

## RELATIONS ENTRE LES PHASES DE L'ANESTHESIE A L'URETHANE $^{14}\text{C}$ ET SON ACCUMULATION DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

YVES COHEN, JACQUES WEPIERRE et ALBERT LINDENBAUM

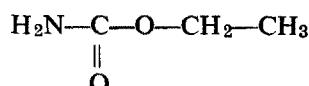
Laboratoire de Pharmacodynamie, Faculté de de Pharmacie de Paris et C.E.A., France

(Received 7 July 1966; accepted 8 August 1966)

**Abstract**—The relationship between the development of anesthesia by urethane (ethyl carbamate) and the accumulation of the drug in the Central Nervous System was studied in the rat. The stages of anesthesia were defined by the motor activity of the rat. The level of anesthetics was measured using  $^{14}\text{C}$ carboxylurethane. In spite of water/oil ratio of 64 the diffusion of urethane into the brain and cerebrospinal fluid (C.S.F.) was rapid. While the levels in the brain, the carotid blood and C.S.F. increased equally during induction of anesthesia, afterwards they differed and reached a plateau at 1500  $\mu\text{g/g}$  of fresh tissue in blood and brain and at 1700  $\mu\text{g/g}$  in C.S.F. Blood of head vessels (carotid artery and jugular vein) showed a higher concentration of urethane than caudal blood. Whole body autoradiograms of anesthetized mice showed a high level of radioactivity uniformly distributed in the brain. Blood, liver, muscles, lungs and salivary glands were less radioactive. Radioactivity in fatty stores was low.

L'URÉTHANE est un anesthésique peu utilisé chez l'Homme mais d'emploi plus courant chez les petits animaux de laboratoire. Son action anesthésique est légère mais durable sans effet secondaire notable. C'est également un cytotoxique utilisé dans le traitement des leucémies chroniques et du myélome multiple. De formule chimique simple, cette substance a suscité la curiosité des cancérologues qui ont cherché à expliquer son mécanisme d'action et en ont étudié le métabolisme (Boyland et Nery<sup>1</sup>). Administrée au rat, elle est répartie uniformément dans les tissus en quelques heures, métabolisée et largement excrétée dans l'air expiré sous forme de gaz carbonique.

Nous nous sommes intéressés à son métabolisme dans le système nerveux central, à cause de la simplicité même de sa formule:



où l'on peut retrouver l'alcool éthylique et l'acide carbamique. Le métabolisme de l'alcool éthylique dans le cerveau a été étudié par Posternak,<sup>2</sup> tandis que l'urée, proche de l'acide carbamique, a fait l'objet des recherches de Goldberg *et al.*<sup>3</sup> et Kleeman *et al.*<sup>4</sup> La première étape de notre étude est la mise en évidence d'une relation entre les taux d'anesthésique dans le sang, le liquide céphalo-rachidien et le cerveau et l'apparition des symptômes de l'anesthésie.

## METHODES

*Carbamate d'éthyle <sup>14</sup>C*

Le carbamate d'éthyle (ou uréthane) a été marqué au carbone 14 sur le carboxyle par Pichat et collaborateurs au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay.<sup>5</sup> Il nous a été livré en solution dans l'alcool absolu à la concentration de 1 mc/ml, avec une activité spécifique de 1,4 mc/mM. Les solutions à injecter sont préparées en dissolvant, après évaporation préalable de l'éthanol, l'uréthane <sup>14</sup>C dans une solution aqueuse d'uréthane non marqué de façon à obtenir des échantillons de titre pondéral et de concentration radioactive adaptés aux expériences. Les injections sont faites dans les muscles de la cuisse (biceps fémoral) chez le Rat et dans la veine de la queue chez la Souris.

*Autoradiographies*

Des Souris mâles de 16 à 20 g sont anesthésiées par injection intraveineuse, à la dose de 1,25 g/kg, d'une solution d'uréthane à 50% (16  $\mu$ c/ml) dans le soluté de chlorure de sodium à 9 p 1000.

Les animaux sont sacrifiés par congélation dans l'azote liquide 5 et 15 min après injection. Les autoradiographies sont préparées par apposition, à -30° pendant trois jours, d'un film Kodirex monocouche, sur la surface du bloc congelé constitué par le corps de la Souris tranché dans le sens sagittal. Une section de 20  $\mu$  d'épaisseur, collée sur un ruban adhésif d'acétate de cellulose est desséchée à -20 ° et sert de document de référence pour localiser la radioactivité au sein des organes. Ce procédé (Cohen et Wepierre<sup>6</sup>) permet l'étude du carbamate d'éthyle malgré sa volatilité.

*Mesure de la radioactivité dans le sang et le liquide céphalo-rachidien*

Le sang artériel des rats qui ont reçu une injection intramusculaire de 1,25 g/kg (50  $\mu$ c/kg) est prélevé, à des temps échelonnés, soit par ponction cardiaque, soit par section des carotides, soit encore par cathétérisme de l'artère brachiale de façon à ne pas interrompre la circulation dans le cerveau. Le sang veineux est prélevé au niveau de la jonction de la veine jugulaire interne et de la veine jugulaire externe à l'aide d'une canule placée dans cette dernière. Le sang dit "péphérique" est recueilli par incision de l'extrémité de la queue.

Le liquide céphalo-rachidien (L.C.R.) est ponctionné selon la technique de Agnew et al.<sup>7</sup> dans la région sous-occipitale.

Les échantillons de sang et de L.C.R. d'un poids voisin de 100 mg exactement pesés sont mis en contact pendant 48 h avec 2 ml d'alcool absolu qui extrait, ainsi que nous l'avons vérifié, toute la radioactivité. On ajoute ensuite 14 ml de liquide scintillant (di (phényloxazolyl-2) 5 benzol 1-4: 0,1 g, diphényl 2,5-oxazole: 4 g, toluène q.s.p. 1 l.). On filtre. La radioactivité est mesurée dans un scintillateur liquide Tracerlab L.S.C. 10 B.

*Mesure de la radioactivité dans le cerveau*

Après saignée des animaux, le cerveau des rats est prélevé, essuyé sur papier filtre et pesé. Il est ensuite homogénéisé dans 19 ml d'alcool absolu pour 1 g de tissu. Après 48 h de contact l'extrait alcoolique est filtré; 2 ml de filtrat (correspondant à 100 mg de matière cérébrale) sont additionnés de 13 ml de liquide scintillant puis portés au scintillateur Tracerlab L.S.C. 10 B.

### *Identification de l'uréthane $^{14}\text{C}$*

L'uréthane  $^{14}\text{C}$  a été identifié par chromatographie sur couche mince de Kieselguhr G non activé en utilisant l'acétate d'éthyle avec une durée de migration de 30 min et le mélange butanol tertiaire, méthyl éthyl cétone, acide formique et eau (40 : 30 : 15 : 15) avec une durée de migration de 60 min suivant les indications de Pichat et collaborateurs.<sup>5</sup> Les  $R_f$  de l'uréthane non marqué révélé par le réactif d'Ehrlich et de l'uréthane  $^{14}\text{C}$  mis en évidence par autoradiographie coincident et sont respectivement voisins de 0,6 avec l'acétate d'éthyle et de 0,85 avec le deuxième solvant.

Pour identifier la molécule marquée dans le cerveau, on a prélevé à cinq reprises cet organe qui a été homogénéisé et mis en contact avec de l'alcool absolu dans le rapport de 1/20, poids/volume. La solution alcoolique est évaporée sous vide. Le résidu est repris par quelques gouttes d'éthanol et déposé sur les plaques de chromatogrammes de Kieselguhr G.

Après séchage des chromatogrammes le support de gel de silice est divisé en six portions identiques entre le lieu de dépôt et le front du solvant. Le gel de chacune des surfaces ainsi délimitées est prélevé, élué avec 2 ml d'alcool absolu puis additionné de liquide scintillant et porté au scintillateur.

### *Expression des résultats*

La mesure de l'activité des dilutions alcooliques de la solution d'uréthane à injecter permet de connaître la teneur en carbone 14 dans les tissus analysés. Les résultats sont exprimés en taux d'uréthane car nous n'avons pas mis en évidence dans le cerveau d'autre molécules marquées que le carbamate d'éthyle.

La comparaison de la moyenne des résultats a été effectuée par l'analyse de variance et par le test F de Snedecor afin d'éliminer les variations individuelles importantes. Lorsque les comparaisons portent sur trois séries de mesure, après un traitement global de l'ensemble des résultats, les comparaisons individuelles entre chaque groupe ont été obtenues par analyse orthogonale (Lison<sup>8</sup>).

## RESULTATS

Nous étudierons chez le Rat les phases de l'anesthésie, auxquelles nous reliersons les concentrations d'uréthane dans le cerveau puis nous comparerons les taux d'uréthane dans le sang artériel, veineux et périphérique. Enfin nous observerons par autoradiographie la charge des organes en carbamate d'éthyle chez la Souris.

### *Phases de l'anesthésie*

Chez les trente cinq rats qui ont reçu l'anesthésique marqué par voie intramusculaire nous notons les progrès de l'anesthésie par les modifications graduelles du comportement; disparition progressive de l'activité spontanée, relâchement du tonus des muscles abdominaux, absence de réflexe d'évitement à un stimulus nociceptif et du réflexe oculopalpébral. Nous avons classé ces activités de la façon suivante:

- 1a. Coordination locomotrice : marche;
- 1b. Réflexe de redressement quand l'animal est mis sur le dos;
2. Mouvements spontanés de la tête;
3. Tonus musculaire abdominal, et
4. Réflexe d'évitement à un stimulus douloureux.

Elles disparaissent dans l'ordre que nous avons indiqué chez un même animal, mais à des temps légèrement variables d'un animal à l'autre à partir de l'injection de l'uréthane.

Ainsi la marche (activité 1a) disparaît chez certains animaux après 15 min tandis que chez d'autres il faut attendre 25 min. L'incoordination locomotrice atteint 100% des animaux à la vingt cinquième minute. Il en est de même pour la perte du réflexe de redressement.

Les mouvements spontanés de la tête et le tonus des muscles abdominaux sont supprimés chez tous les animaux à la quarantième minute, le réflexe d'évitement à la cinquante cinquième minute. La Fig. 1 schématise l'ensemble des observations

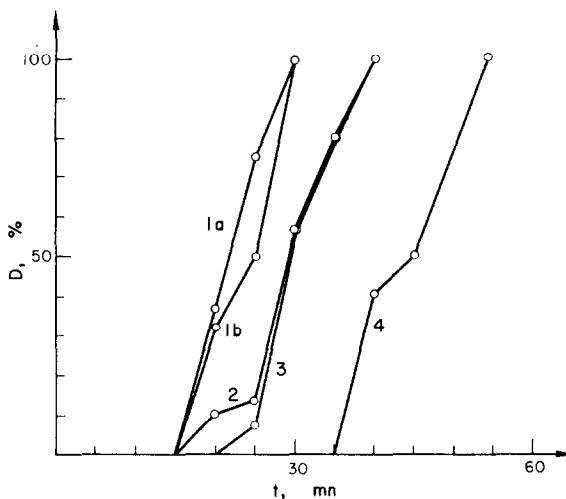


FIG. 1. Disparition des activités motrices chez le Rat soumis à une injection intramusculaire de 1,25 g/kg d'uréthane.

1a—coordination locomotrice, Marche; 1b—Réflexe de redressement quand l'animal est mis sur le dos; 2—Mouvements spontanés de la tête; 3—Tonus musculaire abdominal; 4—Réflexe d'évitement à un stimulus douloureux.

En ordonnées: pourcentage des animaux présentant la disparition de l'activité motrice. En abscisse: t—temps en min.

du comportement des rats et montre que les animaux ne présentent pas de signe objectif de veille après la 60<sup>ème</sup> minute.

On peut considérer que les quinze premières minutes après l'injection intramusculaire d'uréthane correspondent au temps de latence; viennent ensuite entre la 15<sup>ème</sup> et la 35<sup>ème</sup> min une phase de somnolence puis une phase de sommeil. Enfin de la 35<sup>ème</sup> min à la 55<sup>ème</sup> minute s'étend la phase d'induction de l'anesthésie.

L'anesthésie est confirmée (absence de réflexe oculo-palpébral) au delà de la cinquante cinquième minute et dure plus de cinq heures.

*Concentration de l'uréthane dans le sang arteriel, le cerveau et le liquide céphalo-rachidien*

Le dosage de l'uréthane <sup>14</sup>C dans le sang, le cerveau et le liquide céphalo-rachidien des rats dont le comportement a été rapporté ci-dessus montre que la diffusion de

l'anesthésique hors du point d'injection musculaire est régulière. Le taux d'uréthane est calculé en rapportant le nombre de dés/min dès échantillons biologiques à celui trouvé par unité de volume de la solution injectée. Le taux, croît rapidement dans le sang, le cerveau et le liquide céphalo-rachidien jusqu'à la 45<sup>ème</sup> minute puis reste relativement stable comme le montre la Fig. 2.

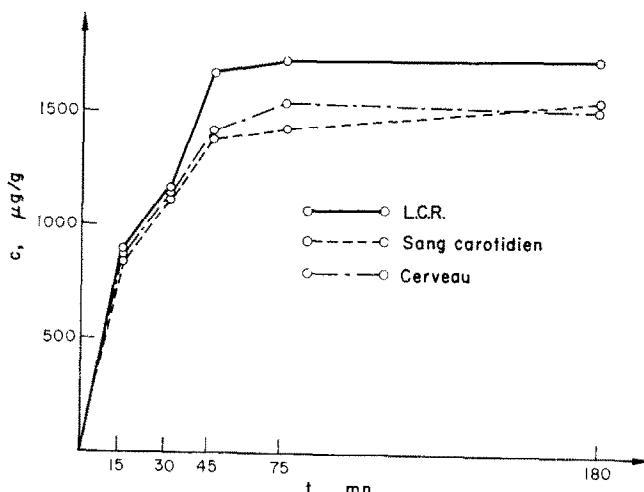


FIG. 2. Teneur du sang de la carotide, du cerveau et du liquide céphalo-rachidien en carbamate d'éthyle après injection intramusculaire à la dose de 1,25 g/kg.

En ordonnée: concentration d'uréthane en  $\mu\text{g/g}$  de tissu frais. En abscise:  $t$ —temps en min.

Lors de l'anesthésie confirmée on observe que la concentration d'uréthane est plus élevée dans le liquide céphalo-rachidien que dans le sang ou le cerveau. Le tableau 1

TABLEAU 1. CONCENTRATION MOYENNE DE L'URÉTHANE DANS LE SANG, LE CERVEAU ET LE LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN CHEZ LE RAT QUI A REÇU 1,25 g/kg DE CET ANESTHÉSIQUE PAR VOIE INTRA-MUSCULAIRE

Nombre de rats utilisés	Temps après l'injection (min)	Concentration d'uréthane en $\mu\text{g/g}$			Test de comparaison L.C.R., Cerveau et sang
		Sang artériel	Cerveau	L.C.R.	
8	15	859	890	896	différence non significative
11	30	1128	1158	1174	différence non significative
5	45	1396	1426	1688	$P < 0,05$
6	75	1448	1555	1731	$P < 0,01$
5	180	1567	1522	1748	$P < 0,01$

réunit les chiffres trouvés. La comparaison statistique des résultats révèle une différence significative entre les concentrations dans le liquide céphalo-rachidien d'une part et le sang artériel ou le cerveau d'autre part à partir de la 45<sup>ème</sup> minute. À ce moment, on trouve 1426  $\mu\text{g}$  d'uréthane par gramme de cerveau frais et 1688  $\mu\text{g/g}$  de liquide céphalo-rachidien.

Les chiffres ont peu varié à la 180<sup>ème</sup> minute pour le cerveau (1522  $\mu\text{g/g}$ ) alors qu'ils sont légèrement plus élevés pour le L.C.R. (1748  $\mu\text{g/g}$ ).

Pendant l'anesthésie confirmée la concentration d'uréthane dans le cerveau est de l'ordre de 1555  $\mu\text{g/g}$ .

Il est curieux de constater que le taux d'uréthane dans le sang et dans le cerveau sont très voisins. Nous avons voulu vérifier s'il y avait un appauvrissement du sang en carbamate d'éthyle pendant l'irrigation cérébrale.

#### *Concentration arterio-veineuse de l'urethane*

Sur un groupe de quatre rats nous avons suivi au cours du temps la concentration de l'uréthane dans le sang de la carotide, de la veine jugulaire interne et de la queue. L'installation des catheters dans l'artère brachiale gauche et dans la jugulaire externe a été faite à la faveur d'une légère anesthésie à l'éther. Lorsque les effets de l'éther commencent à disparaître on injecte en intramusculaire l'uréthane. La température des animaux est maintenue constante à  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  à l'aide d'un régulateur à thermistance (Rozé<sup>9</sup>). Nous avons ainsi pris la précaution de ne perturber l'irrigation cérébrale ni par obstruction des vaisseaux ni par variation de la température.

Comme le montre la Fig. 3 le sang de l'artère carotide est constamment plus riche en uréthane que le sang de la veine jugulaire, lui même plus riche que le sang périphérique de la queue.

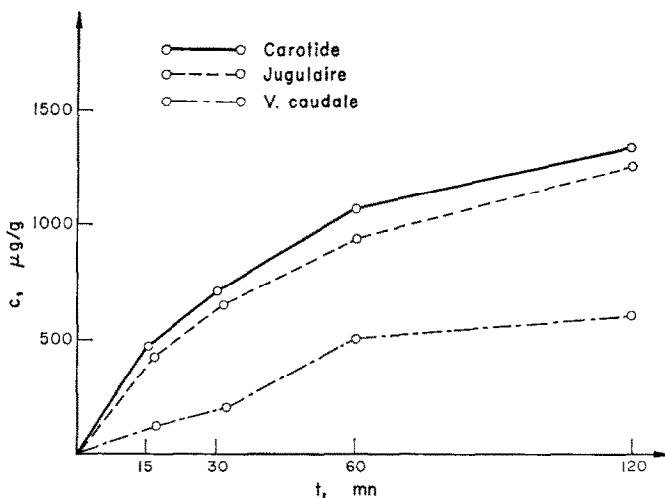


FIG. 3. Teneur moyenne du sang de la carotide, de la veine jugulaire et de la queue chez le Rat après injection intramusculaire de 1,25 g/kg d'uréthane.

En ordonnée: concentration d'uréthane en  $\mu\text{g/g}$  de tissu frais. En abscisse:  $t$ —temps en min.

Le taux de carbamate d'éthyle circulant augmente rapidement pendant la première heure, puis plus lentement entre la première et la deuxième heure. A ce moment la quantité d'anesthésique retrouvée dans le sang de la carotide est de 1330  $\mu\text{g/g}$ , de 1260  $\mu\text{g/g}$  dans le sang de la veine jugulaire et de 612  $\mu\text{g/g}$  dans le sang ponctionné à la queue pour une dose injectée de 1,25 g/kg (Tableau 2). Ces différences sont constamment significatives sauf pour le temps 2 h entre le sang carotidien et jugulaire.

Le sang périphérique au niveau de la queue est beaucoup moins riche que le sang de la jugulaire ou de la carotide. Nous avons pensé que cette particularité était dûe à une diffusion de l'uréthane dans les tissus et nous avons vérifié cette hypothèse par les expériences d'autoradiographie chez la Souris.

TABLEAU 2. CONCENTRATION MOYENNE DE L'ANESTHÉSIQUE DANS LE SANG DE L'ARTÈRE CAROTIDE, DE LA VEINE JUGULAIRE ET DE LA QUEUE CHEZ QUATRE RATS, APRES INJECTION INTRA-MUSCULAIRE DE 1,25 g/kg D'URÉTHANE  $^{14}\text{C}$

Temps de prélèvement après l'injection (min)	Uréthane en $\mu\text{g/g}$ dans le:			Comparaison A/B	Comparaison B/C
	sang de la carotide A	sang de la jugulaire B	sang de la queue C		
15	467	423	120	$P < 0,05$	$P < 0,01$
30	705	655	196	$P < 0,05$	$P < 0,01$
60	1067	948	504	$P < 0,01$	$P < 0,01$
120	1331	1261	612	différence non significative	$P < 0,01$

#### Autoradiographie de la souris

Les images de distribution du carbone 14 obtenues chez les six souris sacrifiées à 5 ou 15 min sont comparables. La Fig. 4 représente une autoradiographie obtenue à  $-30^\circ$  à partir d'une transection sagittale d'une souris tuée 15 min après administration intraveineuse de l'anesthésique. Le cerveau paraît être l'organe le plus riche en uréthane; la radioactivité est également distribuée entre le sang, le foie, les muscles,

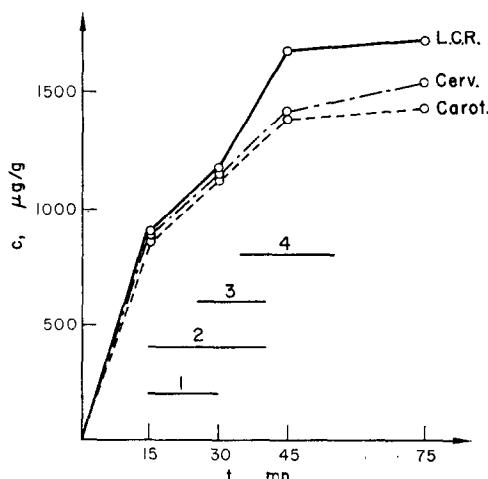


FIG. 5. Teneur du sang carotidien (carot.) et du cerveau (cerv.) et du liquide céphalorachidien (L.C.R.) en carbamate d'éthyle après injection intramusculaire de 1,25 g/kg chez le Rat.

En ordonnée: c—concentration d'uréthane en  $\mu\text{g/g}$  de tissu frais. En abscisse: t—temps en min.

1—Disparition de la coordination motrice (Marche) et du réflexe de redressement; 2—disparition des mouvements spontanés de la tête; 3—disparition du tonus musculaire abdominal; 4—disparition du réflexe d'évitement à un stimulus douloureux.

les poumons et les glandes salivaires; la graisse brune interscapulaire, la graisse intestinale sont peu radioactives.

Cette expérience souligne la diffusion très rapide du carbamate d'éthyle dans le cerveau et dans tout le corps d'une façon générale et attire l'attention sur l'imprégnation faible des tissus lipidiques de réserve.

### DISCUSSION

Nous avons entrepris ce travail afin de mettre en relation de façon directe l'effet d'une substance et sa localisation au niveau de l'effecteur.

Le choix du carbamate d'éthyle s'explique par le fait qu'il s'agit d'une molécule de formule chimique simple hydrosoluble et liposoluble : en effet 1 g d'uréthane se dissout dans 0,5 ml d'eau, 0,8 ml d'alcool éthylique, 0,9 ml de chloroforme et 32 ml d'huile d'olive.

La molécule marquée par un indicateur nucléaire se prête à une mesure rapide de sa concentration dans les tissus, à l'encontre de toute méthode chimique plus délicate à mettre en oeuvre. L'analyse chromatographique confirme l'identité de la substance radioactive dosée.

Si l'on compare l'induction de l'anesthésie à la concentration de carbamate d'éthyle trouvé dans le cerveau, le sang de la carotide et le liquide céphalo-rachidien, on constate que l'anesthésie est établie pour une concentration cérébrale de l'ordre de 1500  $\mu$ g d'uréthane par gramme de tissu frais La Fig. 5 illustre cette observation: Les activités motrices spontanées ou réflexes que nous avions numérotées de 1 à 4 disparaissent avec une progression parallèle à l'enrichissement du sang, du cerveau et du liquide céphalo-rachidien en carbamate d'éthyle. Nous avons pu rendre progressives les étapes de l'anesthésie par l'artifice du dépôt au sein d'une masse musculaire de l'uréthane qui diffuse de façon constante vers le sang tout au long de l'expérience.

L'intensité de l'envahissement du cerveau par l'uréthane paraît dépendre de la concentration de l'anesthésique dans le sang. Les autoradiographies de Souris ne montrent pas de différence dans la répartition dans les diverses structures cérébrales.

D'autre part il nous faut souligner que l'uréthane, qui a un coefficient de partage eau/huile égal à 64 en faveur de l'eau, pénètre dans le cerveau et diffuse dans le liquide céphalo-rachidien. Constitue-t-il une exception à la règle suivant laquelle le phénomène de barrière hématoencéphalique se manifeste de préférence à l'égard des substances hydrosolubles ? Les autoradiographies mettent en évidence le défaut de charge en uréthane des tissus lipidiques de réserve et le dépôt important dans le cerveau. Cette distinction pourrait s'expliquer par l'intensité inégale de l'irrigation sanguine des deux tissus.

La comparaison des concentrations d'uréthane dans le sang et le cerveau ne révèle aucune différence significative tandis qu'entre sang ou cerveau et liquide céphalo-rachidien la différence est significative.

Entre sang de la carotide et sang de la jugulaire la différence est significative sauf quand l'anesthésie est bien installée. La concentration dans le sang artériel est supérieure à la concentration dans le sang veineux qui draine la tête, ce qui s'explique si l'on admet que l'uréthane est retenu par le cerveau et le liquide céphalo-rachidien au cours de l'induction de l'anesthésie. Celle-ci étant installée, les différences tendent à s'estomper. Enfin le sang périphérique, prélevé par section de la queue provient

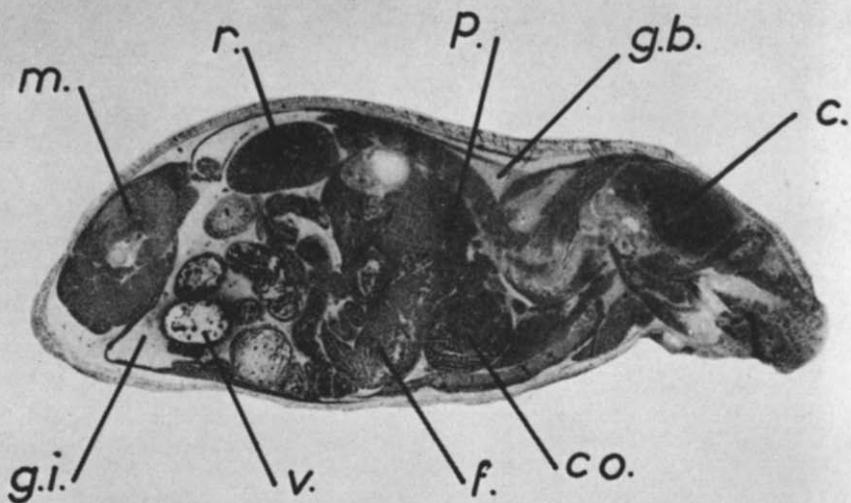


FIG. 4. Autoradiographie à  $-30^\circ$  du corps de la souris sectionné suivant un plan sagittal. Mort par immersion dans l'azote liquide 15 min après injection intraveineuse de 1,25 g/kg d'uréthane  $^{14}\text{C}$  ( $400 \mu\text{c}/\text{kg}$ ).

c—Cerveau; co—cavité cardiaque; f—foie; g.b.—grasse brune interscapulaire; g.i.—grasse intestinale; m—muscles; p—poumons; r—rein; v— vessie.

probablement autant de l'artère que des veines caudales. Il est beaucoup moins riche en uréthane que le sang de l'artère carotide ou de la veine jugulaire. Il est permis d'attribuer ce phénomène à une diffusion de l'uréthane hors du compartiment vasculaire, vers la masse musculaire et viscérale.

### RÉSUMÉ

Nous avons étudié les relations qui existent entre les phases de l'anesthésie à l'uréthane (carbamate d'éthyle) et l'accumulation de cette substance dans le système nerveux central du Rat. Les phases de l'anesthésie ont été définies en fonction de critères de motricité, la concentration de l'anesthésique a été mesurée grâce à l'emploi d'uréthane marqué au carbone 14 sur le carboxyle. Malgré un coefficient de partage eau/huile de 64 en faveur de l'eau, le carbamate diffuse très rapidement dans le cerveau et le liquide céphalo-rachidien. Les teneurs dans le cerveau, le sang de la carotide et le L.C.R. sont identiques pendant les phases d'induction de l'anesthésie. Elles diffèrent et atteignent un plateau au moment de l'anesthésie (environ 1500  $\mu\text{g/g}$  de tissus frais dans le sang et le cerveau, 1700  $\mu\text{g/g}$  dans le L.C.R.). Le sang des gros troncs de la tête, carotide et jugulaire est plus riche que le sang périphérique prélevé à la queue.

Des autoradiographies de Souris entières montrent une radioactivité importante, uniformément répartie dans le cerveau, plus faible dans le sang, le foie, les muscles, les poumons et les glandes salivaires, encore moins accentuée dans les graisses de réserve.

### BIBLIOGRAPHIE

1. E. BOYLAND et R. NERY, *Biochem. J.* **94**, 198 (1965).
2. J. M. POSTERNAK, *Bull. Acad. Suisse Sci. Med.* **18**, 253 (1962).
3. M. A. GOLDBERG, C. F. BARLOW et L. J. ROTH, *J. Pharmac.* **131**, 308 (1961).
4. C. R. KLEEMAN, H. DAVSON et E. LEVIN, *Am. J. Physiol.* **203**, 739 (1962).
5. L. PICHAT, C. BARET et M. M. LEBRE, Communication personnelle (1966).
6. Y. COHEN et J. WEPIERRE, Rapport C.E.A.—Saclay No. 2171 (1961).
7. W. F. AGNEW et G. D. STROMER, *J. appl. Physiol.* **17**, 848 (1962).
8. L. LISON, *Statistique Appliquée à la Biologie Expérimentale*, p. 85. Gauthier Villars, Paris (1958).
9. C. ROZÉ, *Prod. Prob. Pharmac.* **19**, 347 (1964).