

ETUDES SUR L'ACTION BIOLOGIQUE DU BENZ(a)PYRENE—III

LOCALISATION DU BENZ(a)PYRENE TRITIE CHEZ LE RAT APRES ADMINISTRATION INTRAPERITONEALE

PIERRE A. DELWAIDE

Service de Chimie Médicale, Toxicologie & Hygiène, Université de Liège

(Received 15 October 1968; accepted 4 January 1969)

Abstract—The distribution of tritiated benz(a)pyrene in rat liver, kidney, adrenal, spleen, testicle and heart was studied between $\frac{1}{2}$ –24 hr after intraperitoneal injection, with and without simultaneous administration of a large dose (20 mg/kg) of non-radioactive benz(a)pyrene. Intracellular distribution in the liver was similarly studied. In all cases, measurements were obtained of total radioactivity and of petroleum ether extractable radioactivity (corresponding to unmetabolized benz(a)pyrene). While tissue concentrations were maximal 4–6 hr after injection, no clear-cut organ specificity could be demonstrated either for levels of benz(a)pyrene or for the pattern of distribution between unchanged hydrocarbon and its metabolites.

A small fraction (5 per cent) of the initial dose was localized in the liver. In the subcellular fractions, microsomal localization was considerable at first; activity then increased steadily in the supernatant, where it was found in the form of non-extractable metabolites.

INTRODUCTION

SUBSTANCE cancérigène, le benz(a)pyrene (3,4 benzopyrène dans l'ancienne nomenclature), possède en outre la propriété d'induire, chez le rat en croissance, une augmentation des hydroxylases du foie, et, dans une moindre mesure, d'autres organes. La localisation intracellulaire essentielle de ces enzymes est microsomiale.¹ Ces systèmes enzymatiques sont peu spécifiques, catalysant l'hydroxylation de nombreux hydrocarbures polycycliques² et même de substances non apparentées à ceux-ci.¹ D'autre part, on sait que la propriété d'induction d'enzymes microsomaux hépatiques est largement répandue parmi de nombreuses substances, naturelles ou synthétiques. Il est admis que l'induction enzymatique implique une néosynthèse protéique, à côté vraisemblablement de plusieurs autres phénomènes. Lors d'une induction peu spécifique, comme dans le cas des hydrocarbures polycycliques, un processus stéréotypé semble faire suite à l'effet "déclencheur" causé par un produit dont la nature chimique peut être variable, mais répond cependant à certaines exigences.³ Une de celles-ci semble être la possibilité d'être métabolisé: par exemple, les dérivés hydroxylés des hydrocarbures polycycliques sont entièrement dénués d'effet inducteur.

Nous avons étudié, dans l'optique particulière de l'induction d'hydroxylases hépatiques, la localisation viscérale du benz(a)pyrene administré par voie intrapéritonéale, et dans les conditions où ce phénomène d'induction a fait l'objet d'études

antérieures. Nous avons suivi, en fonction du temps, la répartition de l'hydrocarbure tritié, à la fois dans certains viscères et dans les fractions subcellulaires du foie, cherchant à mettre en évidence une éventuelle localisation spécifique de l'inducteur soit à l'échelle de l'organe, soit à l'échelle intracellulaire.

TECHNIQUES

(1) *Préparation des animaux et des homogénats*

L'animal d'expérience est le rat mâle albinos en croissance (poids moyen: 70g).

Nous avons utilisé du benz(a)pyrene marqué au tritium de façon uniforme (activité spécifique: 1.76 mCi/m-mole, soit 7 mCi/mg). Sa pureté radiochimique a été vérifiée par chromatographie sur couche mince de gel de silice éluée au benzène-éthanol 20:1.

Les animaux traités ont reçu par voie i.p. 100 μ Ci de benz(a)pyrene tritié en solution dans 0.25 ml de tricapyline; la quantité d'hydrocarbure administré représente 14 μ g, soit 1.4 pour cent de la quantité donnée dans nos expériences antérieures d'induction enzymatique; elle est inférieure à la dose susceptible de déclencher l'induction dans nos conditions expérimentales.⁴ Dans une autre série, les animaux ont reçu simultanément une quantité proportionnellement importante de benz(a)pyrene non marqué (20 mg/kg), déterminant dans ce cas un accroissement notable des activités enzymatiques. Les animaux sont sacrifiés par décapitation à des intervalles échelonnés de $\frac{1}{2}$ hr à 24 hr après l'injection i.p. Les organes prélevés et pesés sont homogénéisés au broyeur de Potter avec neuf fois leur poids d'eau distillée, à l'exception des fragments hépatiques destinés à la centrifugation, qui sont homogénéisés avec neuf fois leur poids d'une solution de saccharose 0.25 M.

La centrifugation est effectuée en chambre froide dans les conditions suivantes:⁵

600 g 10 min: séparation de la fraction nucléaire;

9000 g 10 min: séparation de la fraction mitochondriale;

105,000 g 60 min: séparation de la fraction microsomiale et de la fraction soluble.

Les culots de centrifugation sont lavés deux fois au saccharose 0.25 M et les liquides de lavage additionnés à la fraction surnageante respective. Les culots sont à leur tour homogénéisés à volume déterminé avec de l'eau distillée.

(2) *Extraction du benz(a)pyrene*

Une partie aliquote des homogénats d'organes ou de fractions subcellulaires hépatiques est soumise à l'extraction par l'éther de pétrole. L'échantillon est d'abord additionné de trois fois son volume de potasse éthanolique; après 10 min, l'extraction est effectuée avec 10 volumes d'éther de pétrole. Dans ces conditions, l'hydrocarbure non modifié chimiquement passe dans la phase organique. La validité de cette technique d'extraction a été vérifiée de la façon suivante:

(a) une partie aliquote des extraits par l'éther de pétrole a été chromatographiée sur couche mince de gel de silice, du benz(a)pyrene tritié radiochimiquement pur étant utilisé comme référence. On constate que 95 pour cent de la radioactivité de l'extrait se retrouve dans la zone correspondant à l'hydrocarbure témoin; par contre les zones correspondant aux métabolites sont dépourvues d'activité. L'extraction par l'éther de pétrole permet donc de séparer sélectivement le benz(a)pyrene à l'exclusion de ses métabolites,

(b) des quantités croissantes (dans les rapports 1, 10, 50, 100) de benz(a)pyrene tritié ont été ajoutées, en présence et en l'absence d'hydrocarbure non marqué

servant d'entraîneur, à des homogénats d'organes identiques aux homogénats étudiés, mais privés d'activité hydroxylante par ébullition préalable. Après extraction, la radioactivité mesurée dans la phase organique a été comparée à la radioactivité totale des homogénats, correction étant faite pour les différences de rendement. Dans tous les cas, la récupération de radioactivité par l'extraction à l'éther de pétrole a été supérieure à 85 pour cent; elle est de plus indépendante de la présence d'entraîneur et du niveau d'activité utilisé.

(3) *Mesures de radioactivité*

Les mesures de radioactivité ont été effectuées au scintillateur liquide "Tricarb Packard".

Les extraits par l'éther de pétrole ont été directement mélangés à un milieu scintillateur à base de toluène; quelle que soit la provenance de l'extrait, le bruit de fond est constant et le rendement de l'ordre de 20 pour cent.

La mesure de la radioactivité des homogénats est plus délicate, car le rendement et le bruit de fond peuvent en être très divers. Une partie aliquote de ces homogénats est d'abord dissoute à l'aide d'hyamine en solution méthanolique (24 hr de contact à 50°), puis ajoutée à un liquide scintillateur à base de dioxane. Le bruit de fond correspondant à chaque type d'homogénat a été déterminé à partir d'homogénats d'organes provenant de rats du même lot n'ayant pas reçu de substance radioactive. Les rendements propres à chaque homogénat (variant de 5 à 10 pour cent) ont été calculés à l'aide de ces mêmes homogénates de référence additionnés d'une quantité connue de dioxane tritié d'activité garantie.

Cette technique d' "étalon interne" permet de convertir toutes les mesures en valeurs absolues de radioactivité (dpm) et rend possible la comparaison directe de tous les résultats quel que soit l'échantillon étudié.

RESULTATS

A. *Localisation du benz(a)pyrene tritié au niveau de divers viscères*

La répartition de la radioactivité du traceur a été étudiée dans les viscères suivants: foie, reins, rate, surrénales (où sont présentes des hydroxylases), testicules et coeur (où la présence d'hydroxylases inductibles n'a pas été rapportée). Les animaux d'expérience ont reçu des activités identiques préparées à partir d'un échantillon commun. Les prélèvements d'organes ont eu lieu aux temps suivants: $\frac{1}{2}$ hr. 1, 2, 4, 6, 8, 16, 24 hr. Cet horaire a été établi en fonction de l'accroissement des activités enzymatiques induites: l'effet inducteur se manifeste déjà après 6 hr et atteint un maximum en 24 hr. Le sang ayant dans tous les cas explorés une activité très faible à la limite des valeurs décelables, nous ne l'avons pas fait figurer dans l'exposé des résultats.

(1) *Mesures de la radioactivité des homogénats totaux.* La radioactivité des homogénats totaux est exprimée en dpm par mg de tissu; son évolution dans le temps est représentée au Tableau 1, dont les deux parties se rapportent respectivement à l'emploi du traceur seul et du traceur administré conjointement à 20 mg/kg de benz(a)pyrene non radioactif.

Le traceur est localisé dans le foie, la rate et le rein de façon plus nette que dans les autres viscères étudiés. Sa fixation atteint, dans tous les cas, un maximum aux environs de la 4^{ème} hr, puis décroît lentement; il persiste encore, de façon parfois

TABLEAU 1. RADIOACTIVITE TOTALE DES HOMOGENATS (VALEURS EN dpm/mg TISSU)

1. Traceur seul (benz(a)pyrene tritie 100 μ Ci)						
Temps (hr)	Foie	Rate	Reins	Testicules	Surrénales	Coeur
$\frac{1}{2}$	850	550	440	240	160	110
1	1120	500	600	230	160	200
2	1280	490	1060	330	230	340
4	4520	1430	3840	580	490	1080
6	2400	730	2540	840	160	950
8	2350	880	2280	680	70	860
16	640	900	2100	510	80	890
24	660	880	1770	500	110	640
2. Traceur plus benz(a)pyrene (20 mg/kg)						
$\frac{1}{2}$	1940	7180	1490	490	510	980
1	3420	16270	6650	520	1780	2120
2	4880	4870	2160	870	1530	840
4	7720	9650	3450	1180	710	1780
6	8550	8830	7140	1160	1420	970
8	4500	11690	7150	1530	1060	1590
24	3030	7210	5560	1610	790	1460

notable, après 24 hr, L'effet de l'administration simultanée d'une grande quantité d'hydrocarbure se marque par une localisation splénique précoce et importante du traceur, et par un accroissement assez général des valeurs mesurées dans les autres viscères, dont le moment de fixation maximum est d'ailleurs retardé.

Quoiqu'il en soit, la quantité d'inducteur effectivement présent dans les organes où il agit est très faible. Le Tableau 2 montre le pourcentage minime de l'activité

TABLEAU 2. POURCENTAGES DE LA RADIOACTIVITE INJECTEE RECUPERES DANS LES ORGANES "IN TOTO" AU MOMENT DU MAXIMUM DE FIXATION

	Traceur seul (benz(a)pyrene tritié)	Traceur plus benz(a)pyrene (20 mg/kg)
Foie	3.27	4.26
Rate	0.42	3.43
Reins	0.90	0.81
Testicules	0.31	0.23
Surrénales	0.02	0.02
Coeur	0.16	0.11

administrée que l'on retrouve dans les viscères étudiés "in toto", même au moment de la fixation maximum. On peut alors calculer que l'injection intrapéritonéale de 1 mg de benz(a)pyrene à un rat de 70 g ne fournit qu'un apport de 50 μ g dans la totalité du foie; cette quantité est comparable à celle trouvée par d'autres auteurs.⁶

Mais il n'existe guère de fixation nettement sélective de cet hydrocarbure dans l'un ou l'autre des viscères étudiés et donc pas d' "organe-cible" au sens propre.

(2) *Mesure de la radioactivité des extraits par l'éther de pétrole.* Les résultats, exprimés en pourcentages de l'activité totale des homogénats correspondants, figurent

TABLEAU 3. RADIOACTIVITÉ DES EXTRAITS PAR ÉTHER DE PÉTROLE (POURCENTS DE L'ACTIVITÉ TOTALE DES HOMOGÉNATS CORRESPONDANTS)

1. Traceur seul [benz(a)pyrene tritié]						
Temps (hr)	Foie	Rate	Reins	Testicules	Surrenales	Coeur
$\frac{1}{2}$	75	100	100	54	68	60
1	75	58	66	46	47	60
2	58	34	46	30	50	47
4	43	41	60	22	61	70
6	35	26	13	22	38	63
8	38	39	15	22	40	40
16	27	30	12	20	17	37
24	25	9	11	11	9	44
2. Traceur plus benz(a)pyrene (20 mg/kg)						
$\frac{1}{2}$	70	100	80	95	72	64
1	66	83	66	64	44	60
2	68	61	61	67	63	72
4	46	41	26	63	67	57
6	40	63	34	71	35	34
8	19	42	14	18	50	14
24	6	27	7	16	36	11

au Tableau 3, qui présente la même structure que le Tableau 1. Ces valeurs, correspondant à la fraction du benz(a)pyrene non métabolisé, décroissent progressivement en fonction du temps, sans cependant tomber à zéro. L'administration d'une quantité d'hydrocarbure suffisante pour déterminer l'induction d'hydroxylases a pour conséquence prévisible de diminuer encore, surtout en fin d'expérience, la quantité de traceur retrouvée dans les extraits; cet effect, logiquement, se constate surtout dans le foie.

Ce type de répartition semble le reflet de la métabolisation de l'hydrocarbure par les enzymes induits ou même préexistants, qui sont de toute façon en quantité suffisante pour déterminer un taux notable d'hydroxylation tout au moins dans le foie.^{1, 4} Les métabolites étant dénués d'effet inducteur, la fraction réellement active en est d'autant réduite. D'autre part, ces métabolites, plus polaires que l'hydrocarbure, peuvent subir une redistribution par la voie circulatoire, expliquant leur abondance dans d'autres viscères, notamment dans les reins, principale voie d'excrétion.

B. Localisation intracellulaire du benz(a)pyrene tritié dans le foie

Les mesures de radioactivité dans les quatre fractions subcellulaires: noyaux, mitochondries, microsomes et fraction soluble, sont présentées aux Figs. 1 et 2.

(1) *Mesures de radioactivité totale des fractions subcellulaires.* La radioactivité mesurée dans les fractions subcellulaires est exprimée en pourcentages de la radioactivité de l'homogénat total au moment correspondant. La première partie de la Fig. 1 se rapporte à l'emploi du traceur seul, la seconde partie à l'emploi simultané du traceur et de 20 mg/kg de benz(a)pyrene.

Si la radioactivité est présente dans toutes les fractions, comme des recherches antérieures l'ont déjà montré,⁷ on constate, en fonction du temps, une augmentation des valeurs dans la fraction soluble, et une diminution correspondante dans la fraction microsomiale. L'addition d'une forte dose d'hydrocarbure détermine un accroissement

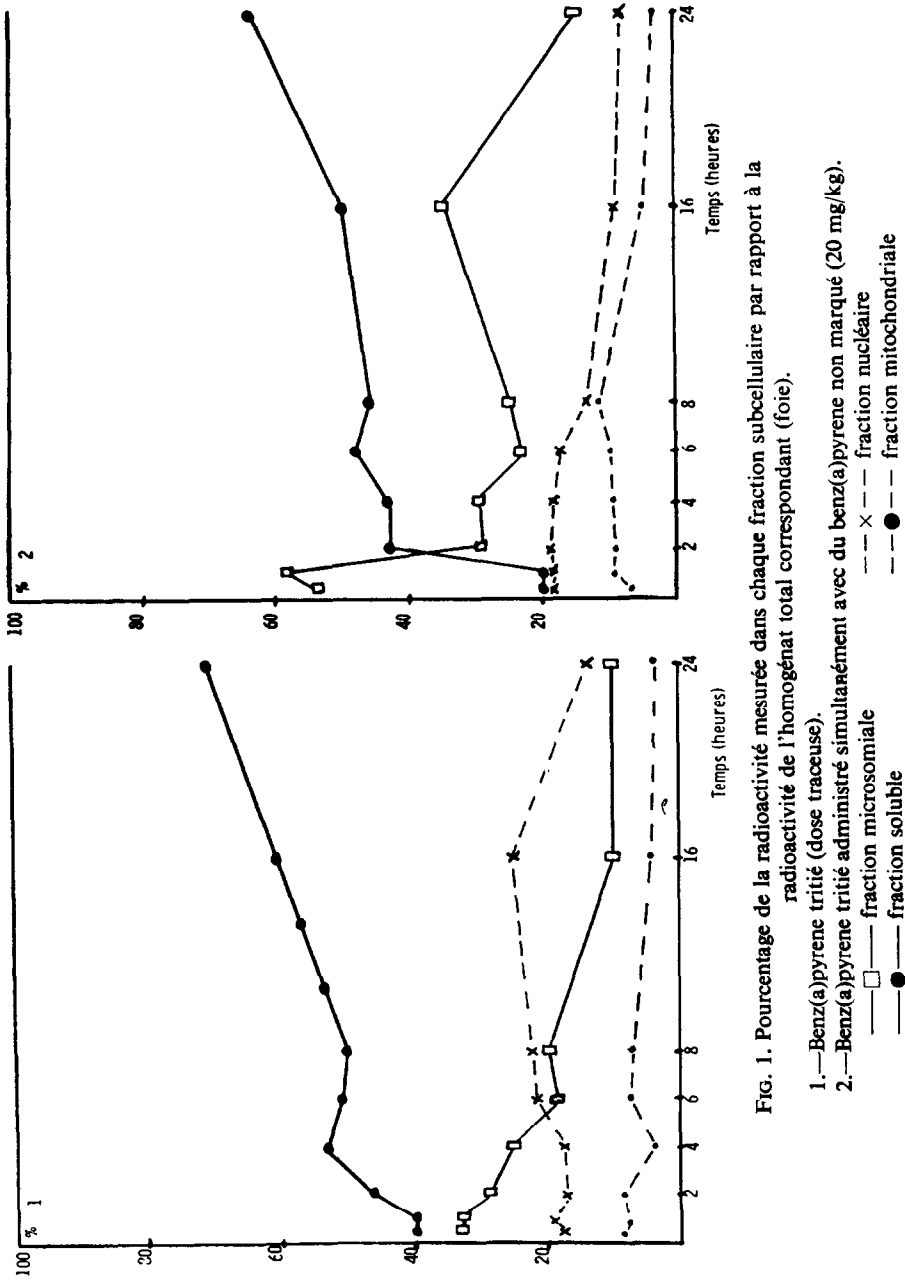


FIG. 1. Pourcentage de la radioactivité mesurée dans chaque fraction subcellulaire par rapport à la radioactivité de l'homogénat total correspondant (foie).

1.—Benz(a)pyrene tritié (dose traceuse).
2.—Benz(a)pyrene tritié administré simultanément avec du benz(a)pyrene non marqué (20 mg/kg).
—●— fraction soluble
—□— fraction microsomiale
—x— fraction nucléaire
—•— fraction mitochondriale

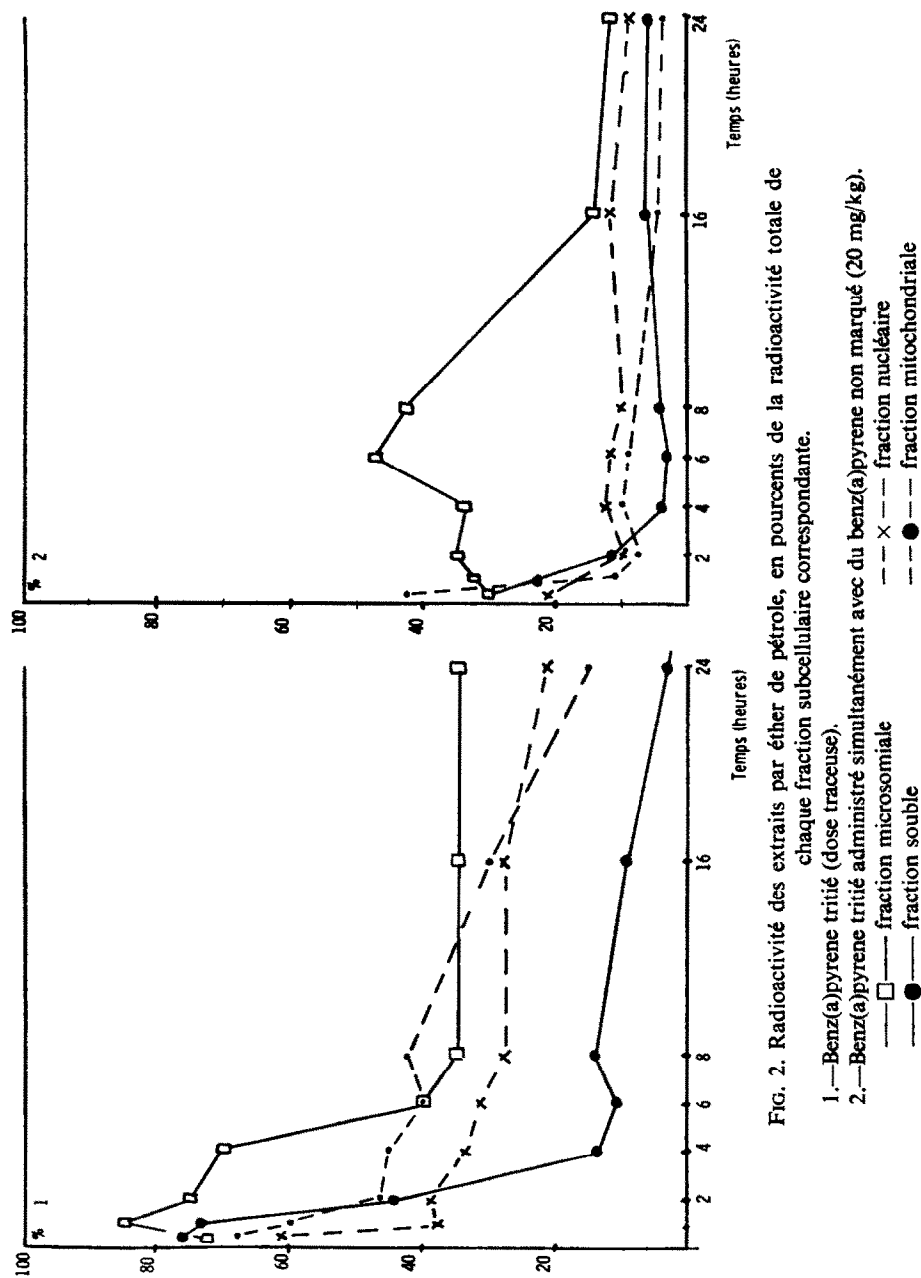


FIG. 2. Radioactivité des extraits par éther de pétrole, en pourcents de la radioactivité totale de chaque fraction subcellulaire correspondante.

1.—Benz(a)pyrene tritié (dose traceuse).

2.—Benz(a)pyrene tritié simultanément avec du benz(a)pyrene non marqué (20 mg/kg).

marqué de la localisation microsomiale du traceur, au détriment de la fraction soluble, sans guère modifier la répartition dans les deux autres fractions.

(2) *Mesures de la radioactivité des extraits par l'éther de pétrole.* L'évolution, en fonction du temps, de la radioactivité mesurée dans les extraits par éther de pétrole est représentée dans les deux parties de la Fig. 2, qui se rapportent respectivement au traceur seul et au traceur additionné d'une quantité importante de benz(a)pyrene non marqué. Les valeurs sont exprimées en pourcentages de la radioactivité, déterminée dans la fraction subcellulaire correspondante.

On constate (comme dans le cas des homogénats d'organes) une diminution progressive de la radioactivité présente dans les extraits; très nette pour la fraction soluble, cette diminution est cependant moins marquée en ce qui concerne les microsomes, les deux autres fractions occupant des positions intermédiaires. L'administration d'une forte dose d'hydrocarbure se manifeste par un pourcentage de radioactivité dans les extraits nettement plus faible, surtout dans les premières heures. Par contre, la fraction microsomiale montre, entre la 4^{ème} et la 8^{ème} hr un pourcentage élevé de radioactivité dans les extraits liposolubles.

L'évolution de la radioactivité des fractions subcellulaires semble reconnaître comme explication la plus simple les changements de phase qui sont la conséquence des transformations métaboliques. Cette conclusion est corroborée par l'évolution de la radioactivité des extraits par éther de pétrole; celle-ci diminue progressivement, tout en restant plus élevée dans les microsomes, siège des hydroxylations; le benz(a)pyrene à dose forte accentue l'importance relative de la fraction microsomiale. Le type de distribution trouvé pour le benz(a)pyrene est donc assez différent de celui de ¹⁴C-méthylcholanthrène, également cancérigène et inducteur enzymatique.⁸

Aucune particularité spécifique de localisation du traceur ne semble donc exister au niveau des fractions subcellulaires, et ce d'autant moins que les délais de mesure se rapprochent du moment de l'administration du produit.

CONCLUSIONS

1. Après une administration i.p., la fixation de benz(a)pyrene marqué au niveau de viscères étudiés est relativement lente et progressive, atteignant un maximum après 4 à 6 hr; la métabolisation semble débiter immédiatement sous l'effet des enzymes préexistants. Or les premiers effets quantitatifs de l'induction d'hydroxylases se révèlent aussi tôt que 6 hr après l'injection de l'hydrocarbure. Les phénomènes de résorption, métabolisation et mise en train du processus d'induction semblent donc relativement simultanés.

2. Il n'existe guère de spécificité d'organe ou de fraction subcellulaire pour la localisation du benz(a)pyrene, ni en ce qui concerne le niveau d'activité, ni en ce qui concerne la vitesse de fixation. Les particularités de répartition peuvent s'expliquer par les phénomènes d'hydroxylation, donnant des substances à propriétés physico-chimiques toutes différentes.

3. La quantité de substance agissant réellement comme inducteur est vraisemblablement faible, d'autant plus que les métabolites, en proportion déjà importante au moment du maximum de fixation n'exercent aucun effet inducteur. La majeure partie du benz(a)pyrene administré semble donc impliquée dans des processus de fixation et de métabolisation assez peu spécifiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. A. H. CONNEY, E. C. MILLER et J. A. MILLER, *J. biol. Chem.* **228**, 753 (1957).
2. D. RONDIA et P. DELWAIDE, *Biochem. Pharmac.* **18**, 1269 (1969).
3. J. C. ARCOS, A. H. CONNEY et N. P. BUU-HOI, *J. biol. Chem.* **236**, 1291 (1961).
4. D. RONDIA et P. DELWAIDE, *Biochem. Pharmac.* **17**, 2171 (1968).
5. W. C. SCHNEIDER, *J. biol. Chem.* **176**, 259 (1948).
6. C. HEIDELBERGER et S. M. WEISS, *Cancer Res.* **11**, 885 (1951).
7. G. CALCUTT, *Br. J. Cancer* **12**, 149 (1958).
8. E. BRESNICK, R. A. LIEBELT, J. C. STEVENSON et J. C. MADIX, *Cancer Res.* **27**, 462 (1967).