

ETUDE DU RÉCEPTEUR CYTOPLASMIQUE DE LA (1,2-³H) TESTOSTÉRONE DANS L'HYPOPHYSE ANTÉRIEURE ET L'HYPOTHALAMUS DU RAT

P. JOUAN, S. SAMPEREZ, M.-L. THIEULANT et L. MERCIER

Laboratoire de Neurobiologie Moléculaire, Equipe associée au C.N.R.S. N° 119. U.E.R. Sciences Biologiques, Av. du Général Leclerc - .35 - Rennes, France

(Received 22 February 1971)

SUMMARY

The anterior pituitary and the hypothalamus of the normal and castrated rat contain soluble receptors for testosterone, present in the 105.000 g supernatants. The capacity of macromolecular fixation of testosterone is greater in anterior hypophysis than in hypothalamus.

Raising the incubation temperature of slices and of homogenates results in a decrease of the binding capacity of testosterone. These receptors are macromolecules whose molecular weight most likely exceeds 100.000 and whose nature is, at least in part, protein.

The bound radioactive material consists partly of testosterone and partly of an unidentified steroid (Compound X). Dihydrotestosterone and 4-androstene-3,17-dione are minor constituents.

INTRODUCTION

LE RÔLE du complexe hypothalamo-hypophysaire dans le contrôle de la sécrétion des hormones sexuelles est désormais bien établi[1-4]. Divers groupes de chercheurs ont, d'ailleurs, démontré une accumulation et une rétention de l'oestradiol dans l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus[5-12]. De notre côté, nous avons étudié les modalités de la pénétration et de l'accumulation *in vivo* et *in vitro* de la (1,2-³H) testostérone dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cerveau du rat normal ou castré[13, 14]. Récemment, nous avons mis en évidence la présence d'une association macromoléculaire de la testostérone dans ces organes de la régulation de l'hormonogénèse[15]. Poursuivant nos travaux sur le mécanisme d'action de la testostérone au niveau du complexe hypothalamo-hypophysaire, nous avons étudié quelques caractéristiques du 'récepteur' cytoplasmique hypophysaire et hypothalamique de cet androgène.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel biologique. Toutes les expériences ont été effectuées avec des rats mâles et adultes de souche Wistar (Élevage Janvier-53-Le Genest). Les animaux ont été sacrifiés par décapitation, sans anesthésie au moyen d'une guillotine (Havard Apparatus).

[³H] *Testostérone.* La (1,2-³H) testostérone fournie par le CEN (Belgique) a une activité spécifique de 42 Ci par mmol. La solution d'origine: benzène-éthanol (90:10) est évaporée à sec sous vide. Le résidu est repris par une quantité aliquote d'éthanol à 95°. Cette solution mère est, ensuite, diluée soit par du milieu tampon-phosphate 0,05 M pour les incubations *in vitro*, soit par du sérum physiologique pour les injections I.C.

La pureté de la (1,2-³H) testostérone, testée par chromatographie sur papier dans le système de Kochakian et Stidworthy[17], est de 99,1%.

Injections intra-carotidiennes (I.C.). Elles sont faites dans la carotide primitive, après dénudation de l'artère, et au moyen d'un cathéter épicroânien, les rats étant préalablement anesthésiés par injection intra-péritonéale d'une solution de Nembutal. Chaque rat reçoit une injection de 50 μ l d'une solution de [3 H] testostérone obtenue par dilution d'une solution-mère éthanolique dans du sérum physiologique. Il est sacrifié par décapitation 5 min après l'injection.

Préparation des tissus et méthode d'incubation

Après décapitation, les hypophyses antérieures et les hypothalamus sont rapidement prélevés et pesés. Quatre à six organes sont utilisés à chaque expérience.

Homogénats. Les tissus sont homogénéisés à l'aide d'un appareil de Potter, dans 3 ml d'une solution tampon-phosphate 0,05 M, de pH 7,4. Après filtration sur gaze, les homogénats sont mis à incuber en présence de (1,2- 3 H) testostérone et d'O₂. Ils sont, ensuite, centrifugés à 800 g et à 0°C et les surnageants sont soumis à une gel-filtration sur colonne de Sephadex G 25-tampon-phosphate 0,05 M.

Coupes. Quatre hypothalamus et quatre hypophyses antérieures coupés en tranches minces sont placés en incubation dans 3 ml de solution de Krebs renfermant une quantité déterminée de [3 H] testostérone. Les incubations sont effectuées en atmosphère d'O₂, sous agitation constante, à des températures et des temps variables suivant les expériences. A la fin de la période d'incubation, les coupes sont extraites du milieu de survie, rincées avec du liquide de Krebs et broyées au Potter. L'homogénat est centrifugé à 800 g à 0°C et le surnageant est filtré sur colonne de gel de Sephadex G 25-tampon-phosphate 0,05 M.

Cytosols. Quatre hypophyses antérieures et hypothalamus sont homogénéisés dans une solution tampon-phosphate 0,05 M. Après une première centrifugation à 800 g, le surnageant est soumis à une seconde centrifugation à 105.000 g pendant 1 h, dans le rotor S W 50 d'une centrifugeuse L₄ Beckman. Après incubation en présence de [3 H] testostérone, le cytosol est analysé par chromatographie sur gels de Sephadex G 25-tampon phosphate 0,05 M, de Sephadex G 100 ou de Sepharose 6 B.

Des cytosols ont été préparés de la même manière à partir d'organes de rat ayant reçu une injection intra-carotidienne et de coupes préalablement incubées en présence d'hormone tritiée selon le protocole indiqué ci-dessus.

Chromatographies sur gels de Sephadex

Sephadex G 25. Les extraits hypophysaires et hypothalamiques sont fractionnés sur des colonnes de gel de Sephadex G 25 équilibré dans la solution tampon-phosphate 0,05 M, de pH 7,4. Les colonnes renfermant 5 g de gel ont une hauteur de 27 cm et un diamètre de 0,9 cm. Le volume d'exclusion mesuré par passage d'une solution de Bleu dextran 2000 est de 6 ml. La testostérone 'liée' est éluée entre le 6^{ème} et le 12^{ème} ml, l'hormone libre entre le 18^{ème} et le 30^{ème} ml. Le débit est de 30 ml/h.

Les éluations sont réalisées à l'aide de la solution tampon-phosphate 0,05 M. Les éluats sont collectés par fractions de 2 ml sur lesquelles sont dosées les protéines et la radioactivité.

Sephadex G 100. Nous avons utilisé des colonnes de 38 cm de hauteur et de 2,5 cm de diamètre renfermant 20 g de gel préparé dans la solution tampon-phos-

phate 0,05 M. Leur volume d'exclusion est de 51 ml, leur débit de 19 ml par heure et la testostérone 'libre' est recueillie entre le 180^{ème} et le 200^{ème} ml.

Sepharose 6 B. Les colonnes utilisées sont identiques aux précédentes. Elles renferment 250 ml de gel de Sepharose 6 B équilibré dans la solution tampon phosphate 0,05 M. Le volume d'exclusion est de 55 ml et la testostérone 'libre' est recueillie à partir du 200^{ème} ml.

Toutes les gel-filtrations ont été effectuées à +8°C. Les différents types de gel ont été fournis par Pharmacia Uppsala (Suède).

Expériences de compétition. Elles ont été faites sur des cytosols d'hypophyse antérieure et d'hypothalamus incubés à 25°C, pendant 30 min, en présence de 1×10^{-11} M (0,4 μ Ci) de [³H] testostérone par mg de protéines et des stéroïdes compétiteurs à la même dose. Les cytosols témoins et ceux renfermant le stéroïde compétiteur ont été, ensuite, filtrés sur colonne de gel de Sephadex G 25-tampon-phosphate 0,05 M. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité 'liée' dans l'essai par rapport à la quantité de la radioactivité 'liée' dans le témoin.

Caractérisation des stéroïdes. L'étude de la nature de l'androgène 'liée' à été entreprise après incubation de cytosol d'hypophyse antérieure de d'hypothalamus en présence de [³H] testostérone. La radioactivité 'liée' est isolée par filtration sur gel de Sephadex G 25-tampon-phosphate 0,05 M et les stéroïdes sont extraits par la méthode de Folch. *et al.*[16]. Après addition aux extraits de 20 μ g de testostérone, de dihydrotestostérone, d'androstaniol; d'androstaniolone et d'androstaniolone*, comme étalons internes, les stéroïdes sont séparés par chromatographie descendante sur papier Whatman n° 2 découpé en bandelettes de 3 cm de largeur dans le système de Kochakian et Stidworthy, à 30°C. (Papier Whatman n° 2 imprégné de propylène glycol-méthanol (1 : 1), solvants : benzène-cyclohexane (1 : 1) saturés en propylène glycol [17].

Les stéroïdes témoins sont révélés par le réactif de Zimmerman au 2,4-dinitrobenzène [18] ou repérés, pour certains d'entre eux, par examen des chromatogrammes à 240 m μ . Les bandelettes sont ensuite découpées cm par cm et la radioactivité mesurée par comptage en scintillation liquide.

Méthodes de dosage

Protéines. Elles sont dosées par la technique de Lowry *et al.*[19] en utilisant une solution de sérum-albumine de boeuf comme substance de référence.

Acide désoxyribonucléique (ADN). Il a été dosé par la technique colorimétrique de Ceriotti [20].

Radioactivité. La radioactivité en milieu aqueux a été comptée en scintillation liquide après addition du mélange de Bray [20]. La radioactivité des chromatogrammes est mesurée après découpage en bandelettes de 1 cm de largeur et immersion dans 10 ml du mélange : PPO 5 g, diméthyl POPOP 0,1 g, toluène 1000 ml. Les comptages sont effectués à l'aide d'un compteur Marck I (Nuclear Chicago). Les corrections de quenching sont faites suivant la méthode du rapport des canaux avec standard externe. Le rendement moyen est de 30% pour le tritium dans nos conditions expérimentales.

*Noms communs utilisés. Testostérone : 17 β -hydroxy-4-androstène-3-one, Androstaniolone : 4-androstène-3,17-dione, androstaniolone : 5 α -androstane-3,17-dione, androstaniol : 5 α -androstane-3,17-diol, dihydrotestostérone : 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one.

RÉSULTATS

(1) Mise en évidence d'une association macromoléculaire de la $[1,2-^3\text{H}]$ testostérone

(a) *In vitro*. La filtration sur gel de Sephadex G 25 de surnageants 800 g, obtenus après centrifugation d'homogénats préparés à partir de coupes d'hypophyses et d'hypothalamus incubés en présence d'hormone tritiée permet la mise en évidence d'une association macromoléculaire de l'androgène (Fig. 1). La quantité d'hormone liée est, en moyenne, de $1,5 \times 10^{-14}\text{M}$ par mg de protéines hypophysaires et de $3,6 \times 10^{-15}\text{M}$ par mg de protéines hypothalamiques (moyenne de 4 expériences effectuées chacune avec 4 rats).

La présence d'un 'récepteur' cytoplasmique soluble a été démontrée par chromatographie sur gel de Sephadex G 25 de surnageants 105.000 g préparés à partir de coupes d'hypophyses et d'hypothalamus incubées en présence de $[^3\text{H}]$ testostérone. Le passage simultané des protéines et d'une partie de la radioactivité

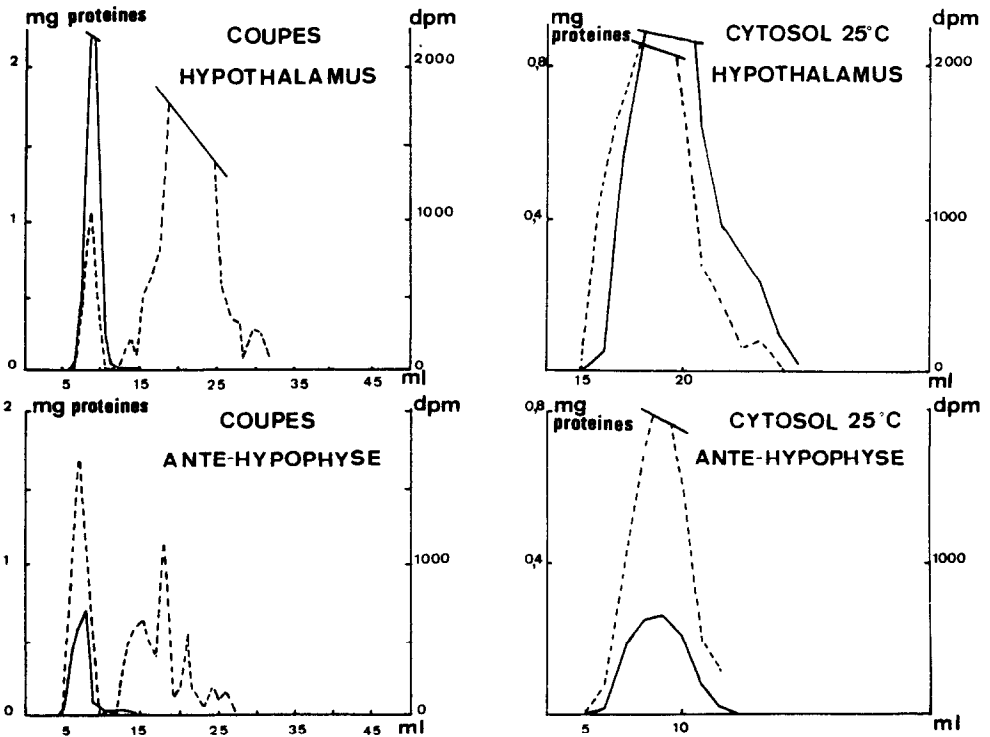


Fig. 1. Séparation par filtration sur gel de Sephadex G 25 de la testostérone liée et libre présente dans des surnageants 800 g et des cytosols d'hypophyse et d'hypothalamus.

Après incubation de coupes de 4 hypophyses et 4 hypothalamus à 25°C, pendant 30 min, dans 3 ml de solution de Krebs renfermant $4 \times 10^{-11}\text{M}$ de $[^3\text{H}]$ testostérone (1,6 μCi). Après centrifugation à 800 g, les surnageants ont été filtrés sur colonne de Sephadex G 25-tampon phosphate 0,05 M.

Après incubation de cytosols, obtenus à partir de 4 hypophyses et 4 hypothalamus, pendant 30 min, à 25°C, dans 3 ml de solution tampon phosphate 0,05 M contenant $9 \times 10^{-12}\text{M}$ de $[^3\text{H}]$ testostérone par mg de protéines (0,37 μCi). Les cytosols hypophysaires ont été filtrés sur des colonnes de 5 g de gel de Sephadex G 25, ceux de l'hypothalamus sur des colonnes de 10 g de gel (volume d'exclusion 10 ml).

En trait plein: élution des protéines, en trait pointillé: élution de la radioactivité.

permet de penser qu'il s'agit d'une association macromoléculaire soluble. Le taux d'hormone liée est de 4×10^{-14} M par mg de protéines d'hypophyse et de $3,2 \times 10^{-15}$ M par mg de protéines d'hypothalamus.

L'existence d'un 'récepteur' cytoplasmique soluble dans l'hypophyse et l'hypothalamus a été confirmée par filtration sur gel de Sephadex G 25 de cytosols incubés en présence de $[^3\text{H}]$ testostérone (Fig. 1). L'incubation des cytosols avec l'hormone assure, en outre, une augmentation de la capacité de fixation des 'protéines réceptrices', puisque 7×10^{-14} M de testostérone sont liées par mg de protéines d'hypophyse et $1,7 \times 10^{-14}$ M par mg de protéines hypothalamiques (moyenne de 4 expériences portant chacune sur 4 rats).

(b) *In vivo*. La présence de 'récepteurs' de la testostérone dans le cytoplasme de l'hypophyse antérieure et de l'hypothalamus a été confirmée après injection intra-carotidienne de $[^3\text{H}]$ testostérone. La filtration sur gel de Sephadex G 25 permet, à nouveau, d'identifier, dans la fraction exclue, une similitude de passage entre les protéines et la radioactivité (Fig. 2). La quantité totale de radioactivité captée par organe est faible. Elle ne représente pas plus de 0,006% de la dose injectée. L'activité spécifique du 'récepteur' hypophysaire est, en moyenne, de

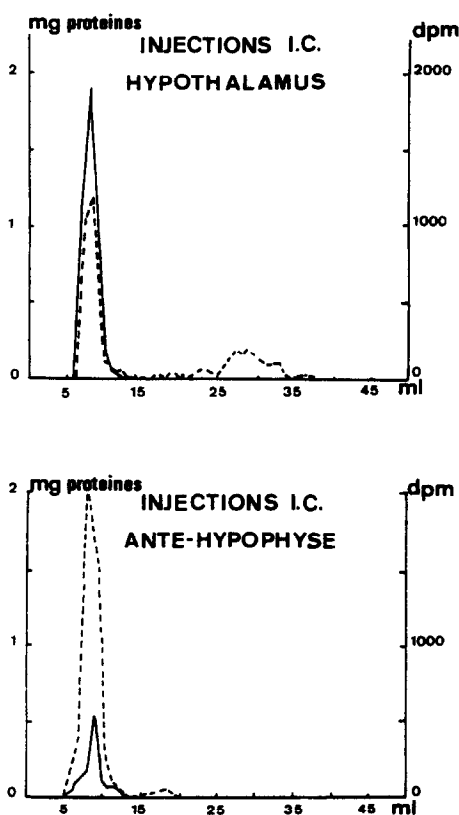


Fig. 2. Mise en évidence d'une association macromoléculaire de la $[^3\text{H}]$ testostérone dans des cytosols hypophysaires et hypothalamiques après injection de l'hormone.

Filtration sur gel de Sephadex G 25 tampon phosphate 0,05 M de cytosols préparés à partir de lots de 8 hypophyses et 8 hypothalamus, après injection inter-carotidienne à chaque rat de 2×10^{-10} M ($8,4 \mu\text{Ci}$) de $[^3\text{H}]$ testostérone.

4×10^{-14} M par mg de protéine, celle du 'récepteur' de l'hypothalamus est de $0,5 \times 10^{-14}$ M.

(2) *Variations de l'association macromoléculaire de l'androgène*

(a) *Effets de la température d'incubation.* L'incubation d'homogénats d'hypophyses antérieures et d'hypothalamus, pendant 30 min, à 37°C, 25°C et 5°C en présence de [³H]testostérone montre que le taux de l'association macromoléculaire décroît avec l'élévation de la température (Fig. 3). Pour les hypophyses antérieures, le taux d'androgène lié par mg de protéines est de 2×10^{-13} M, $1,9 \times 10^{-13}$ M et de 1×10^{-13} M, respectivement à 5°C, 25°C et 37°C. En ce qui concerne les hypothalamus, la quantité d'androgène lié par mg de protéines est de $1,3 \times 10^{-13}$ M à 5°C, $0,5 \times 10^{-13}$ M à 25°C et de $0,5 \times 10^{-13}$ M à 37°C.

Des résultats similaires ont été obtenus après incubation de coupes d'hypophyses et d'hypothalamus, pendant 30 min, à des températures identiques aux précédentes (Fig. 3). Dans le cas de l'hypothalamus, on observe une augmentation du taux d'androgène lié au cours d'abaissement de la température du milieu d'incubation. La teneur en radioactivité liée aux protéines est de $0,28 \times 10^{-13}$ M à 37°C, $0,37 \times 10^{-13}$ M à 25°C et de $0,80 \times 10^{-13}$ M à 5°C.

Les résultats obtenus avec les coupes d'hypophyses sont quelque peu différents, la quantité d'hormone fixée aux protéines étant de $2,5 \times 10^{-13}$ M à 37°C, $0,65 \times 10^{-13}$ M à 25°C et $0,9 \times 10^{-13}$ M à 5°C.

(b) *Effets de la durée des incubations.* Les taux d'androgène lié ont été mesurés après incubation de coupes d'hypophyses antérieures et d'hypothalamus pendant 30, 60, 90 et 120 min. Pour ce dernier organe, la teneur en testostérone liée croît avec l'allongement de la durée des incubations. Elle est de $0,4 \times 10^{-13}$ M

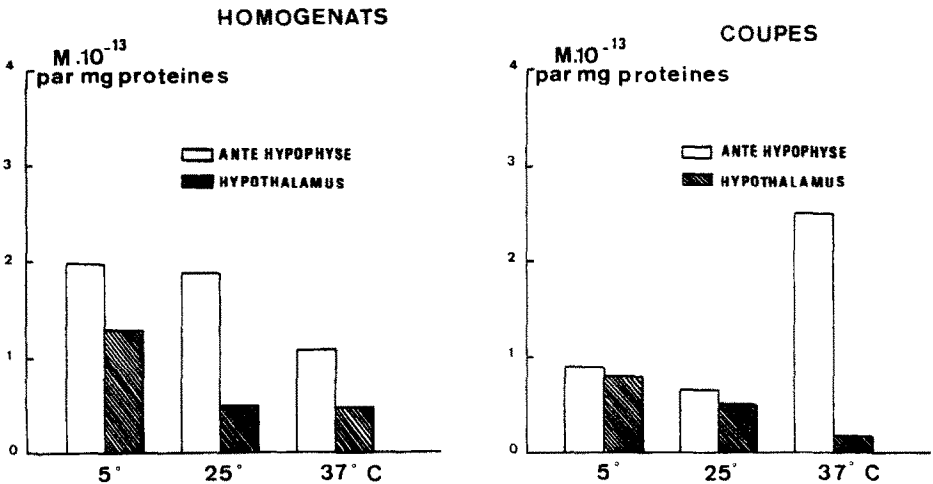


Fig. 3. Effets de la température d'incubation des homogénats et des coupes d'hypophyses antérieures et d'hypothalamus sur le taux de [³H]testostérone liée.

Les homogénats provenant de 4 hypophyses et de 4 hypothalamus ont été incubés dans 3 ml de solution-tampon phosphate 0,05 M, pendant 30 min, à 37°C, 25°C et 5°C, en présence de $1,1 \times 10^{-10}$ M de [³H]testostérone (4,6 μ Ci). Après centrifugation à 800 g, les surnageants ont été filtrés sur gel de Sephadex G 25-tampon phosphate 0,05 M.

Les coupes d'organes ont été incubées pendant 30 min, dans 3 ml de liquide de Krebs renfermant 1×10^{-10} M de [³H]testostérone (4,2 μ Ci).

par mg de protéine après 30 min, $0,3 \times 10^{-13}$ M après 60 min, $0,7 \times 10^{-13}$ M après 90 min et $1,4 \times 10^{-13}$ M après 120 min (Fig. 4).

Le comportement du 'récepteur' hypophysaire est différent puisque la quantité d'androgène lié par mg de protéines est de $2,0 \times 10^{-13}$ M et de $2,1 \times 10^{-13}$ M après 30 et 60 min. Elle est identique ($3,0 \times 10^{-13}$ M) après 90 et 120 min d'incubation.

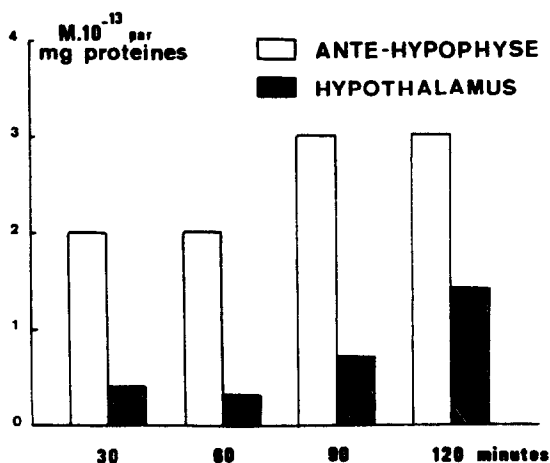


Fig. 4. Variations du taux de la [³H]testostérone liée en fonction de la durée des incubations de coupes d'hypophyses et d'hypothalamus.

Les coupes de 4 hypophyses et 4 hypothalamus ont été incubées à 37°C, pendant 30, 60, 90 et 120 min, dans 3 ml de liquide de Krebs renfermant $1,2 \times 10^{-10}$ M (5 μ Ci) de [³H]testostérone. Après homogénéisation, puis centrifugation à 800 g, les surnageants ont été filtrés sur gel de Sephadex G 25-tampon-phosphate.

(3) Etude de la spécificité des 'récepteurs' hypophysaire et hypothalamique

La spécificité des récepteurs a été étudiée par incubation de cytosols hypophysaires et hypothalamiques en présence de [³H]testostérone et de stéroïdes non radioactifs. Les résultats ont été rassemblés dans le Tableau 1. Ils indiquent clairement que l'hypophyse antérieure contient un 'récepteur' cytoplasmique spécifique de la testostérone. Seule, en effet, l'hormone mâle diminue de 30% la fixation de la [³H]testostérone. Les autres stéroïdes testés sont sans effet.

Le 'récepteur' cytoplasmique de l'hypothalamus ne semble pas présenter une spécificité aussi étroite que celui de l'hypophyse, l'androstènedione et la dihydrotestostérone modifiant partiellement la capacité de fixation du récepteur vis à vis de la testostérone.

(4) Etude du comportement des 'récepteurs' hypophysaire et hypothalamique de la testostérone sur gel de Sephadex G 100 et Sépharose 6 B

Des cytosols obtenus après incubation de coupes d'hypophyses et d'hypothalamus, en présence de [³H]testostérone, et des cytosols incubés en présence de l'androgène radioactif ont été soumis à des chromatographies sur gel de Sephadex G 100 et Sépharose 6 B.

Sur Sephadex G 100, les protéines du cytosol hypophysaire sont éluées en deux fractions principales. La première est exclue du gel, elle est recueillie entre le 48ème et le 88ème ml, son maximum étant situé au 56ème ml. La seconde est

Tableau 1. Effet de compétition de quelques stéroïdes sur la fixation de la [³H]testostérone aux récepteurs cytoplasmiques de l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus. Incubation des cytosols-témoins, 30 min. à 25°C, en présence de 1×10^{-11} M de [³H]testostérone (0,4 μ Ci) par mg de protéines, et des cytosols-essais en présence de 1×10^{-11} M de [³H]testostérone (0,4 μ Ci) et de 1×10^{-11} M de stéroïde compétiteur. A la fin de l'incubation, les cytosols ont été filtrés sur gel de Sephadex G 25—tampon-phosphate 0,05 M, et la radioactivité de la fraction exclue déterminée

Stéroïde froid	Variations en % du taux de [³ H]testostérone liée aux récepteurs cytoplasmiques	
	Hypophyse	Hypothalamus
Testostérone	-30%	-12%
Dihydrotestostérone	+3%	-28%
Androstène-3,17-dione	+12%	-10%
17 β -oestradiol	+6%	+3%

éluée plus tardivement du 88ème ml au 128ème ml. La radioactivité liée est obtenue du 48ème au 64ème ml (Fig. 5).

La filtration sur Sephadex G 100 des protéines du cytosol hypothalamique, les sépare en trois fractions, dont les maxima sont situés respectivement aux 66ème, 82ème et 104ème ml (Fig. 5). La testostérone liée est éluée entre le 50ème et le 74ème ml (Fig. 5).

Dans les deux cas, hypophyse et hypothalamus, les récepteurs cytoplasmiques de la testostérone sont exclus des gels de Sephadex G 100.

Les résultats obtenus avec des colonnes de Sepharose 6 B sont moins nets. Il semblerait néanmoins que le récepteur cytoplasmique de l'hypothalamus soit moins retenu sur le gel que celui de l'hypophyse (Fig. 6).

(5) Répartition de la radioactivité entre culots et surnageants 800 g

L'étude de la répartition entre sédiments 800 g et surnageants 800 g obtenus après incubation d'homogénats ou de coupes d'hypophyses et d'hypothalamus est intéressante à noter. En effet, quelles que soient la température des incubations et leur durée, nous avons toujours constaté que les culots 800 g d'origine hypothalamique renferment plus de radioactivité que les surnageants correspondants (Fig. 7). Après incubation de coupes d'hypothalamus à 25°C pendant 30 min, le pourcentage de captation pour 100 mg de cet organe est, en moyenne, de 4,33% pour les surnageants 800 g, de 5,5% pour les culots 800 g et 3,35% pour les cytosols. La radioactivité des culots 800 g représente 56% de la radioactivité totale captée par les coupes. On observe une phénomène inverse pour les hypophyses (Fig. 7). Le calcul du taux d'androgène capté par 100 mg de tissu montre, qu'en moyenne 15% de la radioactivité sont retrouvés dans les surnageants 800 g, 12,5% dans le cytosol et 2,8% seulement dans le culot 800 g. Celui-ci ne renferme que 15% du tritium intra-hypophysaire. Il existe, donc, entre ces deux organes des différences fondamentales dans la répartition intracellulaire de l'androgène.

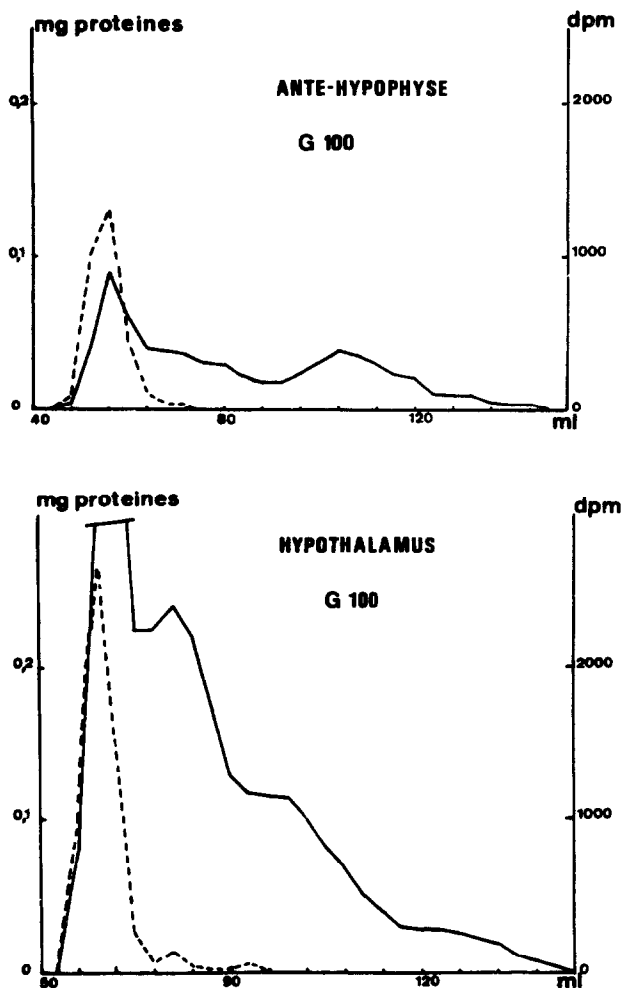


Fig. 5. Filtration sur gel de Sephadex G 100-tampon-phosphate 0,05 M du récepteur cytoplasmique hypophysaire et hypothalamique de la $[^3\text{H}]$ testostérone.

Après incubation de cytosols hypophysaires et hypothalamiques à 25°C, pendant 30 min en présence de $0,9 \times 10^{-11}$ M ($0,37 \mu\text{Ci}$) de $[^3\text{H}]$ testostérone, ceux-ci ont été filtrés sur colonne de Sephadex G 25-tampon phosphate 0,05 M. La fraction exclue a été, ensuite, soumise à une chromatographie sur gel de Sephadex G 100 dans le tampon phosphate 0,05 M.

Dans nos conditions expérimentales, la quasi totalité des noyaux de l'hypophyse et de l'hypothalamus se trouve dans les culots 800 g. Les dosages de l'ADN effectués sur ces derniers nous ont, en effet, montré que 90% de l'acide désoxyribonucléique sont dans le culot 800 g hypophysaire et 96% dans le culot 800 g hypothalamique (Fig. 7).

(6) Etude de la nature de l'androgène lié aux 'récepteurs' cytoplasmiques de l'hypophyse et de l'hypothalamus

Afin de déterminer la nature de l'androgène lié, des incubations de cytosols hypophysaires et hypothalamiques ont été réalisées à 25°C, pendant des temps variables, en présence de $[^3\text{H}]$ testostérone. Après passage sur gel de Sephadex

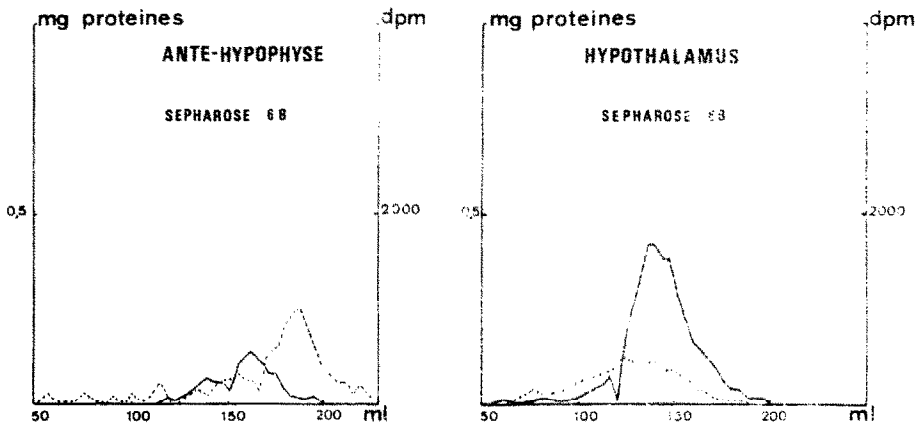


Fig. 6. Chromatographie sur gel de Sepharose 6 B des récepteurs hypophysaires et hypothalamiques présents dans les cytosols de ces organes.

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles indiquées dans la légende de la Fig. 5.

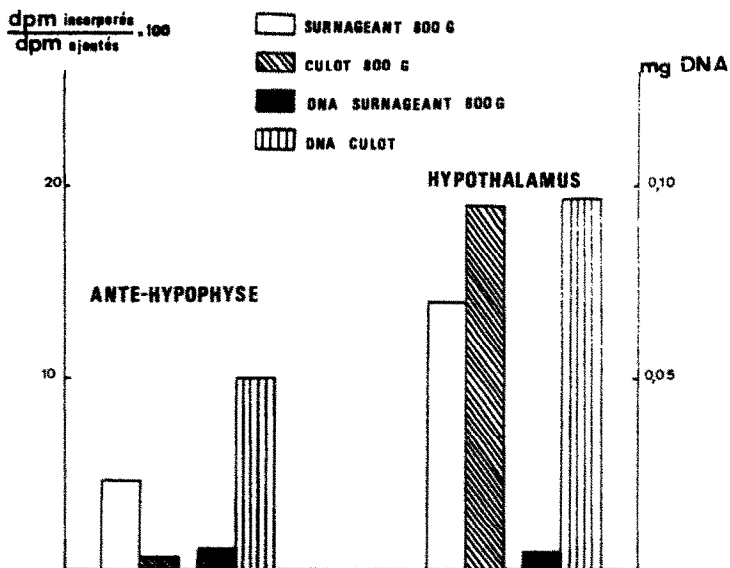


Fig. 7. Répartition de la radioactivité entre surnageants 800 g et culots 800 g obtenus après incubation de coupes d'hypothalamus et d'hypophyses antérieures en présence de la [^3H]testostérone.

G 25, la radioactivité liée a été extraite par la méthode de Folch *et al.*[16] et les stéroïdes séparés par chromatographie de 5 h dans le système de Kochakian et Stidworthy. Dans celui-ci, l'androstenediol a un R_F de 0,10, la testostérone de 0,22, la dihydrotestostérone de 0,40, l'androstènedione de 0,65 et l'androstane-dione de 0,80.

Ce système de solvants nous a permis de constater l'hétérogénéité des androgènes liés, tant dans l'hypophyse que dans l'hypothalamus, puisque nous avons constaté la présence d'androstènedione, de dihydrotestostérone, de testostérone

et d'un composé X non identifié. Les deux premiers stéroïdes représentent moins de 10% de la radioactivité totale des chromatogrammes. Par contre, il est surprenant de constater qu'après 60 min d'incubations à 25°C de cytosols hypophysaires, la testostérone ne constitue que 28% en moyenne de la radioactivité liée tandis que le stéroïde X représente 59%. Des résultats analogues ont été obtenus avec des cytosols hypothalamiques incubés dans les mêmes conditions, l'hormone mâle représentant 20% de la radioactivité totale des chromatogrammes et le composé X, 56%.

La nature du dérivé X nous est encore inconnue. Si dans le système de solvants de Kochakian et Stidworthy son R_F est identique à celui de l'androstanedione, il est différent après une chromatographie de 3 h 30 sur papier Whatman n° 2 dans le mélange: méthanol, eau, hexane (9.1.10)[31]. Il s'agit, en tout cas, d'un composé peu polaire.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La filtration sur gel de Sephadex G 25-tampon-phosphate 0.05 M de sur-nageants 800 g préparés après incubation d'homogénats totaux ou de coupes d'hypophyses et d'hypothalamus nous a permis de mettre en évidence une association macromoléculaire de la [^3H]testostérone. Nous avons, en effet, observé, dans tous les cas, un passage simultané de la radioactivité et des protéines exclues du gel. Cette coïncidence laisse à penser, qu'une partie de l'androgène intra-cellulaire est liée à une molécule de nature vraisemblablement protéique.

Cette association androgène-macromolécule a, en outre, été mise en évidence soit dans des cytosols obtenus après incubation de coupes, soit dans des cytosols incubés en présence de [^3H]testostérone, soit encore dans les cytosols préparés après injection intra-carotidienne de l'androgène. Ceci suggère la présence, dans le cytoplasme de l'hypophyse antérieure et de l'hypothalamus du rat adulte et normal, d'un 'récepteur' soluble de l'androgène.

Il est à noter que dans les expériences effectuées *in vivo*, la quantité d'androgène libre est très faible, la quasi totalité étant liée ce qui n'est pas le cas dans celles faites *in vitro*.

Quelle que soit la technique utilisée, incubation d'homogénats, de coupes, de cytosols ou injections intra-carotidiennes, nos résultats montrent que la quantité d'androgène lié par mg de protéines est toujours plus importante dans le cytoplasme de l'hypophyse antérieure que dans celui de l'hypothalamus. Ces constatations confirment nos travaux antérieurs au cours desquels l'étude des modalités de la pénétration et de la captation de la [^3H]testostérone nous avait permis de mettre en évidence une concentration préférentielle de l'hormone dans l'hypophyse[13-15]. Des conclusions analogues ont été faites par Resko *et al.*[22], Roy et Laumas[23], Whalen *et al.*[24]. De leur côté, Kato et Villee ont obtenu des résultats identiques avec [^3H]oestradiol[8. 9].

L'étude de la spécificité des 'récepteurs' cytoplasmiques semble montrer que le 'récepteur' hypophysaire possède une affinité plus sélective vis à vis de la testostérone que celui de l'hypothalamus. Seule, en effet, l'addition à parties égales de l'hormone naturelle diminue de 30% la fixation de la [^3H]testostérone. Aucun des analogues testés n'a d'effets pas même la dihydrotestostérone qui selon Jaffé[26] et Martini *et al.*[27] serait le principal métabolite de la testostérone dans cette glande. Nos études étant limitées au 'récepteur' cytoplasmique, il est possible que celui-ci à l'inverse de son homologue nucléaire ait une affinité speci-

fique pour l'hormone inchangée. Bruchovsky et Wilson ont, en effet, montré que, dans la prostate, la transformation de la testostérone en dihydrotestostérone s'effectue principalement dans les noyaux [28]. Anderson et Liao ont de leur côté constaté une rétention sélective de ce métabolite dans les noyaux de cet organe [29].

L'absence de compétition observée entre la testostérone et ses métabolites ne nous surprend pas puisque nous n'avons décelé, au niveau des 'récepteurs' cytoplasmiques de l'hypophyse et de l'hypothalamus qu'une faible quantité d'androstènedione et de dihydrotestostérone.

Le 'récepteur' soluble de l'hypophyse, comme celui de l'hypothalamus, semble avoir un poids moléculaire supérieur à 100.000 puisqu'il est exclu des gels de Sephadex G 100. Sa nature est vraisemblablement protéique pour avoir constaté, après incubation de la fraction exclue du gel de Sephadex G 25 en présence de trypsine, une diminution de 43% de la radioactivité liée au 'récepteur' hypophysaire, et de 69% de celle de l'hypothalamus.

L'incubation d'homogénats d'hypophyses et d'hypothalamus en présence de [^3H]testostérone et à des températures variables prouve la labilité de la liaison macromoléculaire de l'androgène. L'élévation de la température du milieu d'incubation induit dans les deux organes une diminution de la quantité d'androgène lié. La thermolabilité de la liaison tendrait à accréditer sa nature non covalente. Cette baisse du taux de la radioactivité liée provoquée par l'élévation de température des incubations d'homogénats peut être due soit à une instabilité de la liaison androgène-macromolécule, soit à une augmentation du métabolisme de la testostérone soit encore à une destruction partielle du 'récepteur' par action d'enzymes protéolytiques. Des conclusions similaires peuvent être déduites des expériences effectuées par incubation de coupes d'hypothalamus à 5°C, 25°C et 37°C. Le taux d'androgène lié est inversement proportionnel à l'élévation de la température des incubations. Les résultats obtenus après incubation de coupes d'hypophyses sont différents puisqu'à 37°C la quantité d'hormone liée est supérieure à celle observée après incubation à 25°C et à 5°C. Il est possible que la liaison de la protéine cytoplasmique hypophysaire avec l'androgène soit plus stable que celle de l'hypothalamus.

Nous avons étudié, au cours de quelques expériences, la capacité de fixation de l'androgène par son 'récepteur' dans l'hypophyse, l'hypothalamus de rats adultes et castrés depuis 40 jours. Si la quantité globale d'hormone liée par organe est plus importante chez les castrés que chez les normaux, par contre l'activité spécifique du 'récepteur' c'est à dire la quantité d'hormone liée par mg de protéines n'est significativement pas différente entre les orchidectomisés et les non opérés. Ceci tient au fait que, comme l'ont démontré Valotaire et Duval, la castration provoque, au niveau de l'adénohypophyse, une augmentation du poids de cette glande et un accroissement de son contenu en protéines, ADN et ARN [25].

L'étude de la répartition de la radioactivité entre les culots et les surnageants 800 g obtenus après incubation de coupes ou d'homogénats d'hypophyses et d'hypothalamus confirme l'existence de différences fondamentales dans la capture et la répartition de l'androgène dans ces deux organes. Les culots 800 g d'origine hypothalamique renferment toujours au moins autant de radioactivité que les surnageants 800 g correspondants quelle que soit la température du milieu des incubations ou leur durée. A l'inverse, les surnageants 800 g hypophysaires

renferment davantage d'androgène tritié que les culots 800 g. Nos résultats sont en accord avec ceux de Roy et Laumas qui ont montré, récemment, qu'après perfusion de [^3H]testostérone, 82% de la radioactivité sont retrouvés dans le surnageant 105.000 g provenant d'homogénats d'hypophyses de rat et 9% seulement dans la fraction nucléaire[23]. Du point de vue de la répartition entre cytoplasme et noyaux, l'hypothalamus aurait un comportement proche des organes cibles, vésicules séminales et prostate, dans lesquels ces mêmes auteurs ont trouvé une répartition sensiblement égale de la radioactivité entre noyaux et cytosol[23]. Après avoir constaté que plus de 90% de l'ADN sont dans les culots 800 g, on peut raisonnablement en déduire que ces différences très sensibles dans la répartition de la radioactivité nucléaire sont dûes à des modalités de captation de l'hormone propre à chacun de ces deux organes. Il est évidemment indispensable de vérifier l'importance de ce phénomène en rapportant le taux de la radioactivité à celui de l'ADN. Des recherches sont entreprises actuellement dans ce laboratoire. Elles nous permettront de vérifier à partir de noyaux hypophysaires et hypothalamiques purifiés, si les premiers renferment effectivement moins de radioactivité que les seconds. Pour l'instant, la signification biologique de cette répartition dissemblable nous échappe. Il est possible d'envisager, néanmoins, une pénétration de l'hormone dans tous les noyaux des différentes régions hypothalamiques et sa captation sélective par les noyaux des cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure. L'autoradiographie de coupes d'hypophyses devrait permettre de vérifier cette hypothèse. Quoi qu'il en soit, à ces différences de concentration intra-nucléaire de l'androgène doivent correspondre des mécanismes d'action hormonale propre à chacun de ces deux organes.

Il était indispensable de connaître la nature du stéroïde lié aux 'récepteurs' cytoplasmiques de l'hypophyse antérieure et de l'hypothalamus. Nous avons été surpris de constater, tout d'abord, l'hétérogénéité stéroïdique de la fraction exclue du gel de Sephadex G 25 et provenant de cytosols hypophysaire et hypothalamique. La chromatographie sur papier dans le système de solvants de Kochakian[17] nous a, en effet, permis de constater la présence d'androstènedione, de dihydrotestostérone, de testostérone et d'un composé X de faible polarité. Les deux premiers stéroïdes représentent, à eux deux, moins de 10% de la radioactivité totale liée. La faible teneur de la fraction liée en dihydrotestostérone est caractéristique et elle ne correspond pas aux conclusions de Jaffé[26] et Martini *et al.*[27] qui considèrent ce stéroïde comme étant le principal métabolite de la testostérone dans l'hypophyse et l'hypothalamus. Il est vrai que ces auteurs ont étudié le métabolisme de l'hormone mâle, globalement, sans tenir compte des fractions stéroïdiques libres et liées, et sans distinction de métabolisme cytoplasmique ou nucléaire. Il est possible que la transformation de la testostérone en dihydrotestostérone s'effectue principalement dans les noyaux cellulaires à l'image de ce qui a été démontré pour la prostate par Bruchovsky et Wilson[28], Mainwaring[29], Unhjem[33] ou dans les microsomes[31].

La nature du composé X nous est inconnue. Si dans le système de solvants de Kochakian[17] son R_F est identique à celui de l'androstènedione, il en est différent après une chromatographie de 3 h 30 dans le milieu de Kowarski *et al.* [31]. Il faut souligner, en outre, la rapidité et l'importance de la transformation de la testostérone dans le cytoplasme de l'hypophyse antérieure comme dans celui de l'hypothalamus. D'après des travaux en cours nous pouvons affirmer que le taux de la répartition des stéroïdes 'liés' dans les cytosols de prostate de rat est

différent de celui de l'hypophyse et de l'hypothalamus. Il sera intéressant de connaître la nature de ce composé X et de rechercher sa présence dans les récepteurs nucléaires de ces deux organes.

REFERENCES

1. S. McCann, A. Dhariwal et J. Porter: *Ann. Rev. Physiol.* **30** (1968) 589.
2. E. Bogdanove: *Anat Rec.* **157** (1967) 117.
3. K. Wakabayashi et B. Tamaoki: *Endocrinology* **80** (1967) 409.
4. K. Wakabayashi, T. Ogiso et B. Tamaoki: *Endocrinology* **82** (1968) 721.
5. A. Eisenfeld et J. Axelrod: *Pharmacol. Exp. Ther.* **150** (1965) 469.
6. A. Eisenfeld: *Biochim. biophys. Acta* **136** (1967) 498.
7. A. Eisenfeld: *Nature* **224** (1969) 1202.
8. J. Kato et C. Villee: *Endocrinology* **80** (1967) 567.
9. J. Kato et C. Villee: *Endocrinology* **80** (1967) 1133.
10. J. McGuire et R. Lisk: *Fedn Proc.* **27** (1968) 270.
11. J. McGuire et R. Lisk: *Neuroendocrinology* **4** (1969) 289.
12. I. Kahwanage, W. Leroy-Heinrichs et W. Hermann: *Nature* **223** (1969) 313.
13. S. Samperez, M.-L. Thieulant, R. Poupon, J. Duval et P. Jouan: *Bull. Soc. chim. Biol.* **51** (1969) 117.
14. S. Samperez, M.-L. Thieulant et P. Jouan: *Ann. Endocr.* **32** (1971) 31.
15. S. Samperez, M.-L. Thieulant et P. Jouan: *C. r. Acad. Sci.* **268** (1969) 2965.
16. J. Folch, M. Lees et G. Stanley: *J. biol. Chem.* **226** (1957) 497.
17. Ch. Kochakian et G. Stidworthy: *J. biol. Chem.* **199** (1952) 607.
18. K. Savard: *J. biol. Chem.* **202** (1953) 457.
19. O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr et J. Randall: *J. biol. Chem.* **220** (1956) 57.
20. G. Ceriotti: *J. biol. Chem.* **198** (1952) 297.
21. C. Bray: *Anal. Biochem.* **1** (1960) 279.
22. J. Resko, R. Goy et C. Phoenix: *Endocrinology* **80** (1967) 490.
23. S. K. Roy, Jr. et K. R. Laumas: *Acta Endocr.* **61** (1969) 629.
24. R. Whalen, W. Lutttge et R. Green: *Endocrinology* **84** (1969) 217.
25. Y. Valotaire et J. Duval: *Biochim. biophys. Acta* **224** (1970) 63.
26. R. B. Jaffe: *Stéroïds* **14** (1969) 483.
27. Z. Kniewald, R. Massa et L. Martini: 3 *Int. Cong. of Hormonal Steroids*. Hamburg (1970). *Excerpta Medica Found Int. Cong.* Ser. N° 210, p. 59.
28. N. Bruchovsky et D. Wilson: *J. biol. Chem.* **243** (1968) 2012.
29. K. Anderson et S. Liao: *Nature* **219** (1968) 277.
30. P. Jouan, S. Samperez, M.-L. Thieulant et L. Mercier: *C. r. Acad. Sci.* **272** (1971) 2358.
31. A. Kowarski, J. Shalf et Cl. Migeon: *J. biol. Chem.* **244** (1969) 5269.
32. W. I. P. Mainwaring: *J. Endocr.* **44** (1969) 323.
33. O. Unhjem: *Acta Endocr.* **63** (1970) 69.