

ÉTUDE DU MÉTABOLISME D'UN ŒSTROGÈNE PHÉNOLIQUE CHEZ LE BOUC ET LE MOUTON

II. — FRACTIONNEMENT CHIMIQUE DE LA RADIOACTIVITÉ RETROUVÉE DANS DIVERS TISSUS APRÈS L'INJECTION DE L'HEXŒSTROL TRITIÉ

R. F. GLASCOCK et R. W. SMITH
avec la collaboration technique de M^{me} Ann WALSH

*Department of Radiobiochemistry,
National Institute for Research in Dairying,
Reading University, England*

RÉSUMÉ

L'hexœstrol tritié est administré à 4 boucs et à 4 brebis à la dose de 1 µg/kg. Les animaux sont abattus lorsque la concentration de la radioactivité tissulaire atteint sa valeur maximum et une gamme de tissus, parmi lesquels les organes sexuels, est extraite à l'éthanol-éther. Après hydrolyse acide, l'extrait est séparé en 6 fractions désignées respectivement *lipidique, basique, acide, neutre, phénolique non-hexœstrol* et *hexœstrol inchangé*. Dans la plupart des tissus, tant chez le mâle que chez la femelle, entre 50 et 70 p. 100 de la radioactivité tissulaire se retrouvent sous forme d'hexœstrol inchangé. Dans le foie, chez les deux sexes, et dans le pénis, la radioactivité inextractible (désignée *protéo-liée*) est particulièrement importante.

Dans des expériences de contrôle effectuées *in vitro* il est démontré que les transformations chimiques de l'œstrogène observées *in vivo* ne résultent pas d'une simple oxydation et que les enzymes qui provoquent ces transformations sont absentes dans le sang.

Les résultats obtenus sont discutés à la lumière de ce qui est déjà connu sur le métabolisme des œstrogènes dans d'autres espèces animales.

INTRODUCTION

Dans la première partie de ce travail (GLASCOCK et SMITH, 1969) nous avons étudié la distribution de la radioactivité chez le Bouc après l'injection d'hexœstrol tritié à doses physiologiques. Ce travail a mis en évidence une accumulation sélective dans les organes sexuels et dans les glandes endocrines analogue à celle observée chez la femelle de diverses espèces après l'injection de l'hexœstrol tritié ou d'un autre

œstrogène marqué (GLASCOCK et HOEKSTRA, 1959 ; JENSEN et JACOBSON, 1960 ; ALBERGA et BAULIEU, 1965 ; TERENIUS, 1966). Dans ce travail nous avons observé également une accumulation de la radioactivité exceptionnellement élevée dans les poumons, tant chez la Brebis que chez le Bouc, mais uniquement après administration par voie intraveineuse : après administration par voie sous-cutanée la concentration de la radioactivité dans les poumons était beaucoup plus faible.

La plupart des chercheurs qui ont étudié la fixation des œstrogènes l'ont fait avec l'œstradiol, ou avec un autre œstrogène naturel, chez la Ratte ou la Souris. En général ils sont parvenus à la conclusion que toute, ou presque toute, la radioactivité accumulée dans les organes-cibles se trouve sous forme de l'œstrogène administré (JENSEN, 1964 ; TERENIUS, 1966). Quant aux autres organes, quelques auteurs y ont décelé la présence de plusieurs métabolites mais ils n'ont pas cherché à distinguer entre les dérivés résultant d'une conjugaison avec les acides glucuronique ou sulfurique et ceux provenant d'une modification du noyau carboné.

Le métabolisme des œstrogènes semble avoir été très peu étudié chez le Ruminant femelle et encore moins chez le mâle, soit ruminant soit non-ruminant. Le but du présent travail est de déterminer quelle proportion de la radioactivité accumulée dans une gamme de tissus chez la Brebis et chez le Bouc, après l'injection de l'hexœstrol tritié, se trouve sous forme de l'œstrogène administré, soit libre, soit conjugué.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Hexœstrol-³H

L'hexœstrol tritié (radioactivité spécifique 150 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) est préparé selon la méthode de GLASCOCK et POPE (1960) modifiée. Il est administré aux animaux par voie sous-cutanée en solution huileuse, ou par voie intraveineuse en solution aqueuse comme décrit précédemment (GLASCOCK et SMITH, 1969).

Les animaux

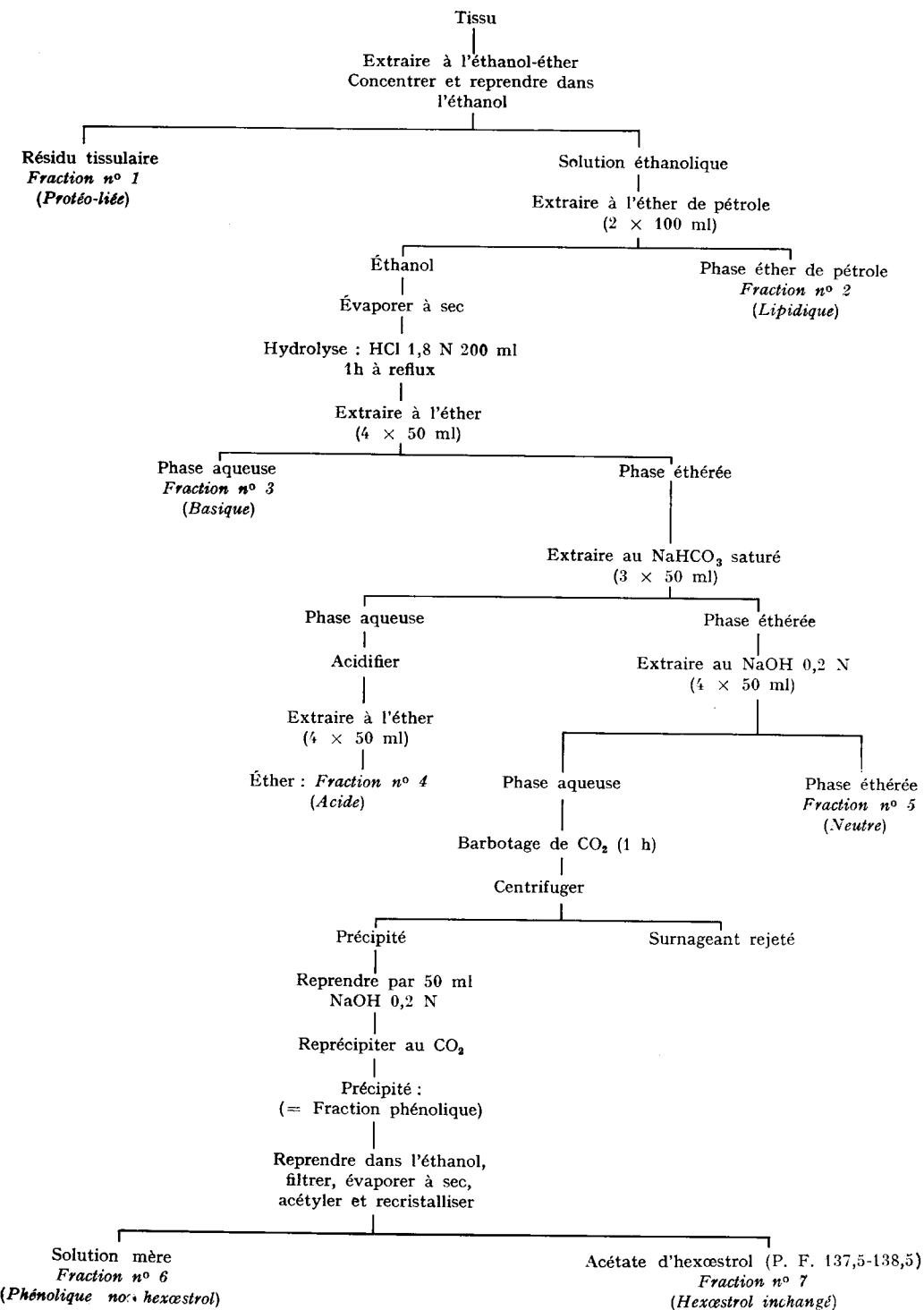
Les expériences ont porté sur 4 brebis qui ont été fournies par l'Université de Reading et sur 4 boucs de l'élevage de l'Institut. Chaque animal reçoit une dose d'hexœstrol marqué de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids corporel. On administre l'œstrogène à deux des brebis par voie sous-cutanée et aux deux autres brebis par voie intraveineuse. Comme l'analyse statistique des résultats de ces expériences n'indique pas une différence attribuable à la voie d'injection, les boucs n'ont reçu l'œstrogène que par voie intraveineuse.

Cinq heures après les injections sous-cutanées et 20 mn après les injections intraveineuses les animaux sont abattus et les organes voulus sont prélevés. Ces intervalles entre l'injection et l'abattage ont été choisis parce qu'on sait que c'est après ces durées de temps que les concentrations de la radioactivité dans la plupart des tissus atteignent leurs valeurs maximales (GLASCOCK et SMITH, 1969).

Préparation des échantillons

Chaque organe est haché à l'aide d'un hachoir domestique ou coupé en petits morceaux. Un échantillon de 5 g, ou tout le tissu s'il y en a moins, est additionné de 10 mg d'hexœstrol non-radioactif et chauffé à reflux sous azote pendant une heure dans un mélange d'éthanol-éther (3 : 1 v/v) à raison de 20 ml/g. L'extraction est répétée 4 fois et les extraits sont réunis et concentrés sous pression réduite à un volume de 10 ml. Puis l'extrait est transféré quantitativement dans une fiole jaugée contenant une solution éthanolique d'environ 100 mg d'hexœstrol non-marqué pesés avec précision et le volume est complété à 100 ml avec de l'éthanol.

TABLEAU I



Mesure de la radioactivité

Toutes les mesures de la radioactivité sont effectuées à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide (Tri-Carb, modèle 3314, Packard). Pour les solutions organiques et le diacétate d'hexœstrol on utilise une solution scintillante contenant 4 g de 2,5-diphényloxazole (PPO) et 0,3 g de 1,4-bis-(5-diphényloxazol-2-yl) benzène (POPOP) dans 1 litre de toluène. Pour les solutions aqueuses on utilise une solution contenant 7 g de PPO, 0,3 g de POPOP et 100 g de naphthalène dans un mélange de 600 ml de 2-méthoxy éthanol et 400 ml d'anisol. On peut ajouter jusqu'à 1 ml d'eau à 10 ml de cette dernière solution sans provoquer la séparation du mélange en deux phases. Le rendement pour le tritium dans chaque échantillon est déterminé par l'emploi du toluène-³H comme standard interne.

Fractionnement de la radioactivité

La radioactivité spécifique de l'extrait tissulaire en solution éthanolique est dosée en triple et la solution est soumise à un fractionnement par la technique indiquée sur le tableau 1. La radioactivité tissulaire inextractible est désignée *fraction protéo-liée* (fraction n° 1) et la dénomination des autres fractions correspond à la méthode appliquée à leur séparation.

Les solutions organiques sont évaporées à sec et les résidus sont repris par 10 ml de la solution scintillante. La solution acide (fraction n° 3) est concentrée à 25 ml et un échantillon de 1 ml est ajouté à 10 ml de solution scintillante. La solution bicarbonatée (fraction n° 4) est acidifiée et réextraite à l'éther (4 × 50 ml). Cette solution éthérée est traitée comme les autres solutions organiques en vue du dosage de sa radioactivité.

Acétylation de l'hexœstrol

On dissout 100 mg d'hexœstrol dans 1,25 ml de pyridine, on ajoute 1 ml d'anhydride acétique et chauffe 1 heure à 100°C. La solution est versée dans 10 ml d'eau et le précipité ainsi formé est séparé par centrifugation. Il est lavé à l'eau et recristallisé 2 fois dans l'éthanol à 95 p. 100, 1 fois dans l'éthanol absolu, et séché à 100°C.

Expériences de contrôle in vitro

A 100 ml d'eau et à 100 ml de sang de bouc citraté contenus dans des éprouvettes de 250 ml maintenues à 37° dans un bain-marie, on ajoute 0,1 µg d'hexœstrol-³H (radioactivité spécifique 5 µCi/µg) dissout dans 0,1 ml d'éthanol. On fait passer un courant d'oxygène dans ces solutions pendant 20 mn, et on prélève 3 échantillons de 5 ml de chacune. On ajoute chaque échantillon à 10 mg d'hexœstrol non-radioactif et on chauffe à reflux pendant 1 heure avec 100 ml d'éthanol-éther (3 : 1 v/v). Chaque solution est filtrée, le résidu (au cas du sang) est lavé à l'éthanol et le filtrat est concentré. Il est ensuite transféré dans une fiole jaugée contenant 100 mg d'hexœstrol non-radioactif pesés avec précision et le volume est complété à 50 ml. Après avoir dosé la radioactivité spécifique de cette solution en triple on la soumit au traitement utilisé pour le fractionnement de la radioactivité extraite des tissus (tabl. 1).

Calculs

Le pourcentage de la radioactivité totale qui se trouve dans les tissus sous forme d'hexœstrol libre ou conjugué est calculé à partir de la radioactivité spécifique du diacétate de l'hexœstrol séparé de l'extrait tissulaire.

Soit H m-moles la quantité d'hexœstrol non radioactif contenue dans l'extrait (en général, 10 + 100 mg = 0,4 m-mole environ) et soit r dés/mn/mg la radioactivité spécifique du diacétate purifié.

La radioactivité se trouvant sous forme chimique d'hexœstrol dans la solution éthanolique après hydrolyse est donc :

$$Hr \text{ dés/mn}$$

Si la radioactivité totale se trouvant dans le tissu soumis à l'extraction (= radioactivité non extractible + celle retrouvée dans la solution éthanolique) est de R dés/mn, le pourcentage se trouvant sous forme chimique d'hexœstrol inchangé est

$$\frac{100 Hr}{R}$$

La radioactivité spécifique de toutes les autres fractions (à l'exception de la fraction phéno-

TABLEAU 2

Distribution de la radioactivité entre les différentes fractions, séparées de divers tissus des brebis injectées avec l'hexœstrol-³H à la dose de 1 µg/kg de poids vif. Valeurs moyennes des pourcentages pour 4 animaux, et erreur-types.

| Tissu | Fraction | | | | | | |
|---|--------------------|------------------|----------------|--------------|---------------|------------------------------------|------------------|
| | 1 (Protéo-liée) | 2 (Lipidique) | 3 (Basique) | 4 (Acide) | 5 (Neutre) | 6 (Phénolique non-hexœstrol) | 7 (Hexœstrol) |
| Sang | 5,12 | 0,02 | 0,92 | 11,25 | 2,45 | 16,22 | 64,00 |
| Poumons | 11,22 | 0,22 | 2,12 | 10,00 | 3,35 | 30,50 | 42,65 |
| Foie | 36,72 | 0,72 | 1,88 | 7,75 | 1,58 | 21,20 | 30,15 |
| Ovaires | 10,40 | 0,58 | 0,35 | 4,72 | 1,98 | 20,80 | 61,18 |
| Utérus | 2,80 | 0,60 | 0,82 | 1,58 | 3,55 | 12,10 | 78,55 |
| Vagin | 5,50 | 1,65 | 0,12 | 1,08 | 2,42 | 14,88 | 74,35 |
| Erreur-type (13 degrés de liberté) | 3,151 | 0,620 | 0,448 | 2,759 | 0,499 | 2,801 | 3,983 |

lique non-hexœstrol) est mesurée directement en triple. La radioactivité totale dans chaque fraction est calculée et exprimée (tabl. 2) en pourcentage de la radioactivité totale retrouvée dans le tissu en question.

La valeur de la fraction phénolique non-hexœstrol n'est pas susceptible de mesure directe et elle est calculé par différence.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Brebis

Le tableau 2 montre la répartition de la radioactivité retrouvée dans une gamme de tissus de brebis entre les différentes fractions séparées après l'administration de l'hexœstrol tritié. Comme l'analyse statistique des résultats ne montre pas une différence attribuable à un effet possible de la voie d'injection, nous avons rassemblé les résultats obtenus chez les 4 brebis et calculé leurs valeurs moyennes. Ces moyennes sont présentées avec l'erreur-type pour l'ensemble des résultats pour chaque fraction. Dans la discussion suivante les valeurs de ces fractions ne sont considérées comme différentes que si la valeur de p calculée selon la méthode de DUNCAN (1955) est égale ou inférieure à 0,05.

On peut comparer nos résultats à ceux de JENSEN (1964) et de TERENIUS (1966) qui ont respectivement étudié le métabolisme de l'hexœstrol tritié chez la Ratte et la Souris. Dans ces deux travaux l'œstrogène a été administré en solution aqueuse par voie sous-cutanée à la même dose approximativement que dans le présent travail. La radioactivité tissulaire a été séparée en 3 (JENSEN) ou en 4 (TERENIUS) fractions non volatiles tandis que dans le présent travail on l'a séparée en 6 fractions. La fraction volatile séparée par JENSEN est négligeable chez le Ruminant (GLASCOCK et HOEKSTRA, 1959) et n'a pas été recherchée dans le présent travail. Bien que dans ces 3 laboratoires on ait parfois désigné ces fractions par les mêmes noms, il ressort des techniques de fractionnement utilisées que la correspondance chimique n'est pas toujours exacte.

Il convient de considérer les fractions séparées des tissus de Brebis par ordre de grandeur décroissant.

Fraction n° 7 (hexœstrol inchangé).

On constate tout d'abord que dans tous les tissus étudiés, à l'exception des poumons et du foie, la fraction hexœstrol est non seulement la plus importante mais représente aussi plus de la moitié de la radioactivité tissulaire. Bien que moins de 50 p. 100 de la radioactivité pulmonaire soit retrouvée dans cette fraction elle est la plus importante dans ce tissu aussi. C'est uniquement dans le foie que la fraction hexœstrol n'est pas majoritaire ; ici, une proportion légèrement supérieure se trouve dans la fraction protéo-liée (fraction n° 1). Il faut cependant noter à cet égard que les études de JENSEN (1964) chez la Ratte indiquent que 100 p. 100 de la radioactivité utérine se trouve sous forme d'hexœstrol inchangé et que TERENIUS n'obtient une valeur que légèrement inférieure (90 p. 100) chez la Souris. La différence entre ces résultats et les nôtres pourrait être due à ce que la méthode de dilution isotopique utilisée dans le présent travail est plus sensible que les méthodes chromatographiques utilisées par JENSEN et par TERENIUS.

En ce qui concerne les valeurs relatives de cette fraction dans les différents tissus, on constate qu'elle est plus importante dans l'utérus et le vagin que dans le sang. Si ces résultats ne prouvent pas directement que les organes-cibles fixent l'œstrogène plus efficacement que ses métabolites, comme on pouvait s'y attendre, ils sont du moins en accord avec cette conception.

Fraction n° 6 (phénolique non hexœstrol).

Comme les valeurs de toutes les autres fractions sont obtenues par mesure directe on pourrait penser que celles de la fraction phénolique non hexœstrol seraient d'autant plus entachées d'erreurs qu'elles sont obtenues par différence. Cependant, il n'y a pas de doute que cette fraction est réelle et que dans tous les tissus sauf le foie elle est la plus importante après la fraction hexœstrol. Ce n'est que dans les poumons que sa valeur moyenne est statistiquement différente de celles dans les autres tissus et on constate que cette valeur est exceptionnellement élevée.

Cette fraction aurait fait partie de la fraction éthéro-soluble de JENSEN (1964) et de la fraction phénolique de TERENIUS (1966). Dans la fraction éthéro-soluble du sang et du foie, JENSEN a démontré la présence de plusieurs métabolites sans toutefois les avoir identifiés. Cependant comme nous l'avons déjà noté, il n'a pu en déceler aucun dans la fraction éthéro-soluble de l'utérus. TERENIUS également n'a pu trouver qu'une trace négligeable d'une substance autre que l'hexœstrol dans la fraction phénolique extraite de cet organe. Nos résultats ne sont donc pas en accord avec ceux de ces auteurs.

Fraction n° 1 (protéo-liée).

Les valeurs moyennes de cette fraction dans tous les tissus à l'exception du foie ne sont ni très élevées ni statistiquement différentes les unes des autres. Ce n'est que dans le foie que la valeur moyenne de cette fraction est quantitativement importante et différente de celles dans les autres tissus. En effet, comme nous l'avons déjà noté en considérant la fraction hexœstrol, dans le foie la fraction protéo-liée est plus importante que toutes les autres fractions extraites de ce tissu.

Chez la Ratte, JENSEN (1964) a également trouvé que cette fraction représentait une proportion élevée (20 p. 100) de la radioactivité totale du foie alors que les valeurs n'étaient que de 1 et de 8 p. 100 dans l'utérus et le sang respectivement. TERENIUS (1966) a constaté que 12 p. 100 de la radioactivité plasmatique se retrouve dans la fraction protéo-liée contre seulement 0,4 et 0,9 p. 100 dans l'utérus et le vagin respectivement. Nos constatations quant à cette fraction sont donc plus en accord avec celles de JENSEN qu'avec celles de TERENIUS.

Fractions nos 3 et 4 (basique et acide).

La radioactivité contenue dans ces fractions serait séparée avec la fraction hydro-soluble par les techniques utilisées par JENSEN (1964) et TERENIUS (1966). Le tableau 2 montre que la fraction basique est très faible dans tous les tissus et au point de vue biologique peut être considérée comme négligeable. La fraction acide est pourtant plus importante, mais à cause de la variabilité des résultats c'est uniquement dans le sang que sa valeur moyenne est statistiquement différente de celle dans le vagin et l'utérus. La faible valeur de la fraction acide retrouvée dans ces organes est en

accord avec les résultats de JENSEN (1964) et de TERENIUS (1966) pour la fraction hydrosoluble. Cependant, ces auteurs ont respectivement trouvé 43 et 78 p. 100 de la radioactivité sanguine dans cette fraction, valeurs beaucoup plus élevées que celles observées dans le présent travail. Cette différence pourrait être due au fait qu'une partie importante de la radioactivité sanguine se trouve sous forme d'hexœstrol conjugué et donc hydrosoluble et que, dans le présent travail, tous les extraits tissulaires ont été soumis à une hydrolyse acide avant le fractionnement.

Fractions nos 2 et 5 (lipidique et neutre).

Les différences entre les valeurs moyennes de la fraction lipidique dans les six tissus étudiés ne sont pas significatives. Quant aux fractions neutres, seules les valeurs moyennes pour les poumons et l'utérus, qui sont les plus élevées, et celle pour le foie, qui est la plus faible, sont statistiquement différentes. Ces deux fractions ont évidemment très peu d'importance quantitative.

Dans son travail chez la Souris, TERENIUS aurait séparé ces deux fractions avec sa fraction lipidique. Celle-ci avait une valeur de 5,0 et 5,3 p. 100 dans le plasma et l'utérus respectivement. Ces valeurs sont en assez bon accord avec la somme des valeurs moyennes des fractions lipidiques et neutres du présent travail. Par contre, JENSEN, qui aurait séparé ces fractions avec sa fraction éthéro-soluble n'a trouvé que l'hexœstrol inchangé dans l'extrait utérin. On peut cependant se demander si sa technique chromatographique aurait pu déceler une proportion aussi faible que celle retrouvée dans nos expériences.

Boucs

Comme il ressort des expériences chez la Brebis que la répartition de la radioactivité tissulaire entre les différentes fractions ne dépend pas de la voie d'injection il a semblé préférable de n'utiliser que la voie intraveineuse dans les expériences chez le Bouc. Les résultats sont présentés dans le tableau 3, comme ceux relatifs aux Brebis, sous forme de valeurs moyennes avec l'erreur-type pour l'ensemble des résultats pour chaque fraction.

Fraction n° 7 (hexœstrol inchangé).

La fraction hexœstrol est la plus importante dans tous les tissus étudiés, et, sauf dans les poumons, le foie et le pénis, elle représente plus de la moitié de la radioactivité tissulaire. Contrairement à ce qu'on observe chez la Brebis, la valeur de cette fraction retrouvée dans les organes sexuels n'est pas supérieure à celle retrouvée dans le sang. On ne peut donc pas penser que ces résultats appuient l'idée, comme ceux obtenus chez la Brebis, que les organes sexuels fixent l'œstrogène plus efficacement que ses métabolites. On sait (GLASCOCK et SMITH, 1969) que la fixation de l'œstrogène est moins élevée dans les organes mâles que dans les organes femelles. Toutefois, il est également évident que dans les organes sexuels (à l'exception du pénis) l'œstrogène ne subit guère plus de transformation chimique chez le mâle que chez la femelle. Le pourcentage de la radioactivité totale qui se trouve sous forme d'hexœstrol inchangé est relativement faible non seulement dans le foie et les poumons, comme chez la Brebis, mais aussi dans un organe sexuel, le pénis. Ces différences sont significatives.

TABLEAU 3
*Distribution de la radioactivité entre les différentes fractions, séparées de divers tissus
 des boucs injectés avec l'hexaestrol-³H à la dose de 1 µg/kg de poids vif.
 Valeurs moyennes des pourcentages pour 4 animaux, et erreur-types*

| Tissu | Fraction | | | | | | |
|---|-------------------|------------------|----------------|--------------|---------------|-------------------------------------|-------------------|
| | 1 (Protéo-lée) | 2 (Lipidique) | 3 (Basique) | 4 (Acide) | 5 (Neutre) | 6 (Phénolique non-hexaestrol) | 7 (Hexaestrol) |
| Sang | 6,75 | 0,48 | 0,18 | 3,58 | 6,05 | 8,22 | 75,25 |
| Poumons | 15,22 | 6,52 | 1,35 | 3,38 | 15,40 | 24,98 | 33,15 |
| Foie | 26,95 | 0,50 | 1,65 | 6,78 | 3,98 | 22,60 | 37,62 |
| Testicules | 2,28 | 2,88 | 1,62 | 2,30 | 6,68 | 15,82 | 68,42 |
| Vésicules séminales .. | 15,00 | 2,10 | 3,08 | 2,58 | 8,32 | 9,55 | 59,38 |
| Pénis | 33,90 | 1,52 | 0,75 | 1,90 | 4,68 | 10,65 | 46,60 |
| Prostate | 9,65 | 3,12 | 4,50 | 4,65 | 2,48 | 17,02 | 58,58 |
| Épididyme | 11,08 | 1,98 | 0,68 | 3,22 | 10,55 | 6,42 | 66,10 |
| Erreur-type (21 degrés de liberté) | 2,976 | 0,804 | 1,194 | 1,273 | 1,132 | 2,350 | 3,336 |

Fraction n° 1 (protéo-liée).

On constate que la faible valeur de la fraction hexœstrol dans le pénis est accompagnée d'une valeur exceptionnellement élevée de la fraction protéo-liée. En effet, cette fraction est plus importante dans ce tissu que dans tous les autres tissus étudiés sauf le foie. Nous discutons plus loin de la nature de la fraction protéo-liée et il suffit donc ici de rappeler quant à sa valeur élevée dans le pénis que celui-ci n'est pas considéré comme un organe doué d'une haute activité métabolique comme le sont le foie et les poumons. Conformément à cette conception on note que 70 p. 100 de la radio-activité extractible, c'est-à-dire non protéo-liée, se trouve sous forme d'hexœstrol inchangé.

En ce qui concerne les gonades, on constate que la valeur moyenne de la fraction protéo-liée est plus faible dans les testicules que dans les ovaires. Cependant, dans les autres organes sexuels elle est en général plus importante chez le Bouc que chez la Brebis.

Dans le sang, le foie et les poumons les valeurs de cette fraction sont voisines de celles observées chez la Brebis. Il semble donc que dans ces tissus le sexe de l'animal influence très peu l'importance de cette fraction.

Fraction n° 6 (phénolique non hexœstrol).

Les valeurs minimales de cette fraction s'observent dans l'épididyme (6,4 p. 100) et dans le sang (8,2 p. 100) où elles sont plus faibles que dans tous les tissus étudiés chez la Brebis. Là, une valeur minimale de 12,1 p. 100 s'observe dans l'utérus. Dans la mesure où une comparaison entre les deux sexes est possible on constate que les valeurs de cette fraction dans les autres tissus sont voisines de celles observées chez la Brebis, c'est-à-dire, qu'elles sont relativement élevées dans le foie et les poumons et relativement faibles dans les organes sexuels. On note que dans le pénis où la valeur de la fraction protéo-liée est exceptionnellement élevée celle de la fraction phénolique non-hexœstrol est une des plus faibles.

Fractions nos 3 et 4 (basique et acide).

Si l'on se rapporte aux résultats des tableaux 2 et 3 on voit que dans tous les organes étudiés la fraction basique est presque aussi faible chez le Bouc que chez la Brebis et il en va à peu près de même pour la fraction acide dans les organes sexuels. On constate aussi que chez le Bouc les valeurs de cette fraction dans le sang et les poumons sont 3 fois plus faibles que chez la Brebis. Néanmoins, par rapport aux fractions principales (hexœstrol, phénoliques non hexœstrol, protéo-liées), les fractions basiques et acides ne sont guère plus importantes chez le mâle que chez la femelle.

Fractions nos 2 et 5 (lipidique et neutre).

Bien qu'en général plus importante que chez la Brebis, la fraction lipidique dans tous les tissus étudiés chez le Bouc est très faible par rapport aux autres fractions. Par contre, les valeurs de la fraction neutre retrouvées dans l'épididyme et dans les poumons sont statistiquement plus élevées que celles retrouvées dans les autres tissus. Cette observation s'explique mal, d'autant plus que ces organes sont très différents

au point de vue structure et fonction : cependant, mis à part ces deux résultats on peut penser que les fractions lipidiques et neutres sont quantitativement peu importantes dans tous les tissus étudiés chez le Bouc.

La nature et l'origine des fractions

Il est évident que l'hexœstrol est transformé dans l'organisme animal en plusieurs produits dont on ignore la nature précise. Il est cependant bien connu que les phénols sont très susceptibles d'oxydation par l'oxygène atmosphérique et nous avons remarqué que les taches d'hexœstrol jaunissent pendant une nuit si on les laisse sur papier après purification chromatographique. Selon toute probabilité cette coloration indique la formation d'une quinone. La haute concentration de la radioactivité accumulée dans les poumons notamment après injection intraveineuse (GLASCOCK et SMITH, 1969) et la proportion élevée de cette radioactivité qui se trouve dans la fraction phénolique non hexœstrol (tabl. 2 et 3) nous ont suggéré que dans les tissus l'hexœstrol peut subir une oxydation de nature plutôt chimique que biochimique. Par là, nous entendons une oxydation qui s'effectue sans l'intervention d'une enzyme.

Cette hypothèse nous a amenés à effectuer les expériences de contrôle *in vitro*. Deux solutions de l'hexœstrol tritié à 1 µg/kg, l'une dans de l'eau et l'autre dans du sang citraté, sont traitées à 37° pendant 20 mn par un courant d'oxygène. La durée du traitement correspond ainsi au délai entre l'injection et l'abattage des animaux recevant l'œstrogène par voie intraveineuse.

TABLEAU 4

Récupération de l'hexœstrol-³H après incubation à 37°C pendant 20 mn sous barbotage d'O₂ dans de l'eau et du sang. Concentration de l'hexœstrol : 1 µg/l

Radioactivité retrouvée sous forme d'hexœstrol inchangé. Valeurs en pourcentage de la radioactivité totale dans les solutions

| Expérience no. | Solution | |
|----------------|----------|------|
| | Eau | Sang |
| 1 | 97,6 | |
| 2 | 94,9 | 96,7 |
| 3 | 97,8 | 97,5 |

Comme le montre le tableau 4, 95-98 p. 100 de la radioactivité dans les deux solutions sont récupérées sous forme d'hexœstrol inchangé. Il découle de ces expériences que l'hydrolyse acide n'entraîne aucune destruction de l'hexœstrol et aussi qu'une simple oxydation n'est pas responsable des dérivés de l'hexœstrol séparés dans les différentes fractions. Les enzymes qui catalysent la formation de ces dérivés doivent donc être absentes dans le sang et, par conséquent, se trouver dans d'autres tissus. Ces tissus seraient ainsi à l'origine des métabolites sanguins. Cette constatation n'est pas en accord avec celle d'AXELROD et WERTHESEN (1961) qui ont observé la formation de plusieurs dérivés hydroxylés de l'œstrone, de la testostérone et de

l'hydrocortisone après incubation avec du sang de vache. L'identité des tissus responsables des métabolites radioactifs dans le sang reste conjecturale mais on note à cet égard la haute proportion de la radioactivité tissulaire qui, dans les deux sexes, se trouve sous forme de métabolites dans les poumons et le foie.

Si, comme il le semble, les transformations que subit cet œstrogène sont de nature biochimique, on peut penser que la première attaque serait une hydroxylation. On sait que plusieurs stéroïdes sont transformés en produits hydroxylés aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* et TERENIUS (1966) a recherché le dihydroxyhexœstrol [més0-3,4-*bis* (3',4'-dihydroxyphényl-*n*-hexane)] dans ses fractions phénoliques. Cependant, il n'a pu en déceler qu'une très faible proportion (moins de 2 p. 100) dans les 3 tissus étudiés (plasma, vagin et utérus). Il n'est pourtant pas exclu que ce métabolite, ou un autre phénol hydroxylé, soit contenu dans la fraction phénolique non hexœstrol extraite des tissus dans le présent travail. Une autre réaction également probable est une oxydation en quinones de l'hexœstrol ou de ses dérivés hydroxylés. On sait depuis les travaux de JELLINCK et coll. (JELLINCK, 1960 *a* et *b* ; JELLINCK, LEWIS et BOSTON, 1967) que la phénoloxidase de champignon provoque *in vitro* l'oxydation de l'œstrone, de l'œstradiol et du stilbœstrol en produits quinoniques et qu'un système enzymique analogue existe dans le foie de rat. S'il en était ainsi chez la Brebis et le Bouc et que les produits restent libres, ils paraîtraient dans les fractions phénoliques non-hexœstrol ou neutres selon que la réaction porte sur un des anneaux benzéniques de l'hexœstrol ou sur les deux.

Cependant, s'il se forme de tels produits quinoniques ils ne resteraient pas nécessairement libres. Il est bien connu que les quinones se lient activement aux protéines et JELLINCK (1960 *a* et *b*) a constaté que la phénoloxidase de champignon catalyse *in vitro* la transformation de l'œstradiol et du stilbœstrol en produits très efficacement protéo-liés.

Quant au présent travail on peut s'interroger sur la nature de la fraction désignée *protéo-liée*. D'une part elle pourrait provenir d'une transformation de l'hexœstrol en produits quinoniques comme nous en avons discuté plus haut ; d'autre part, comme plusieurs auteurs (NOTEBOOM et GORSKI, 1965 ; BAULIEU, ALBERGA et JUNG, 1967 ; BAULIEU, 1968) ont mis en évidence l'existence des liaisons, spécifiques aussi bien que non-spécifiques, entre stéroïdes et protéines, la substance radioactive protéo-liée pourrait être l'hexœstrol lui-même. Les résultats obtenus dans le présent travail ne nous permettent pas de décider de la nature chimique de cette substance dans les différents tissus. Il est cependant possible que la radioactivité protéo-liée soit redevable à des produits quinoniques dans un tissu de haute activité métabolique, tel que le foie, et à l'hexœstrol lui-même dans les tissus d'activité métabolique plus faible tels que le pénis. Pour trancher cette question il serait nécessaire d'avoir recours à une méthode, telle que la digestion à la protéinase, qui soit capable de libérer le composé radioactif de sa liaison protéinique. Cet aspect du problème est déjà à l'étude.

D'après JELLINCK et coll. (1967) l'incubation de l'œstradiol avec une préparation de microsomes hépatiques donne naissance à un produit hydrosoluble dont les propriétés correspondent à celles d'une quinone conjuguée au glutathion. Si un produit analogue était présent dans les extraits tissulaires du présent travail, la quinone radioactive se retrouverait après l'hydrolyse acide dans la fraction neutre.

Étant donné que nous savons très peu de la première réaction que subit l'hexœstrol dans les tissus il serait vain de spéculer sur celles qui lui succèdent. Il est évident

que chez les deux sexes il se produit plusieurs dérivés de propriétés chimiques différentes dont la concentration varie selon le tissu où ils sont formés. On ignore encore si une fraction donnée, extraite d'un tissu, renferme le même métabolite que la fraction correspondante extraite d'un autre tissu. Il faut reconnaître qu'en mettant en évidence la production chez le Ruminant de divers métabolites de l'hexœstrol nous n'avons guère jeté de lumière sur leur identité.

A la suite de nombreux travaux effectués chez les Rongeurs pendant les 10 dernières années il est généralement considéré comme acquis que les œstrogènes subissent très peu de modifications chimiques dans les organes-cibles chez la femelle. Le présent travail indique que cette conclusion n'est pas complètement valable pour le Ruminant, et pourrait ainsi la remettre en question pour les autres espèces.

Reçu pour publication en avril 1970.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M^{lle} BOSHER pour son aide technique, M^{lle} Z. D. HOSKING pour l'analyse statistique des résultats et M. BONE, bibliothécaire de cet Institut, pour avoir aimablement vérifié le texte et la bibliographie de cet article.

SUMMARY

A STUDY OF THE METABOLISM OF A PHENOLIC ŒSTROGEN IN THE RUMINANT.

II. — CHEMICAL FRACTIONATION OF RADIOACTIVITY RECOVERED FROM VARIOUS TISSUES AFTER INJECTION WITH TRITIATED HEXŒSTROL

Tritiated hexœstrol was administered to 4 male goats and 4 ewes at a dose of 1 µg/kg. The animals were slaughtered when the concentration of radioactivity in tissues reached its maximum value and a range of tissues, including the sex organs, was extracted with ethanol-ether. After acid hydrolysis the extract was separated into the following 6 fractions: *lipid, basic, acid, neutral, phenolic non-hexœstrol* and *unchanged hexœstrol*. In most tissues of both male and female animals between 50 p. 100 and 75 p. 100 of the radioactivity present was in the form of unchanged hexœstrol. In the liver of both sexes and in the penis, inextractible radioactivity (protein bound) was particularly high.

In control experiments carried out *in vitro* it was shown that chemical changes in the œstrogen observed *in vivo* did not result from a simple oxidation and that the enzymes causing these changes were absent from the blood.

The results obtained are discussed with reference to what is already known on the metabolism of œstrogens in other species.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBERGA A., BAULIEU E. E., 1965. Concentration élective de l'œstradiol dans l'endomètre chez la Ratte. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **261**, 5226-5228.
- AXELROD L. R., WERTHESEN N. T., 1961. Blood as a site for the conversion of the steroid hormones. *Endocrinology*, **68**, 180-183.

- BAULIEU E. E., 1968. Les « récepteurs hormonaux ». Mise en évidence de la liaison spécifique de l'œstradiol à des protéines utérines. *Ann. Endocr.*, Paris, **29**, 131-139.
- BAULIEU E. E., ALBERGA A., JUNG I., 1967. Récepteurs hormonaux. Liaison spécifique de l'œstradiol à des protéines utérines. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **265** D 354-357.
- DUNCAN D. B., 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, **11**, 1-42.
- GLASCOCK R. F., HOEKSTRA W. G., 1959. Selective accumulation of tritium-labelled hexoestrol 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 hexoestrol of very high specific activity on the 5 mg scale. *Biochem. J.*, **75**, 328-335.
- GLASCOCK R. F., SMITH R. W., 1969. Étude du métabolisme d'un œstrogène phénolique chez le bouc et le mouton. I. Effets du sexe et de la voie d'injection sur la distribution tissulaire d'une dose physiologique d'hexoestrol. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **9**, 527-536.
- JELLINCK P. H., 1960 a. The enzymic oxidation of [$^{16-14}C$] œstrone *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 37-45.
- JELLINCK P. H., 1960 b. Enzymic oxidation of stilboestrol labelled with carbon-14. *Nature*, Lond., **186**, 157-158.
- JELLINCK P. H., LEWIS J., BOSTON F., 1967. Further evidence for the formation of an estrogen-peptide conjugate by rat liver *in vitro*. *Steroids*, **10**, 329-346.
- JENSEN E. V., 1964. Metabolic fate of sex hormones in target tissues with regard to tissue specificity. *Int. Congr. Endocr.*, **2**, London, 420-433.
- JENSEN E. V., JACOBSON H. I., 1960. Fate of steroid estrogens in target tissues. *Steroids and Cancer*, pp. 161-178, éd. G. Pincus et E. P. Vollmer, Academic Press, N. Y.
- NOTEBOOM W. D., GORSKI J., 1965. Stereospecific binding of estrogens in the rat uterus. *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 559-568.
- TERENIUS L., 1966. The uptake of radioactive isomers of a synthetic œstrogen in various organs of immature mice. *Acta endocr.*, Copenh., **53**, 84-92.
-