

ETUDE DE L'ACTION BIOLOGIQUE DU BENZO (a) PYRENE I. ACTION DE L'IRRADIATION U.V. ET DE CERTAINS AGENTS CHIMIQUES SUR L'INDUCTION DES HYDROXYLASES HEPATIQUES PROVOQUEE PAR LE BENZO (a) PYRENE

D. RONDIA et P. DELWAIDE

Laboratoire de toxicologie, Université de Liège, Belgique

(Received 18 January 1968; accepted 16 May 1968)

Abstract—Factors influencing hepatic hydroxylase stimulation by benzo (a) pyrene are studied. The dose of unchanged hydrocarbon injected to the animal is, in the limits of our experiment, the only factor affecting the increase of aromatic hydroxylation; this activity seems thus independent of the factors studied. Particularly, u.v. irradiation of benzo (a) pyrene acts only in destroying a certain amount of the hydrocarbon; the resulting phenols and quinones have no detectable effect.

L'ADMINISTRATION de benzo (a) pyrène (BaP) par voie parentérale entraîne chez le rat, une augmentation notable des activités hydroxylantes microsomiales hépatiques¹ et à un moindre degré, celles d'autres organes: intestins, poumons, reins.² D'autres hydrocarbures polycycliques possèdent également la propriété d'induire ces enzymes peu spécifiques.³ On dispose donc pour l'étude des effets biologiques du BaP d'un test précoce, sensible et relativement spécifique.

Comme on le sait, l'étude des polluants atmosphériques révèle la présence dans les particules respirables d'une fraction organique complexe, où on trouve, à côté du BaP un certain nombre d'hydrocarbures polycycliques. Ce BaP subit dans l'atmosphère diverses influences physiques dont pourrait résulter une modification de l'action biologique. En particulier, le BaP, même à l'état adsorbé sur des particules de fumée, serait très sensible à l'influence destructrice de la composante ultraviolette longue ($> 3.000 \text{ \AA}$) du rayonnement solaire.⁴ D'autre part, on a mis en évidence l'effet de ce rayonnement sur divers composants cellulaires en présence de BaP,⁵ et l'on peut concevoir l'hypothèse qu'une irradiation ultraviolette, quoique détruisant certaines molécules d'hydrocarbure, puisse en modifier d'autres, les rendant capables d'exercer *in vitro* une action différente.

Nous avons tenté de caractériser les effets biologiques éventuels des dérivés formés par irradiation en étudiant leur propriété d'induire les enzymes hépatiques d'hydroxylation.

Enfin, un certain nombre de substances sont connues pour interférer avec les activités biologiques du BaP. Parmi celles-ci, citons les benzopyrènequinones,⁶ l'anthracène et le phénanthrène,⁷ la vitamine A⁸ qui seraient inhibiteurs du pouvoir cancérogène et l'acide ϵ -aminocaproïque qui serait activateur.⁹

Nous avons également vérifié l'action de ces substances sur l'induction enzymatique.

TECHNIQUES UTILISEES

Des jeunes rats albinos mâles (± 75 g) ont reçu une injection intrapéritonéale de BaP, 1 mg dans 0,25 ml de tricapyryline (Unilever, Amsterdam). Les animaux témoins ont reçu la tricapyryline seule. Les rats ont été tués par décapitation, 24 heures après l'injection et leurs foies, immédiatement prélevés, ont été homogénéisés au 1/10 dans du sucrose 0,25 M avec les précautions d'usage.

La mesure de l'activité enzymatique des extraits de foie a été réalisée selon une technique voisine de celle de Conney¹ par incubation à 37° C pendant 30 minutes à l'obscurité, et sous oxygène, de 1,5 ml. de surnageant (à 9.000 g 10 min) additionné de 0,9 ml de solution de cofacteurs et de 0,1 ml de substrat (50 μ g BaP dans 0,1 ml acétone = 200 μ M.).

(a) *Hydroxylation et dosage du BaP*

La pureté du BaP utilisé (Fluka) a été vérifiée par chromatographie en couche mince sur gel de silice, dans une cuve balayée au préalable à l'azote. L'absence d'impuretés et de quinones a été constatée par examen direct à la lampe de Wood, à travers la cuve.

On arrête la réaction enzymatique en introduisant 3,5 ml de KOH (12% dans alcool à 50%) dans le milieu d'incubation. Après avoir laissé reposer 12 h. à l'obscurité, 1 ml de la solution obtenue est extrait par 10 ml d'éther de pétrole, à l'agitateur mécanique. Le rendement de l'extraction dans ces conditions est de 92% (CV = 4%). Le dosage du BaP non hydroxylé est réalisé au spectrofluorimètre (Zeiss ZMF 4) avec activation à 366 m μ et mesure à trois longueurs d'ondes caractéristiques (400, 404 et 420 m μ). La mesure différentielle obtenue est rapportée à une échelle réalisée dans les mêmes conditions sur des solutions d'hydrocarbure de concentrations comprises entre 0,01 et 1 μ g/ml. La validité de cette méthode d'estimation de la quantité de BaP métabolisé repose sur trois considérations:

(1) Les métabolites formés *in vitro* sont sensiblement identiques à ceux qui se forment *in vivo*.¹⁰ Ce sont principalement le 3-hydroxybenzopyrène, les 1-6 et 3-6 benzopyrènequinones et un diol. Ils sont peu ou pas extractibles par l'éther de pétrole et la fluorescence de la solution n'est pas affectée par ces produits dont la fluorescence propre, beaucoup plus faible, ne présente pas le même spectre.

(2) Le benzopyrène se lie aux protéines. Cette liaison est détruite par la potasse alcoolique concentrée comme le montre le rendement élevé de l'extraction et sa reproductibilité.

(3) L'extraction de surnageants normaux donne une solution dont la légère fluorescence n'intervient pas dans notre technique de mesure à trois longueurs d'onde; de même l'injection intrapéritonéale de BaP, 24 heures avant le sacrifice, n'augmente pas cette fluorescence. Enfin nous avons vérifié qu'une incubation à 37° C, sous courant d'oxygène dans le milieu biologique décrit, mais inactivé par la chaleur, n'entraîne pas d'oxydation, de modification ou de volatilisation du BaP.

(b) *Expression des résultats*

Chaque hydroxylation a été réalisée sur deux aliquots de surnageant. La différence entre la concentration moyenne du BaP dans ces deux essais et la moyenne correspondante dans deux aliquots traités de façon identique, mais après, addition de KOH éthanolique pour arrêter la réaction enzymatique, donne la quantité de BaP

métabolisée. Cette détermination est assez reproductible malgré le nombre d'opérations nécessaires: pour une moyenne de 160 $\text{m}\mu\text{M}$ métabolisée par 1,5 ml d'un pool de surnageant au 1/10e de foies induits, l'erreur quadratique moyenne est de 6 $\text{m}\mu\text{M}$. La métabolisation hépatique normale dans un groupe de 15 jeunes rats non induits est en moyenne de 12 $\text{m}\mu\text{M}$ pour la même quantité de surnageant. La variation biologique des taux de métabolisation normale (de l'ordre de 2 $\text{m}\mu\text{M}$) est relativement faible pour des rats d'âge voisin, avec ou sans induction, si l'on tient compte de la reproductibilité propre de l'ensemble des opérations.

La quantité de BaP métabolisée est alors ramenée à l'unité de concentration des protéines dans le surnageant (dosées selon Lowry,¹¹). L'activité enzymatique est donc exprimée en $\text{m}\mu\text{M}$ de BaP métabolisé par mg de protéines et pour la durée d'incubation choisie.

(c) Irradiation du BaP

Afin de vérifier l'effet des produits résultant de l'irradiation du BaP, nous avons administré aux rats dans les mêmes conditions, des solutions de BaP dans la trica-
pryline irradiées au préalable pendant des temps variables. L'excipient a été choisi en raison de sa résistance aux effets de l'irradiation: les huiles naturelles en effet s'oxydent et se polymérisent rapidement en lumière U.V. en présence de BaP.

Les irradiations ont été réalisées avec une lampe à vapeur de Hg à haute pression avec enveloppe en verre de Wood. Le spectre d'émission est donné par la Fig. 1.

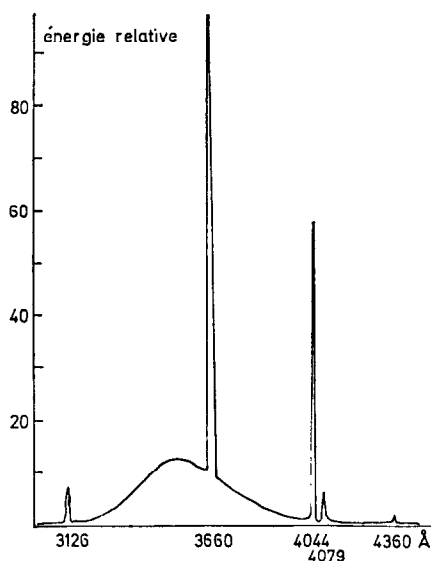


FIG. 1. Spectre d'émission de la lampe Philips HPW 125 utilisée pour l'irradiation des solutions de BaP (en unités relatives).

L'énergie de la lampe (mesurée au ferrioxalate) est d'environ 2,4 W/h/cm² à 20 cm. Les solutions contenant au départ 10 mg/ml et 1,6 mg/ml de BaP ont été étalées en couche mince (2 mm), l'absorption du rayonnement incident étant complète; la surface de la lampe est refroidie par un courant d'air. Les solutions sont irradiées à

l'air libre, du dessus et avec une intensité homogène. La dégradation du BaP est vérifiée régulièrement. L'exposition à l'air sans irradiation U.V. de la même solution, ne provoque pas de dégradation du produit. Les animaux témoins ont reçu des injections de tricapyryline pure irradiée dans les mêmes conditions.

Les activités enzymatiques obtenues sont comparées d'une part à celles obtenues par la solution du BaP non irradiée, et d'autre part à des témoins absolus ayant reçu de la tricapyryline non irradiée.

(d) *Substances synergiques ou antagonistes*

Un mélange de benzopyrènequinones, en position 1-6 et 3-6, a été préparé par oxydation chromique dans l'acide acétique concentré.¹² Les quinones ont été séparées par chromatographie sur alumine, des phénols et autres produits de la réaction. Elles ont ensuite été mises en suspension dans la tricapyryline et injectées à doses croissantes aux animaux d'expérience, seules et en association avec 1 mgr. de BaP. Le même mode opératoire a été suivi pour les autres substances testées.

RESULTATS

1. *Réponse enzymatique en fonction de la dose de BaP inducteur administrée.* Un lot de 30 animaux a reçu par voie intrapéritonéale des doses de BaP croissant de 0,01 à

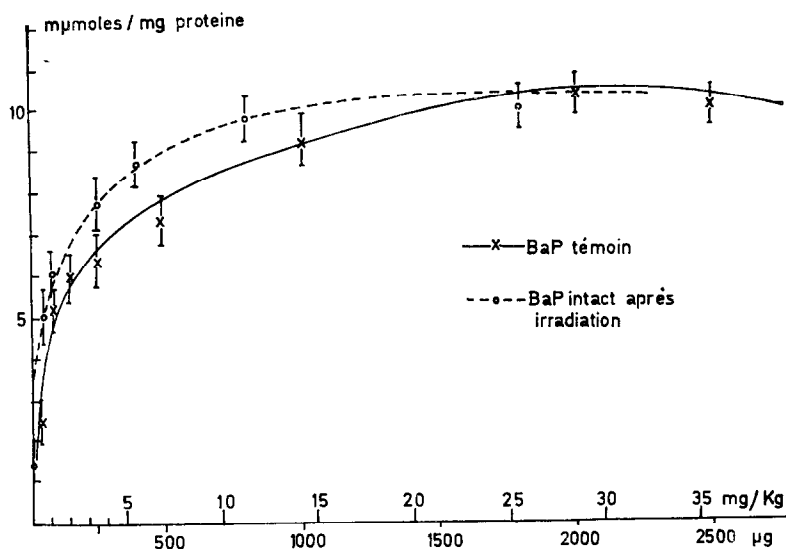


FIG. 2. Activité enzymatique des extraits de foie (en $m\mu$ M de BaP métabolisé par mg de protéine, en 30 min.) après injection intrapéritonéale de quantités croissantes de BaP en mg/kg de poids corporel, et de quantités croissantes de BaP avec ses produits de décomposition (en mg BaP intact/kg).

70 mg/kg. Les activités enzymatiques obtenues sont données au Tableau 1, et sous forme graphique dans la Fig. 2. Au-delà des doses de 0,1 mg/kg qui n'exercent pas d'effet, la relation croît en fonction de la dose de BaP administrée, de façon très rapide jusqu'à la dose de 2,5 mg/kg, puis plus lente.

TABLEAU 1. EFFET DE LA DOSE DE BAP INJECTÉE SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

Dose de BaP administrée		Activité enzymatique*
en mg/Kg	en µg	
0,1	1, 2, 5	1,09
0,13	10	1,37
0,3	25	2,46
0,7	50	2,39
1,4	100	5,29
2,1	150	5,97
3,6	250	6,37
7,0	500	7,34
14,0	1000	9,17
28,6	2000	10,50
71,4	5000	7,65

* Activité enzymatique: $m\mu$ M d'hydrocarbure métabolisé par mgr de protéine (en 30 min).

2. *Effet de l'administration du BaP irradié.* Les résultats obtenus après irradiation de la solution de BaP (Tableau 2) montrent que la réponse enzymatique ne dépend que de la quantité de l'hydrocarbure inchangé effectivement reçue par l'animal.

TABLEAU 2. EFFET DE L'IRRADIATION U.V. SUR LA CONCENTRATION DU BAP EN SOLUTION ET SUR LE POUVOIR INDUCTEUR DU MÉLANGE*

Composition des solutions irradiées	10 mg BaP/ml tricapyryline		1,6 m BaP/ml tricapyryline		Tricapyryline
	Quantité de BaB intact injecté	Activité enzymatique	Quantité de BaP intact injecté	Activité enzymatique	Activité enzymatique
Durée de l'irradiation					
0	2500 µg	10,0	400 µg	8,6	0,95
1 h.	1800	9,8	250	8,3	—
4 h.	800	9,7	—	—	—
12 h.	—	—	40	6,1	—
24 h.	250	7,7	13	3,6	0,80
40 h.	40	5,0	4	1,2	—
48 h.	0	1,1	0	0,8	0,73
72 h.	0	0,8	—	—	0,77
96 h.	0	1,0	—	—	—

* Volume injecté: 0,25 ml, rats de 70 à 75 g.
Activité enzymatique: en $m\mu$ M BaP métabolisé/mg protéine/30 min.

Les deux courbes de la Fig. 2 ne sont pas significativement différentes. On ne constate donc ni exaltation du pouvoir inducteur propre aux produits de photoxydation, ni effet inhibiteur décelable, tel qu'il a été postulé pour les benzopyrènequinones dans les phénomènes de cancérisation.⁶

3. *Effets de l'administration simultanée de diverses substances.* Le Tableau 3 résume les résultats obtenus: on voit que les substances injectées n'exercent pas d'activité inductrice quand elles sont utilisées seules; de plus elles n'entraînent pas de perturbation appréciable, dans les limites de l'erreur expérimentale, quand elles sont utilisées en association avec le BaP.

TABLEAU 3. ACTIVITÉS ENZYMATIQUES APRÈS INJECTION DE DIVERSES SUBSTANCES, SEULES ET EN ASSOCIATION AVEC BAP (EN μM BAP METABOLISÉ/mg PROTÉINES/30 MIN)

Substances injectées*		Activité enzymatique après induction de 24 h.	
		Seules	avec BaP (15 mg/kg)
Tricapryline	200 mg	0,9	9,5
Benzopyrènequinones	1 mg	0,7	10,5
	0,5 mg	—	8,4
	0,25 mg	—	10,0
	0,1 mg	—	8,0
	0,05 mg	—	10,6
Anthracène	1 mg	1,3	7,7
Phénanthrène	1 mg	1,53	8,6
Vit. A	300.000 U.	0,37	6,9
Ac. aminocapr	50 mg	1,53	7,7

* 2 rats d'environ 100 g par essai.

DISCUSSION

L'induction des activités enzymatiques varie en fonction de la dose de BaP administrée: la relation affecte une allure exponentielle avec tendance à l'établissement d'une plateau. On ne peut pas parler d'une dose-seuil véritable, capable de déclencher des mécanismes d'induction enzymatique mais on voit que l'injection d'une dose inférieure à 1 mg par kg de poids corporel donne une réponse nette chez le rat.

L'irradiation U.V. exerce, sur les solutions de BaP, une action oxydante d'où résultent de nombreux dérivés non entièrement identifiés¹³ qui pourraient être doués de propriétés physiologiques. L'injection de ces mélanges, (BaP résiduel + tous les produits de photoxydation) montre que l'augmentation d'activité enzymatique n'est en corrélation qu'avec la teneur en BaP intact dans le milieu. Comme les quinones testées seules, à doses croissantes, se sont montrées dénuées de toute activité, on peut donc conclure que les produits d'irradiation non identifiés se montrent également inactifs.

Il en est de même de l'administration de certaines substances dont on a rapporté l'influence possible sur les effets biologiques de l'hydrocarbure. L'induction des hydroxylases est donc liée à la seule présence de l'hydrocarbure tel quel, sans interférence d'autres produits ou d'actions physiques préalables. Elle n'est d'ailleurs pas particulière au BaP, mais s'observe également pour d'autres hydrocarbures polycycliques.³

La fraction organique extraite des particules respirables de l'air des villes renferme certains de ces composés et notamment du BaP (sa concentration à Liège est de l'ordre de $0,1 \mu\text{g}$ par m^3). Il serait utile de connaître leur pouvoir inducteur, mais malheureusement, la présence dans ces milieux d'un grand nombre de substances toxiques de nature sans doute phénolique, rend leur injection hasardeuse; une purification des extraits est envisagée avant de tester leur activité biologique. L'expérimentation en cours concerne également l'induction des hydroxylases des tissus pulmonaires et l'étude de l'influence sur cette induction de divers polluants atmosphériques particuliers ou gazeux.

CONCLUSIONS

L'induction d'hydroxylases par le BaP dépend, dans certaines limites, de la dose d'hydrocarbure administrée. L'irradiation U.V. préalable du produit injecté n'exerce en soi pas d'influence excitatrice ou inhibitrice: seule compte la quantité d'hydrocarbure subsistant au moment de l'injection. De même, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'influence éventuelle de diverses substances connues pour modifier certaines de ces propriétés biologiques. Il ne paraît donc pas que les conditions physiques et chimiques complexes qui sont à l'origine du vieillissement du BaP dans l'atmosphère (par oxydation ou par photoxydation) modifient in vivo, cette propriété biologique qui est spécifique de l'hydrocarbure tel quel.

Remerciements—Nous remercions le Fonds de la Recherche Scientifique Médicale pour son soutien financier et Melles F. Goujon, C. Degive et J. Jambon, ainsi que Mr. G. Roufosse pour leur collaboration.

REFERENCES

1. A. H. CONNEY, E. C. MILLER et J. A. MILLER, *J. biol. chem.* **228**, 753 (1957).
2. H. V. GELBOIN et N. R. BLACKBURN, *Cancer Res.* **24**, 256 (1964).
3. J. C. ARCOS, A. H. CONNEY et N. P. BUU-HOI, *J. biol. Chem.* **236**, 1291 (1961).
4. H. O. HETTCH, *Int. J. Air Water Poll.* **8**, 185 (1964).
5. G. RESKE et J. STAUFF, *Z. Naturforsch.* **19b**, 716 (1964).
6. R. KOCK et G. O. SCHENK, *Strahlentherapie* **126**, 87 (1965).
7. H. G. CRABTREE, *Cancer Res.* **6**, 553 (1946).
8. E. W. CHU et R. A. MALMGREN, *Cancer Res.* **25**, 884 (1965).
9. M. DIOMEDE-FRESA et I. FUMOROLA, *Tumori* **50**, 25 (1965).
10. H. L. FALK, R. KOTIN, S. S. LEE et A. NATHAN, *J. natn. Cancer Inst.* **28**, 699 (1962).
11. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
12. H. VOLLMAN, H. BECKER, M. CORNELL et H. STREEK, *Liebigs Ann.* **531**, 77 (1937).
13. D. J. RONDIA, *Ind. Chim. Belge* **32**, 495 (1967).