 heures et demie. Le niveau d'activité dans le cerveau et le muscle diminue d'une façon uniforme de zéro heure et demie à 13 heures et demie. Par contre, celui des tissus-cibles s'élève jusqu'à 4 heures et demie et ensuite diminue un peu à 13 heures et demie ($P < 0,05$, fig. 6).

DISCUSSION

Les courbes d'apparition et de disparition de la radioactivité dans les divers tissus après injection d'hexœstrol tritié ou d'œstradiol tritié sont semblables. En dépit de la grande différence entre la dose de la radioactivité trouvée dans le sang, le muscle et le cerveau, l'activité chez les tissus-cibles est presque au même niveau. STONE, BAGGETT et DONELLY (1963) suggèrent que quelques récepteurs chez les tissus-cibles sont « inondés » par les œstrogènes. Dans ce cas, il y aurait un niveau critique pour lequel la concentration serait au maximum.

Il n'y a aucune évidence que le cerveau, ou quelque région du cerveau, ait la capacité de retenir l'œstrogène comme un tissu-cible. C'est peut-être une question de niveau d'activité mais il est curieux qu'il existe un délai de 12 heures au moins, entre l'injection d'œstrogène et le début de chaleur chez la brebis. De même, le niveau d'œstrogène pour la mise en chaleur est presque le même que celui pour le développement d'un frottis vaginal d'œstrus (ROBINSON, 1959). Les niveaux de radioactivité dans toutes les régions du cerveau sont semblables à ceux du muscle.

L'interaction entre le type d'œstrogène et la méthode d'injection est très intéressante. ROBINSON et BRANDER (1962) ont montré que l'hexœstrol mettait les brebis en chaleur avec la même efficacité, qu'il soit donné par voie intraveineuse ou par voie intramusculaire. D'autre part, l'œstradiol était beaucoup moins efficace par voie intraveineuse.

Parmi les tissus-cibles, l'hypophyse et l'utérus endomètre étaient les plus actifs. Aussi, il semble qu'il y ait une différence entre les tissus dans leurs capacités de retenir l'hexœstrol ou l'œstradiol. GLASCOCK et HOEKSTRA (1959) ont trouvé que l'utérus (myomètre ou endomètre) et le vagin étaient les tissus les plus actifs après injection d'hexœstrol tritié. Bien que nos résultats soient semblables, nous constatons en outre que l'hypophyse a une activité très élevée. L'utérus, le cervix et le vagin ont une capacité beaucoup plus faible de retenir la radioactivité après injection d'œstradiol tritié qu'après injection d'hexœstrol tritié.

Il semble que les tissus aient une plus grande capacité de rétention de l'hexœstrol que de l'œstradiol quand l'œstrogène est donné par la voie intraveineuse. Ceci peut expliquer la différence rapportée par ROBINSON et BRANDER (1962). Les tissus-cibles, dans le sens classique (utérus, vagin, cervix, hypophyse) ont une capacité très forte de retenir l'œstrogène œstradiol ou hexœstrol. Le système nerveux, par contre,

n'a pas cette capacité, selon nos méthodes courantes. Donc un niveau élevé dans le système général associé à un niveau élevé dans le sang entraînera un niveau plus élevé pendant plus longtemps dans le cerveau, accompagné d'une plus grande possibilité d'apparition du comportement de chaleur.

Reçu pour publication en février 1965.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été fait pendant une année de congé de l'Université de Sydney. L'auteur remercie le Gouvernement français, la *Lalor Foundation*, la *Wellcome Foundation* et l'*American Academy of Sciences* pour leur assistance, ainsi que ses collègues français, en particulier P. MAULÉON, R. ORTAVANT, J. P. SIGNORET et C. THIBAUT ; la fourniture d'œstradiol marqué par le D^r MINEZ, Département de Biochimie générale et comparée du Collège de France, et d'hexœstrol par le D^r GLASCOCK, *National Institute for Research in Dairing, Shinfield, Reading*, a permis la réalisation du travail.

SUMMARY

ACCUMULATION OF TRITIATED ŒSTRADIOL AND HEXŒSTROL IN THE BRAIN AND SOME OTHER TISSUES BY THE EWE

Sixteen ewes were used in a factorial design experiment in which tritiated hexœstrol (50 µg) or œstradiol (20 µg) was injected either intramuscularly or intravenously. Animals were slaughtered at 0.5, 1.5, 4.5 or 13.5 hours after injection and the radio-activity determined of blood, muscle, 9 régions of the brains and 5 reactive tissues (pituitary, uterine endometrium, uterine myometrium, cervix and vagina). No region of the brain had the capacity to retain œstrogen, although there were significant differences ($P = 0.02$) in the mean radioactivities in different regions. The olfactory bulbs were the most active and the septum the least. Activity in all regions was low.

Despite a 2.5 fold difference in radioactivity, in favour of hexœstrol, in the doses of the two œstrogens injected, the level of activity finally attained in some reactive tissues (uterine endometrium and pituitary gland) was comparable. In the others (uterine myometrium, cervix and vagina) the level following hexœstrol was much higher than that following œstradiol.

The persistency in the tissues studied (brain and others) of hexœstrol given intravenously was much greater than that of œstradiol given intravenously. The persistency of the two hormones given intramuscularly was comparable.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- GLASCOCK R. F., HOEKSTRA W. G., 1958. The metabolism of hexœstrol in ruminants. *Proc. 11th U. N. intern. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy*, **27**, 104.
- GLASCOCK R. F., HOEKSTRA W. G., 1959. Selective accumulation of tritium-labelled hexœstrol by the reproductive organs of immature female goats and sheep. *Biochem. J.*, **72**, 673-682.
- GLASCOCK R. F., POPE G. S., 1960. The preparation and purification of tritium-labelled hexœstrol of very high specific activity on the 5 mg scale. *Biochem. J.*, **75**, 328-335.
- JENSEN E. V., JACOBSON H. I., 1962. Basic guides to the mechanism of œstrogen action. *Recent Progr. Horm. Res.*, **18**, 387-408. Disc. 408-414.
- MARTIN L., 1960. The use of 2-3-5-triphenyltetrazolium chloride in the biological assay of œstrogens. *J. endocrinol.*, **2**, 187-190.
- ROBINSON T. J., 1959. The œstrous cycle of the ewe and doe. *Reproduction in Domestic Animals*, vol. I, chap. IX, ed. H. H. Cole, P. T. Cupps, Academic Press N. Y.

- ROBINSON T. J., BRANDER W. M., 1962. Comparative activities of a number of œstrogens when administered intravenously and intramuscularly in the sheep. *J. Reprod. Fertil.*, **3**, 74-88.
- SNEDECOR G. W., 1946. *Statistical methods*, 4th edition, The Iowa State College Press.
- STONE G. M., 1963. The uptake of tritiated œstrogens by various organs of the ovariectomised mouse following subcutaneous administration. *J. Endocrinol.*, **27**, 281-288.
- STONE G. M., 1964. A comparison of the activity of some pro-œstrogens administered subcutaneously and intravenously. *J. Endocrinol.*, **29**, 159-165.
- STONE G. M., BAGGETT B., DONNELLY R. B., 1963. The uptake of tritiated œstrogens by various organs of the ovariectomized mouse following intravenous administration. *J. Endocrinol.*, **27**, 271-280.
-