

## ETUDE DE L'ACTION BIOLOGIQUE DU BENZO(a)PYRENE-II

### METABOLISATION DE DIVERS HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES PAR LES ENZYMES HEPATIQUES AVANT ET APRES INDUCTION PAR LE BENZO(a)PYRENE

D. RONDIA et P. DELWAIDE

Laboratoire de Toxicologie, Université de Liège, Belgique

(Received 25 September 1968; accepted 8 January 1969)

**Abstract**—The rate of metabolism of polycyclic hydrocarbons by rat liver homogenates is independent of the physical characters of the molecules. After stimulation of the liver enzymic systems in the rat by benzo(a)pyrene these rates are characteristically increased for the various compounds. This suggests the existence of several metabolic pathways for each compound, some of which could be non-induceable.

LES SYSTEMÈS enzymatiques d'hydroxylation, dans les microsomes hépatiques, présentent un faible degré de spécificité qui se marque à deux niveaux distincts: celui des substances qui exaltent temporairement leur activité (phénobarbital, hormones stéroïdes, phénothiazines, hydrocarbures polycycliques, etc. . . .) et celui des substances qui peuvent leur servir de substrat.<sup>1</sup>

Dans l'induction de l'activité enzymatique par les hydrocarbures polycycliques, divers paramètres, dont la surface de la molécule et sa planéité, sont déterminants. La présence d'une fonction oxygénée par contre, dans les métabolites de ces composés, leur enlève toute activité inductrice mesurable.<sup>2</sup> Le manque relatif de spécificité se retrouve au niveau des substrats utilisables par ce système (appelé parfois "benzopyrène hydroxylase"). La plupart des autres hydrocarbures polycycliques peuvent, en effet, être métabolisés, comme divers produits qui ne leur sont apparentés que par la présence dans la molécule d'un noyau benzénique hydroxylable (hexobarbital, diphenyle, zoxazolamine, etc. . . .). L'utilisation des hydrocarbures polycycliques comme substrats n'a pas fait l'objet de recherches quantitatives, bien que l'on sache que, pour des systèmes enzymatiques de faible spécificité, certains caractères moléculaires du substrat jouent un rôle dans les taux de métabolisation.<sup>3,4</sup> Par ailleurs, des travaux récents sur les cinétiques enzymatiques et sur les métabolites formés après induction ont démontré que celle-ci ne peut être ramenée à une seule modification quantitative (néosynthèse) mais s'accompagne toujours d'une modification qualitative.<sup>5-7</sup> En démontrant l'absence de relation homogène entre les quantités de divers substrats métabolisés, avant et après induction des systèmes enzymatiques du foie de rat, notre travail apporte quelques éléments nouveaux, à l'appui ou à l'encontre d'hypothèses récemment formulées.

Enfin, la présence de ces composés dans les suies et gaz de combustion des foyers et moteurs<sup>8</sup> confère à la question un intérêt pratique. Ils existent normalement dans

les particules respirables de l'air des villes et peuvent donc après résorption pulmonaire, subir dans l'organisme une hydroxylation rapide. Leur action biologique dépendra à la fois de leur pouvoir d'induire les hydroxylases des microsomes hépatiques ou pulmonaires et de la vitesse de leur métabolisation par les mêmes enzymes.

### METHODES UTILISEES

L'étude a porté sur la métabolisation de 18 hydrocarbures polycycliques non méthylés (Fig. 1) dont la pureté a été contrôlée par une mesure des coefficients d'absorption moléculaire et par chromatographie sur couche mince de gel de silice.<sup>8</sup> Leur dosage a été réalisé par spectrophotométrie pour les uns, selon la technique de la ligne de base ou par spectrofluorimétrie pour les autres par une technique similaire (Tableau 1).

TABLEAU 1. LISTE DES COMPOSES ET METHODE DE DOSAGE UTILISEE

Compose No.	Denomination	Poids moléculaire	Technique de dosage (m $\mu$ )
I	Fluorene	166	A. 299-301-303
II	Anthracene	178	F. 398-412-422
III	Phenanthrene	178	A. 292-293-5-295
IV	Pyrene	202	A. 332-335-337
V	Fluoranthene	202	A. 286-287-5-289
VI	Naphtacene	228	A. 274-276-278
VII	Benzo(a)anthracene	228	A. 287-5-289-290-5
VIII	Benzo(a)pyrene	252	F. 404-420-428
IX	Benzo(e)pyrene	252	A. 329-331-5-333
X	Perylene	252	F. 440-456-466
XI	Benzo(b)fluoranthene	252	F. 408-428-440
XII	Anthanthrene	276	A. 426-429-432
XIII	Dibenz(a,h)anthracene	276	A. 347-349-351
XIV	Benzo(g,h,i)perylene	276	A. 382-384-5-387
XV	Dibenz(a,c)anthracene	278	A. 285-287-289
XVI	Coronene	300	A. 336-339-342
XVII	Dibenz(d,e,f,p)chrysene	302	A. 329-331-333
XVIII	Benzo(a)naphto(c,d,e)naphthacene	328	F. 442-458-472

A.: spectrophotométrie par mesure à 3 longueurs d'onde (méthode de la ligne de base).

F.: spectrofluorimétrie par mesure à 3 longueurs d'onde.

La préparation des animaux d'expérience et l'hydroxylation enzymatique des divers substrats par le surnageant d'un homogénat de foies ont été réalisées selon les conditions décrites précédemment,<sup>9</sup> mais l'homogénat a été préparé à partir de 10 foies réunis afin d'éviter les sources de variations individuelles. Les hydrocarbures ont été ajoutés (à raison de 50  $\mu$ g dans 0.1 ml d'acétone) à 1.5 ml d'homogénat, additionné de 0.9 ml de solution de cofacteurs. Selon les hydrocarbures, cette quantité représente 0.15-0.3  $\mu$ mole. Pour le naphtacène, le coronène et le benzo(a)naphto(c,d,e)naphthacène cependant, la quantité d'hydrocarbure a dû être abaissée de moitié, en raison de la faible solubilité dans le milieu d'incubation.

La métabolisation *in vitro* de la plupart des hydrocarbures étudiés s'effectue par hydroxylation, dihydro-hydroxylation, et secondairement formation de quinones.<sup>10</sup> Ces substances, peu ou pas solubles dans l'éther de pétrole, sont retenues dans la potasse alcoolique. L'hydrocarbure non transformé est seul extrait et dosé; le rende-

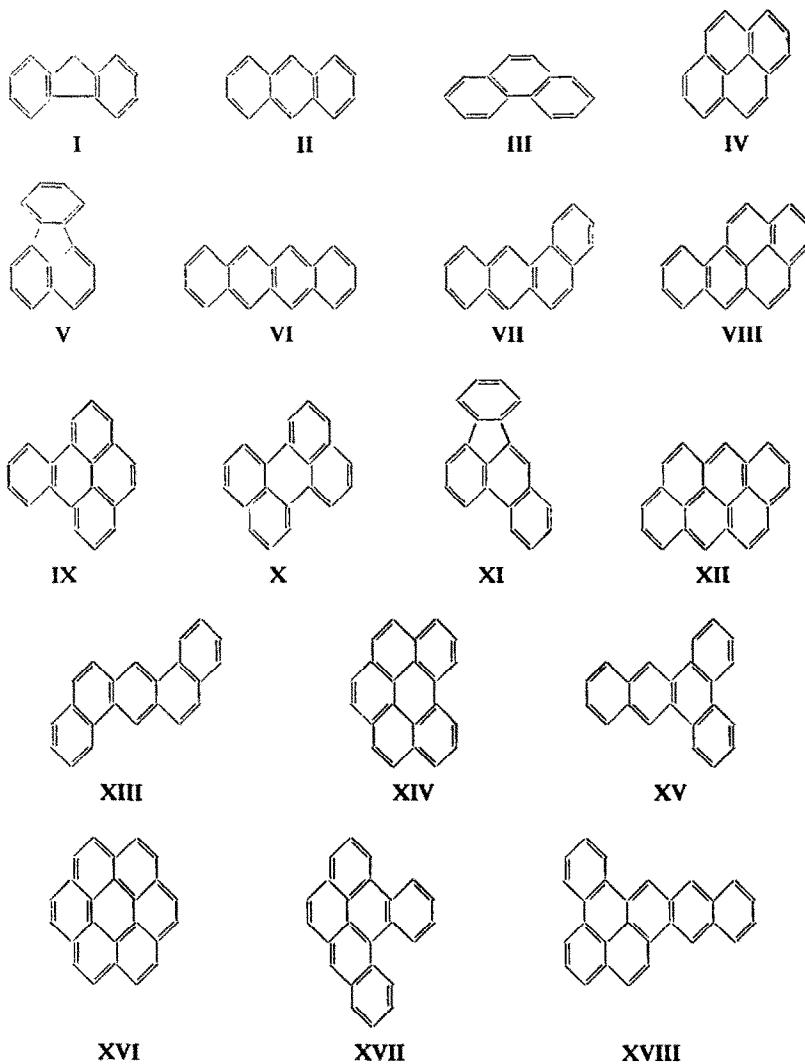


FIG. 1.

ment de l'extraction dans les conditions décrites est en moyenne de 92% ( $\sigma = 4\%$ ); chaque hydroxylation a été réalisée sur quatre aliquots de surnageant. La quantité d'hydrocarbure métabolisé est la différence entre la quantité moyenne d'hydrocarbure extraite après incubation de 30 min dans le milieu décrit et la quantité moyenne extraite après un temps identique dans le même milieu, inhibé au départ par addition de potasse alcoolique. Cette valeur a été divisée par la concentration des protéines dans le milieu, et l'activité enzymatique s'exprime finalement en  $\mu\text{mole}$  d'hydrocarbure métabolisé par mg de protéines dans le surnageant pour 30 mins d'incubation.

#### RESULTATS

Le Tableau 2 donne les résultats des essais de métabolisation qui ont porté sur 18 hydrocarbures de poids moléculaire croissant, d'une part chez les animaux normaux

TABLEAU 2. METABOLISATION DES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES PAR LES EXTRAITS HEPATIQUES

Hydrocarbure	Activité enzymatique*		Coefficient d'augmentation
	Temoin	Après induction	
Fluorene	2.61	9.51	3.6
Anthracene	1.67	2.40	1.4
Phenanthrene	4.20	20.07	4.8
Pyrene	5.17	14.95	2.9
Fluoranthene	6.81	14.31	2.1
Naphtacene	1.92	4.44	2.3
Benzo(a)anthracene	traces	22.4	—
Benzo(a)pyrène†	2.48	14.00	5.6
Benzo(e)pyrène	2.61	16.22	6.2
Perylene	1.68	6.96	4.1
Benzo(b)fluoranthene†	0.93	1.97	2.3
Anthanthrene	0.91	3.99	4.4
Dibenzo(a,h)anthracene†	0.8	12.58	15.8
Benzo(g,h,i)perylene	3.18	3.86	1.2
Dibenzo(a,c)anthracene	2.60	2.33	0.9
Coronene	1.26	1.17	0.9
Dibenzo(d,e,f,p)chrysene†	traces	12.2	—
Benzo(a)naphto(c,d,e)naphtacene	0.52	1.52	2.9

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

† Composés cancérogènes.

et de l'autre chez les animaux induits par le benzo(a)pyrène. La dernière colonne donne le coefficient d'augmentation de la métabolisation.

A l'état normal on constate pour tous les hydrocarbures étudiés *in vitro* une métabolisation hépatique naturelle. Ce taux diffère d'un substrat à l'autre et ne dépend pas de leur poids moléculaire.

Après induction, la métabolisation des substrats est augmentée, sauf pour le dibenzo(a,c)anthracène, et le coronène. L'augmentation de la métabolisation ne semble pas dépendre, elle non plus, du poids moléculaire.

La vitesse de métabolisation des hydrocarbures polycycliques cancérogènes présents dans la fumée des villes ne diffère pas significativement de celle des composés non nocifs.

#### DISCUSSION

Quoique reposant sur une mesure indirecte (le dosage du substrat inchangé) on peut admettre que ces expériences expriment effectivement l'intensité de la métabolisation des hydrocarbures par les enzymes hépatiques. On postule seulement que la formation des diols, qui par ailleurs est quantitativement plus faible que celle des phénols, dépend des mêmes systèmes microsomaux d'hydroxylation et présente la même importance relative pour chacun des produits testés. Il était intéressant d'établir cet inventaire des taux d'hydroxylation et d'y chercher une corrélation entre l'intensité du phénomène biologique et divers caractères des produits examinés, afin d'en tirer des conclusions sur l'activité ou la spécificité des systèmes microsomaux. Parmi ces caractères, nous avons retenu le poids moléculaire, la surface de la molécule, sa symétrie, la structure électronique (énergie de polarisation, indices de délocalisation, de valence libre ou de liaison mobile) et enfin une propriété biologique, l'activité cancérogène.

La corrélation n'est guère décelable ou significative avec le poids moléculaire comme en fait foi le Tableau 2. Il a été vérifié que le poids moléculaire n'avait pas d'influence sur la rentabilité de leur extraction, ni sur la sensibilité de leur dosage. Seule la solubilité dans les solutions de protéines, qui est moindre pour certains produits [coronène, benzo(a)naphto(c,d,e)naphtacène] que pour d'autres de poids moléculaire aussi élevé, semble jouer un certain rôle, soit dans la métabolisation de base [benzo(d,e,f)chrysène, benzo(a)naphto(c,d,e)naphtacène] soit dans la métabolisation après induction [benzo(g,h,i)pérylène, dibenzo(a,c)anthracène, coronène].

Il n'existe pas non plus de corrélation avec les caractères stériques de la molécule: surface d'encombrement, existence d'un axe ou d'un plan de symétrie. La conformation de la molécule en acènes droits (anthracène, fluorène, naphtacène) ou en arènes condensés [pyrène, benzo(a)pyrène, coronène] n'a pas d'influence décelable. Enfin, il était tentant de confronter la structure électronique des composés étudiés et le taux de leur hydroxylation. La mise en évidence de liaisons réactives dans les molécules (région K, L et M) que le passage à un état excité transforme en centre réactifs essentiels, a permis de prédire dans une certaine mesure les propriétés cancérogènes de certains membres de familles homogènes<sup>11</sup> de produits. A la lumière de nos expériences d'hydroxylation, il semble que, même à l'intérieur d'une telle famille, les taux de métabolisation ne sont pas associés aux structures électroniques, ou du moins à un indice de structure déjà connu. En particulier, les taux d'hydroxylation constatés ne confirment pas l'hypothèse récente de Soloway<sup>12</sup> selon laquelle l'attaque des hydrocarbures polycycliques par l'oxygène moléculaire, ne serait possible qu'après activation du substrat en biradical et en peroxyde interne telle qu'elle a été démontrée dans l'oxydation photochimique des acènes: ni l'ordre des taux de métabolisation de base, ni celui des coefficients d'augmentation ne correspondent à l'ordre des vitesses respectives de photoxydation des hydrocarbures par une lumière monochromatique adéquate.<sup>13</sup> S'il existe une activation du substrat, l'intermédiaire oxydé instable n'est pas du type des peroxydes internes de l'anthracène.

Selon une autre hypothèse (Boyland et Sims),<sup>10</sup> le métabolisme des hydrocarbures polycycliques se ferait, après addition de l'oxygène au noyau benzénique et formation d'époxydes, selon plusieurs schémas: le premier serait un simple réarrangement de l'époxyde pour former un phénol, le second, une réaction avec H<sub>2</sub>O donnant des diols, et le troisième une réaction avec le glutathion et formation d'acides mercapturiques, réactions catalysées par des enzymes spécifiques inductibles ou non. Chaque hydrocarbure peut se comporter différemment envers les trois schémas proposés et on comprend que les écarts puissent être très grands entre l'hydroxylation normale et l'hydroxylation après induction.

### CONCLUSIONS

Le surnageant d'un homogénat de foies de rats hydroxyle 18 hydrocarbures polycycliques à des taux variables. Les degrés de métabolisation sont sans corrélation apparente avec les caractères physicochimiques des molécules.

Quand le benzo(a)pyrène est administré en injection intrapéritonéale aux rats 24 hr avant l'essai, les activités enzymatiques sont augmentées vis-à-vis de la plupart des hydrocarbures dans une mesure variable, et sans parallélisme avec les taux de métabolisation de départ. Ce second phénomène ne semble pas, lui non plus, en rapport avec les caractéristiques chimiques des substrats utilisés. Ces faits attirent l'attention

sur la complexité qui caractérise l'augmentation des activités enzymatiques microsomiales en réponse à l'administration préalable d'un toxique.

La vitesse de métabolisation des hydrocarbures polycycliques identifiés dans l'air des villes est voisine de celle des hydrocarbures non nocifs.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. J. C. ARCos, A. H. CONNEY et N. P. BUU-HOI, *J. biol. Chem.* **236**, 1291 (1961).
2. A. H. CONNEY, E. C. MILLER et J. A. MILLER, *J. biol. Chem.* **228**, 753 (1957).
3. R. L. CRAM, M. R. JUSCHAU et J. R. FOUTS, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **118**, 872 (1965).
4. J. K. INSCOE, J. DALY et J. AXELROD, *Biochem. Pharmac.* **14**, 1257 (1965).
5. P. Y. CREAMEN et D. V. PARKE, *Biochem. Pharmac.* **15**, 7 (1966).
6. A. P. ALVARES, G. R. SCHILLING et R. KUNTZMAN, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **30**, 588 (1968).
7. H. L. GURTOO, T. C. CAMPBELL, R. E. WEBB et K. M. PLOWMAN, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **31**, 588 (1968).
8. E. SAWICKI, T. R. HAUSER et T. W. STANLEY, *Int. J. Air Poll.* **2**, 253 (1960).
9. P. DELWAIDE et D. RONDIA, *Biochem. Pharmac.* **17**, 2171 (1968).
10. E. BOYLAND et P. SIMS, *Biochem. J.* **97**, 7 (1965).
11. A. PULMAN et B. PULMAN, *Cancérisation par les substances chimiques et structure moléculaire* Masson, Paris (1955).
12. A. H. SOLOWAY, *J. Theor. Biol.* **13**, 100 (1966).
13. D. RONDIA, résultats non publiés.