

MÉTABOLISME DES ŒSTROGÈNES CHEZ LA BREBIS GRAVIDE

I. — LES ŒSTROGÈNES URINAIRES

M. TERQUI

avec la collaboration technique de Sylvie LARA

*Station centrale de Physiologie animale,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78 - Jouy-en-Josas*

RÉSUMÉ

A différentes périodes de la gestation, de l'œstrone $4\text{-}^{14}\text{C}$ et de l'œstradiol 17β ont été injectés par voie intraveineuse ; l'excrétion de la radioactivité est rapide dans tous les cas. La voie fécale est la voie principale d'élimination (tabl. 1) ; le pourcentage d'élimination urinaire reste constant : 32 à 35 p. 100 de la dose injectée.

Nous avons entrepris l'analyse des œstrogènes radioactifs dans l'urine à l'aide de deux méthodes :

- la première a été décrite par BREUER (1964) ;
- la seconde dérive de celle qu'ont utilisé ADLERCREUTZ et LUUKKAINEN (1967) (fig. 1 et 2).

Dans l'urine de brebis gravide nous avons isolé et identifié les œstrogènes suivants, par le test de cristallisation jusqu'à activité spécifique constante : œstrone, 2 méthoxyœstrone, 16α hydroxyœstrone, œstradiol 17α , œstriol, 16 épi-œstriol et 17 épi-œstriol (tabl. 2) ; tous ces composés sont marqués au tritium et au carbone- 14 ; l'œstradiol 17α est le principal métabolite de l'œstrone et de l'œstradiol 17β ; une fraction de l'œstrone injectée n'est pas transformée. Il se forme 20 p. 100 d'œstrone à partir de l'œstradiol 17β (tabl. 3).

Le 17 épi-œstriol représente 10 p. 100 des traceurs injectés ; le pourcentage des autres métabolites est très faible.

INTRODUCTION

Si, à présent, des techniques très sensibles permettent de déterminer les concentrations plasmatiques d'œstrone, d'œstradiol 17β et d'œstriol, la mesure de l'excrétion urinaire d'œstrogène reste dans certains cas un test commode pour évaluer la production hormonale et l'intensité des transformations par 24 heures. Toutefois, le critère urinaire n'est valable que si les œstrogènes sont éliminés exclusivement par

l'urine ou si le pourcentage d'élimination urinaire demeure constant au cours d'un état physiologique.

Nous avons montré dans un travail précédent chez la Brebis (TERQUI, ROMBAUTS, FÈVRE, 1968) que les œstrogènes sont partiellement éliminés dans les fèces.

Il nous a paru important, d'une part, de connaître s'il existait au cours de la gestation chez une brebis, une variation de la répartition des œstrogènes entre l'urine et les fèces et, d'autre part, de préciser la nature des métabolites urinaires.

En effet, FÈVRE et ROMBAUTS (1966) ont décelé dans l'urine de brebis gravide d'autres composés œstrogènes en dehors de l'œstradiol 17α et de l'œstrone ; plus récemment, les travaux de NORMAN *et al.* (1968) semblent indiquer la prédominance dans le sang périphérique, au cours du cycle œstral, du 16 cétœstradiol ; enfin, FINDLAY et COX (1970) signalent dans le sang fœtal la présence d'un épimère de l'œstriol.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — Matériel

a) Animaux.

Les mesures sont effectuées sur une brebis *Ile-de-France* à trois stades de la gestation, qui correspondent : au début de l'excrétion d'œstradiol 17α au 70^e jour, à l'augmentation des œstrogènes au 90^e jour, puis à la chute momentanée de l'œstradiol 17α au 131^e jour, d'après les travaux de FÈVRE et ROMBAUTS (1966).

Enfin, une injection a été effectuée après le sevrage (« anœstrus »). L'animal est placé dans une cage à métabolisme permettant de récolter quantitativement et séparément les urines et les fèces de 24 heures. Après chaque injection, les récoltes d'excreta sont poursuivies pendant 10 jours consécutifs.

b) Les stéroïdes.

Les stéroïdes standards ont été recristallisés dans le système méthanol/eau, les points de fusion et leurs spectres infrarouges contrôlés. Les abréviations et les noms communs utilisés dans ce texte ont été définis précédemment (TERQUI, 1971).

L'œstrone ($4\text{-}^{14}\text{C}$ 50 mCi/mMole) provient du Radiochemical Center (Amersham, Buck's), l'œstradiol 17β $6,7\text{-}^3\text{H}$ (40 Ci/mMole) du C. E. A. (C. E. N., Saclay). Avant chaque expérience la pureté radiochimique de ces composés a été contrôlée par chromatographie en couches minces dans le système C de LISBOA (1962) — acétate d'éthyle/cyclohexane 50-50 — et à l'aide d'un lecteur Packard 7201. Lorsque des impuretés ont été détectées, les œstrogènes marqués ont été purifiés dans le système formamide/orthodichlorobenzène.

Les composés radioactifs, dissous dans une solution physiologique contenant 2 p. 100 d'éthanol, furent injectés dans la veine jugulaire.

2. — Méthodes

a) Mesure de la radioactivité.

Pour mesurer la radioactivité dans les urines et les extraits de fèces nous utilisons le mélange scintillant T_{2-1} décrit par PATTERSON et GREENE (1965).

Pour l'étude des fractions œstrogènes purifiées, nous avons utilisé du toluène contenant 4 g/l de PPO et 200 mg/l de diméthyl POPOP., les corrections de QUENCHING ont été effectuées par la méthode de standardisation externe.

b) Extraction des œstrogènes des fèces.

Les œstrogènes des fèces ont été extraits par le méthanol aqueux 70 p. 100 selon la technique décrite précédemment (TURQUI, 1968).

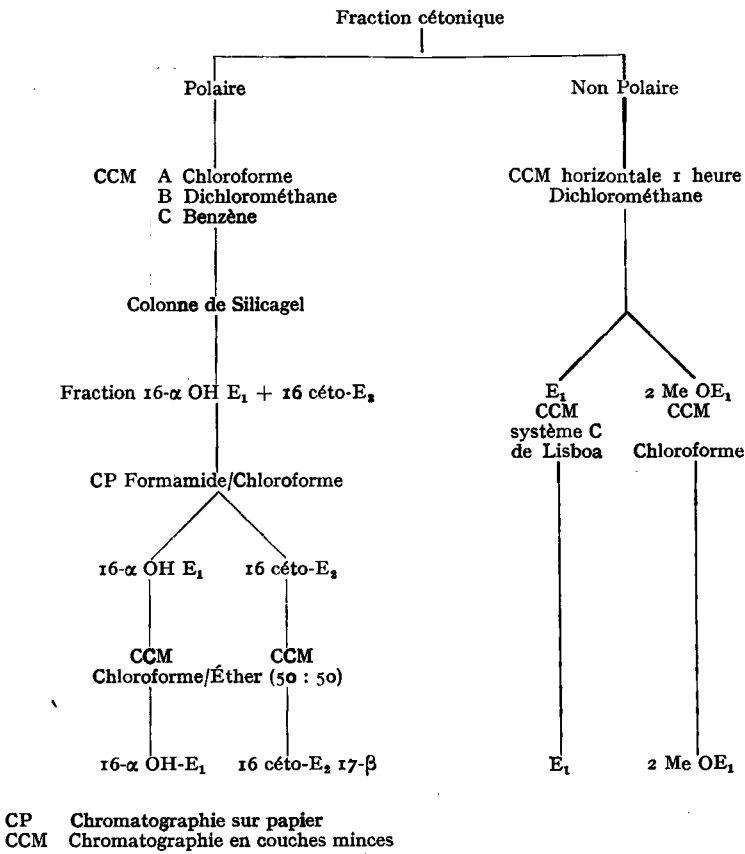


FIG. 1. — Schéma de la séparation de la fraction cétonique

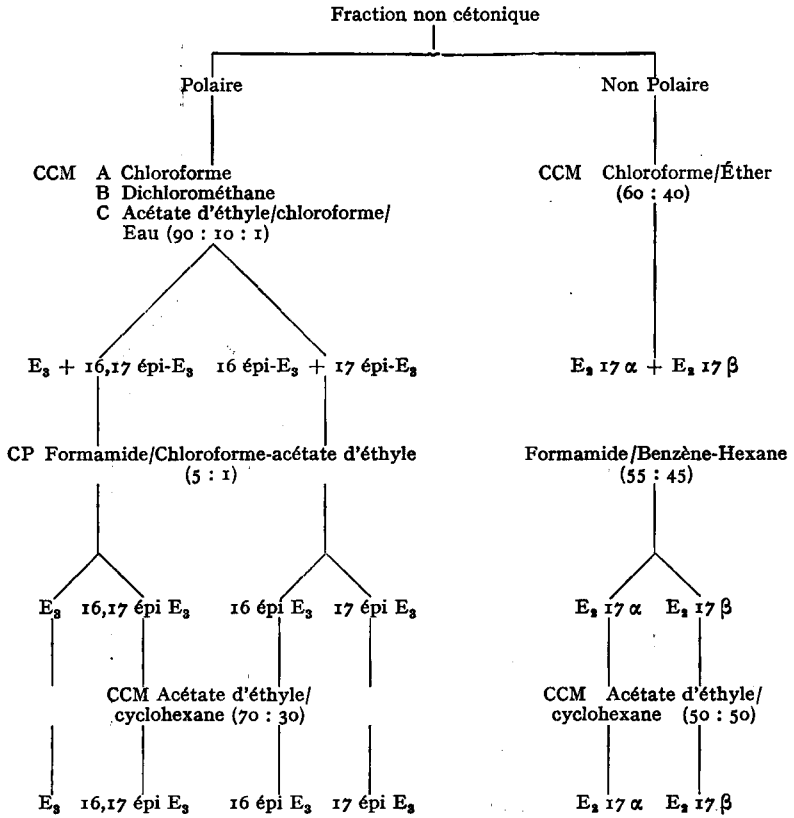


FIG. 2. — Schéma de la séparation de la fraction non cétonique

c) *Séparation des œstrogènes.**Aspect qualitatif :*

Les différents métabolites radioactifs ont été identifiés par la méthode décrite par BREUER (1964) qui consiste en une série de chromatographies sur papier.

Aspect quantitatif :

Afin de mesurer la radioactivité dans les différents métabolites, nous avons utilisé la technique suivante :

après hydrolyse enzymatique, les échantillons de 20 ml d'urine ont été traités selon la même méthode. Les premières étapes : extraction par l'éther éthylique, réaction de GIRARD et séparation en fractions polaires et non polaires ont été décrites par ADLERCRËUTZ et LUUKKAINEN (1967). Les quatre échantillons sont ensuite chromatographiés selon les schémas présentés dans les figures 1 et 2, les détails techniques sont définis dans une précédente publication (TERQUI, 1971).

d) *Cristallisation jusqu'à activité spécifique constante.*

Les cristallisations ont été effectuées dans le méthanol-eau, les cristaux et la liqueur-mère sont séparés par filtration ; les cristaux sont dissous sur le filtre par le mélange benzène-méthanol, soit 90-10, soit 50-50, selon la polarité des stéroïdes. Après pesée des cristaux et de la liqueur-mère, les mesures de radioactivité sont effectuées sur 1/10 ou 1/5 pour les cristaux et sur la totalité pour les liqueurs mères.

RÉSULTATS

I. — *Répartition urinaire et fécale*

De l'œstrone 4-¹⁴C et de l'œstradiol 17 β 6,7-³H ont été administrés à une brebis aux doses indiquées dans le tableau 1, à différentes périodes. Dans tous les cas l'excrétion d'œstrogène a été rapide, la voie fécale représente 52 à 65 p. 100 des doses injectées, le pourcentage de la voie urinaire reste à peu près constant, 32 à 35 p. 100 des doses administrées. Il ne semble donc pas exister, tout au moins chez cet animal, de variations importantes dans la répartition des œstrogènes entre urine et fèces au

TABLEAU I

Répartition des œstrogènes chez la brebis 050

Jour de l'injection	Stéroïdes marqués injectés	Dose injectée (en μ Ci)	Radioactivité retrouvée en p. 100 de la dose injectée	
			Fèces	Urine
70 ^e jour de gestation	Œstrone 4- ¹⁴ C	21,8	62,2	31,6
	Œstradiol 17 β 6,7- ³ H	112,4	66,7	31,7
90 ^e jour de gestation	Œstrone 4- ¹⁴ C	23	53	34,4
	Œstradiol 17 β 6,7- ³ H	105,8	64,4	36
131 ^e jour de gestation	Œstrone 4- ¹⁴ C	16	62,2	31,8
	Œstradiol 17 β 6,7- ³ H	136,4	67,1	32,8
« Anœstrus »	Œstrone 4- ¹⁴ C	18,4	53,6	35,1
	Œstradiol 17 β 6,7- ³ H	88,6	51,6	33,6

cours de la gestation et après la mise bas. La similitude des rapports $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ dans les urines et dans les fèces indique qu'il n'existe aucune différence dans l'élimination urinaire et fécale entre les deux traceurs administrés.

2. — *Nature des différents œstrogènes radioactifs de l'urine*

La première méthode a permis de séparer et d'isoler les œstrogènes radioactifs de l'urine de brebis gravide qui a reçu par voie intraveineuse de l'œstrone $4\text{-}^{14}\text{C}$ et de l'œstradiol $17\beta\text{ }6,7\text{-}^3\text{H}$.

Dans la fraction cétonique non polaire, trois pics de radioactivité ont été distingués :

le premier pic a le même comportement chromatographique que la 2-méthoxy-œstrone dans divers systèmes et il a été identifié à cette substance par le test de cristallisation jusqu'à activité spécifique constante (tabl. 2) ;

TABLÉAU 2

*Cristallisation jusqu'à activité spécifique constante
des œstrogènes radioactifs de l'urine de brebis gravide*

		Radioactivité spécifique (en dpm/mg)			
		des cristaux		de la liqueur mère	
		^3H	^{14}C	^3H	^{14}C
œstrone	1 ^{re}	16 171	1 296	16 870	1 466
	2 ^e	18 432	1 457		
	3 ^e	16 965	1 379		
2-méthoxy-œstrone	1 ^{re}	65	8	72	8
	2 ^e	87	8		
	3 ^e	90	9		
16 α hydroxy-œstrone	1 ^{re}	246	23	251	29
	2 ^e	300	33		
	3 ^e	272	24		
œstradiol 17 α	1 ^{re}	10 325	1 245	12 340	1 142
	2 ^e	9 303	1 175	12 351	1 151
	3 ^e	10 186	1 311		
	4 ^e	12 012	1 317		
œstriol	1 ^{re}	1 155	121	846	76
	2 ^e	781	93		
	3 ^e	772	62		
16 épi-œstriol	1 ^{re}	102	40		
	2 ^e	114	32		
	3 ^e	155	28		
	4 ^e	135	23		
17 épi-œstriol	1 ^{re}	1 607	201		
	2 ^e	1 607	215		
	3 ^e	1 734	220		

le deuxième pic, qui est très important, a été identifié à de l'œstrone par le même test (tabl. 2) ;

le troisième pic correspond à une ou plusieurs substances non identifiées mais plus polaires que les précédentes.

Au sein de la fraction cétonique non polaire, deux zones radioactives ont pu être observées : l'une est identique à la 16 α hydroxyœstrone (tabl. 2), l'autre ne cristallise pas avec le 16 cétœstradiol 17 β froid ajouté, malgré un comportement chromatographique identique. Il ne semble donc pas qu'il s'agisse du 16 cétœstradiol 17 β et cette fraction n'a pu être identifiée ; néanmoins, dans les tableaux, elle a été désignée sous le terme « fraction 16 cétœ-E₂ ».

La fraction non cétonique non polaire n'a recélé, après analyse, qu'une substance radioactive, l'œstradiol 17 α (tabl. 2).

Dans la fraction non cétonique polaire l'œstriol, le 16 épi-œstriol et le 17 épi-œstriol ont été identifiés par le test de cristallisation jusqu'à activité spécifique constante (tabl. 2).

Il existe donc, à côté de l'œstrone et de l'œstradiol 17 α dans l'urine de Brebis gravide, plusieurs autres métabolites : 2-méthoxyœstrone, 16 α hydroxyœstrone, œstriol, 16 épi-œstriol et 17 épi-œstriol. Des essais de séparation ont montré que les différents œstrogènes sont dans l'urine sous forme libre, sulfoconjuguée et glycuconjuguée.

3. — Importance des différents métabolites

L'analyse, selon la seconde méthode décrite plus haut, de la radioactivité des différents métabolites a été effectuée à partir des urines obtenues 24 et 48 heures après l'administration à une brebis d'œstrone 4-¹⁴C et de l'œstradiol 17 β 6,7-³H au 131^e jour de gestation. Les valeurs indiquées dans le tableau 3 ne sont pas corrigées pour les pertes survenues au cours des purifications et séparations et elles sont exprimées en pourcentage de la radioactivité totale retrouvée dans l'ensemble des métabolites. La pureté radiochimique des différents métabolites isolés par cette méthode a été contrôlée par cristallisation jusqu'à activité spécifique constante.

TABLEAU 3

*Pourcentage de radioactivité dans les différents métabolites
de l'urine de brebis gravide en p. 100
de la radioactivité retrouvée dans les métabolites*

Métabolites	³ H	¹⁴ C
Fraction cétonique non identifiée	1,5	3
E ₁	20,9	16,8
2 Me O E ₁	2,0	1,9
16 α OH E ₁	3	1,9
Fraction « 16 cétœ-E ₂ »	0,5	1,3
E ₂ 17 α	56	63,2
E ₃	1	0,9
16 épi-E ₂	3	1,35
17 épi-E ₂	12	10,6

Il ressort du tableau 3 que tous les métabolites identifiés sont marqués à la fois au tritium et au carbone 14. Plus de la moitié du tritium et du carbone 14 est retrouvée au niveau de l'œstradiol 17 α ; ce composé est donc le principal métabolite urinaire de l'œstrone et de l'œstradiol 17 β . Cependant, il reste environ 20 p. 100 d'œstrone qui n'est pas métabolisé, et il s'en forme à partir de l'œstradiol 17 β administré. L'œstradiol 17 β est complètement transformé et nous n'en avons pas retrouvé au niveau de l'urine.

Le 17 épi-œstriol est quantitativement, après l'œstradiol 17 α et l'œstrone, le composé le plus important puisqu'il constitue 10 à 12 p. 100 de la radioactivité retrouvée. Le 2-méthoxyœstrone, l'œstriol et le 16 épi-œstriol et la « fraction 16 céto-œstradiol 17 β » représentent chacun de 1 à 3 p. 100 de la radioactivité récupérée.

DISCUSSION

Si, au cours de la gestation, la répartition entre urine et fèces reste constante chez une même brebis, il semble, en revanche, que cette répartition varie de façon notable d'un animal à l'autre; en effet, chez une autre brebis (TERQUI, ROMBAUTS, FÈVRE, 1968) la voie urinaire ne représentait que 10 p. 100 de l'œstrone administrée. Un dosage des œstrogènes urinaires semble néanmoins parfaitement valable pour étudier l'évolution de l'activité du complexe foetus-placenta.

L'œstrone, l'œstradiol 17 β et l'œstradiol 17 α sont produits par le complexe foetus-placenta ainsi que l'ont montré les travaux d'AINSWORTH et RYAN (1966) et de PIERREPOINT *et al.* (1970). Les trois composés sont retrouvés dans le sang foetal où selon FINDLAY et COX (1970) l'œstradiol 17 α prédomine. Cependant, au niveau de l'urine, ne sont présents que l'œstradiol 17 α et l'œstrone, car, ainsi que nous l'avons démontré, l'œstradiol 17 β est totalement transformé en œstrone et surtout en œstradiol 17 α . Cette transformation peut s'effectuer au niveau du foie maternel comme l'ont montré les travaux de LYNGET et VELLE (1968) et il est probable, sinon certain, que la conversion de l'œstradiol 17 β en œstradiol 17 α s'effectue par l'intermédiaire de l'œstrone.

La fraction cétonique polaire contient globalement très peu de radioactivité. En dehors de la 16 α hydroxyœstrone, nous n'avons pu identifier le 16 céto-œstradiol 17 β dont la présence est signalée dans le sang de la Brebis au cours du cycle par NORMAL *et al.* (1968) et par CHALLIS, HARRISON et HEAP (1970). Le composé non identifié, qui a un comportement chromatographique comparable au 16 céto-œstradiol 17 β , est peut-être du 16 céto-œstradiol 17 α .

La formation d'œstriol et de 17 épi-œstriol peut s'effectuer par l'intermédiaire de la 16 α hydroxyœstrone; il est toutefois possible que le 17 épi-œstriol provienne de l'œstradiol 17 α par une autre voie. La présence du 17 épi-œstriol corrobore les travaux de FÈVRE et ROMBAUTS (1966) cités plus haut; l'épimère de l'œstriol dont la présence a été signalée par FINDLAY et COX (1970) dans le sang foetal, est très certainement le 17 épi-œstriol.

La présence du 16 épi-œstriol dans l'urine peut s'expliquer soit par la présence dans le sang maternel du 16 céto-œstradiol 17 β , soit par l'existence d'une 16 β stéroïde déshydrogénase dans le placenta de brebis (FERGUSON et CHRISTIE, 1967).

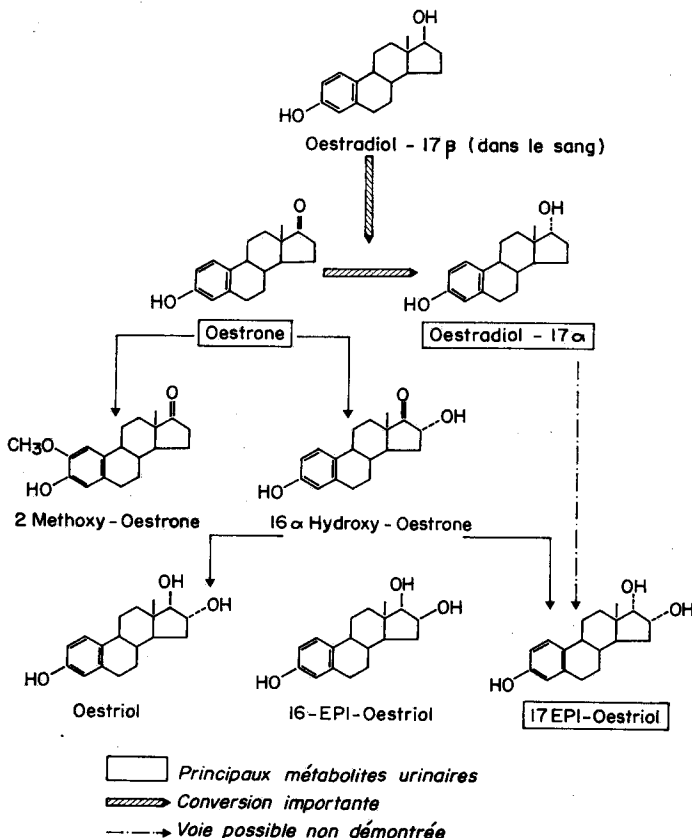


FIG. 3. — Métabolisme des œstrogènes chez la Brebis gravide

Nos résultats permettent d'établir, chez la Brebis, un schéma préliminaire (fig. 3) du métabolisme des œstrogènes dont certaines étapes restent à préciser. En outre, il apparaît nécessaire de déterminer l'évolution de ces nouveaux métabolites, principalement du 17 épi-œstriol au cours de la gestation de la Brebis.

Reçu pour publication en juin 1971.

SUMMARY

OESTROGEN METABOLISM IN THE PREGNANT EWE. I. — URINARY OESTROGENS

At different stages of pregnancy, we simultaneously injected an ewe intravenously with oestrone $4\text{-}^{14}\text{C}$ and oestradiol $17\beta\text{-}6,7\text{-}^3\text{H}$ (table 1). Radioactive excretion was rapid in all cases in the ewe. The faecal route is the main elimination pathway representing 52-65 p. 100 of the injected dose. Urinary elimination percentage remains almost constant at 32-35 p. 100 of the dose injected.

We undertook to analyze radioactive urinary oestrogens using a method derived from these described by BREUER (1964) and by ADLERCREUTZ and LUUKKAINEN (1967) (fig. 1 and 2). We isolated and identified the following oestrogens in ewe urine using the constant specific activity crystallisation test : oestrone, 2-methoxyoestrone, 16 α hydroxyoestrone, oestradiol 17 α , oestriol 16 epi-oestriol and 17 epi-oestriol (table 2).

Oestradiol 17 α is shown to be the principal metabolite of oestrone and oestradiol 17 β . A fraction of oestrone is not transformed. It forms 20 p. 100 oestrone from oestradiol 17 β . Thus epi-oestriol represents about 10 p. 100 of the injected tracer. The percentage of the other metabolites is very low (table 3).

Although some transformation had not been demonstrated in the pregnant ewe we worked out the figure 4 which is discussed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADLERCREUTZ H., LUUKKAINEN T., 1967. New methods for estimation of oestrogens in urine of non pregnant individuals. In : *Chromatographie en phase gazeuse des stéroïdes hormonaux appliquée aux liquides biologiques*. C. R. Table Ronde, Paris, mai 1969, Dunod édit.
- AINSWORTH L., RYAN K. J., 1966. Steroid hormone transformations by endocrine organs from pregnant mammals. I. Estrogen biosynthesis by mammalian placental, preparations *in vitro*. *Endocrinology*, **79**, 875-883.
- BREUER H., 1964. Occurrence and determination of the newer oestrogens in human urine. In : CASSANO C., *Research on steroids. Trans. first meet Internat. Study Group Steroid Hormons*. Rome, Italie, Vol. 1, 138-148. Il Pensiero Scientifico ed.
- CHALLIS J. R. G., HARRISON F. A., HEAP R. B., 1970. Metabolic clearance rates and conversion of oestradiol 17 β in the sheep (Proc.). *Biochem. J.*, **118**, 11 p.
- FERGUSON M. M., CHRISTIE G. A., 1967. Distribution of hydroxy steroid dehydrogenase in the placenta and foetal membranes of various mammals. *J. Endocr.*, **33**, 291-306.
- FÈVRE J., ROMBAUTS P., 1966. Étude de l'excrétion urinaire des œstrogènes chez la Brebis pendant la gestation. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **6**, 165-177.
- FINDLAY I. E., COX R. I., 1970. Oestrogens in the plasma of the sheep foetus. *J. Endocr.*, **46**, 281-282.
- LISBOA B. P., DICZFALUSY E., 1962. Separation and characterisation of steroid estrogen by means of thin layer chromatography. *Acta Endocr.*, **40**, 60-81.
- LYNGSET O., VELLE W., 1968. *In vitro* metabolism of oestrogens in liver tissues from domestic animals. *Acta Endocr.*, **59**, 682-688.
- PATTERSON M. S., GREEN R. C., 1965. Measurement of low energy beta emitters in aqueous solution by liquid scintillation counting of emulsions. *Analyt. Chem.*, **37**, 854-857.
- PIERREPOINT C. G., ANDERSON A. B. M., GRIFFITHS K., TURNBULL A. C., 1970. Investigation into the metabolism *in vitro* of C₁₉ steroids by the sheep placenta. *Biochem. J.*, **118**, 901-902.
- TERQUI M., ROMBAUTS P., FÈVRE J., 1968. Répartition urinaire et fécale de l'excrétion des œstrogènes chez la Truie et la Brebis. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **8**, 339-348.
- TERQUI M., 1971. Métabolisme des œstrogènes chez la Truie gravide. I. Les œstrogènes urinaires. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **11**.