

## ETUDE COMPAREE DES EFFETS DU ZINC ET DU CADMIUM SUR LES ACTIVITES CHOLIN- ESTERASIQUES TISSULAIRES DU RAT

PHAM-HUU-CHANH et Y. PLANCADE

Centre de Recherches sur les Toxicités (C.N.R.S.), 205 Route de Narbonne, 31-Toulouse, France

(Received 20 March 1970; accepted 24 June 1970)

**Abstract**—A comparative study of the effects of zinc and cadmium on cholinesterase activities (total, true and pseudo) in the blood, brain, heart, liver, spleen and kidney of rats has been made. Both the action of zinc and cadmium *in vitro* on cholinesterase activities of the different tissues, and the variations in tissue cholinesterase activities in animals exposed to either a single dose of cadmium or zinc, or chronic daily administration of small doses has been investigated. Zinc and cadmium were found to have opposite effects on rat tissue cholinesterase activities; cadmium activated cholinesterase, while zinc was inhibitory. These actions were manifested both *in vitro* and *in vivo* in acute intoxication, but in chronic intoxication (repeated administration of small daily doses) the effects of zinc and cadmium on tissue cholinesterase activities of intoxicated animals were not significant.

LE ZINC et le cadmium, quoique appartenant au même groupe chimique et ayant des propriétés physico-chimiques similaires, ont des toxicités et des activités pharmacodynamiques bien différentes. En effet, pour le rat et la souris, le cadmium est par voie entérale de 12 à 14 fois et par voie intraperitoneale de 46 à 82 fois plus毒 que le zinc.<sup>1-3</sup> Les sulfates des deux métaux sont spasmolytiques, mais alors que l'action du zinc est faible,<sup>4</sup> celle du cadmium est considérable: le sulfate de cadmium est presque 3 fois plus actif que la papavérine.<sup>5</sup> Le cadmium est pneumoconstricteur,<sup>6</sup> le zinc l'est aussi mais son agressivité, quoique plus faible, est plus difficile à neutraliser.<sup>7</sup> Au même stade d'intoxication, compte tenu du fait que le sulfate de cadmium est environ 10 fois plus毒 que le sulfate de zinc chez le chien chloralosé, les deux sels sont hyperglycémiant et hypocholestérolémiant: sur la cholestérolémie l'activité des deux sels est comparable, sur la glycémie le sulfate de zinc est plus actif.<sup>8</sup> Enfin, le zinc et le cadmium se montrent tous les deux dépresseurs du système cardiovasculaire mais leur mécanisme d'action n'est pas identique.<sup>9</sup>

Par ailleurs, les travaux antérieurs ont souligné le rôle considérable du zinc dans plusieurs phénomènes physiologiques:<sup>10-14</sup> Bertrand l'a classé parmi les "éléments oligosynergiques". Le zinc entre dans la composition de nombreuses enzymes.<sup>15</sup> Plusieurs auteurs ont signalé en outre que les deux métaux ont un rôle important dans l'activité des enzymes.<sup>16-21</sup>

Il apparaît à la lumière des recherches déjà réalisées qu'il est intéressant d'étudier comparativement les variations des activités enzymatiques des animaux intoxiqués par le zinc et le cadmium : nos recherches ont porté sur un certain nombre d'enzymes,

le zinc et le cadmium étant administrés à des doses équitoxiques. Dans cette note, nous rapportons les résultats de notre travail sur les cholinestérases.

#### MATERIEL ET METHODES

Nos essais ont porté sur des rats mâles de  $200 \pm 10$  g (de 6 semaines d'âge environ) (*Rattus norvegicus* Berkenhout, var. albinos, de souche Wistar A.G.). Nous avons étudié l'influence du zinc ( $ZnSO_4$ , 7  $H_2O$ ) et du cadmium (3  $CdSO_4$ , 8  $H_2O$ ) sur les cholinestérases (totale, vraie et pseudo) du sang, du cerveau, du cœur, du foie, de la rate et du rein. Deux séries d'expériences ont été réalisées:

(1) *Expériences in vitro*. Étude de l'action directe *in vitro* du zinc et du cadmium sur l'activité cholinestérasique de différents tissus comparativement avec celle du sulfate d'ésérine.

(2) *Expériences in vivo*. Étude des variations des activités cholinestérasiques des différents tissus de rats intoxiqués auparavant par le zinc et le cadmium:

*Intoxication immédiate*. Les animaux ont été traités par une dose unique (IL = dose infraléthale, c'est-à-dire la dose maximale jamais mortelle, et IL/5).

Le dosage des activités cholinestérasiques a été effectué 15, 60 mn et 24 hr après l'administration de zinc et de cadmium.

*Intoxication à terme*. Les animaux ont été traités par des doses quotidiennes (IL/15) de zinc et de cadmium, à raison de 6 injections par semaine, et le traitement a duré 5 semaines. Ainsi, chaque animal a reçu soit 27 injections de cadmium, soit 28 injections de zinc.

Les dosages des activités cholinestérasiques ont été réalisés après 3, 9, 15, 21 et 27 injections pour le cadmium, et après 4, 10, 16, 22 et 28 injections pour le zinc : les dosages ont été effectués 24 hr après la dernière injection.

L'animal étant légèrement anesthésié à l'éther, on prélève le sang (par ponction cardiaque; on a utilisé comme anticoagulant l'Anticlot, Laboratoires Delagrange), le cerveau, le cœur, le foie, la rate et le rein.

On dilue le sang au 1/10 avec de l'eau distillée : il est ainsi hémolysé. On prend soin de bien agiter pour mettre le stroma en suspension afin de bien répartir les cholinestérases qui y sont localisées.

Les organes ont été broyés au Potter préalablement refroidi au réfrigérateur et le broyage a été réalisé à la température de la glace. On dilue les broyats au 1/100 pour le cerveau et au 1/10 pour les autres organes avec du soluté isotonique de chlorure de sodium.

Nous avons adopté la méthode colorimétrique préconisée par Vincent *et al.*<sup>22-24</sup> pour mesurer l'activité cholinestérasique du sang et des tissus : celle-ci est déterminée par la quantité d'acétylcholine hydrolysée par incubation avec la source enzymatique. Le dosage de l'acétylcholine est basé sur la formation d'acide acétylhydroxamique que celle-ci donne avec l'hydroxylamine en milieu fortement alcalin; en milieu acide l'acide acétylhydroxamique donne avec les sels ferriques un complexe coloré en rouge facilement mesurable.

On utilise un inhibiteur sélectif de la pseudocholinestérase, le chlorhydrate de diéthylaminoéthylphénothiazine ou chlorhydrate de diéthazine (Diparcol®, 2987RP) qui à certaine concentration laisse intacte la cholinestérase vraie, pour distinguer les deux formes de cholinestérase.

L'activité cholinestérasique sera définie, selon Vincent *et al.* par le nombre de  $\mu\text{g}$  de chlorure d'acétylcholine hydrolysée en 1 heure à  $38^\circ$  par  $1\text{ mm}^3$  de sang ou par  $1\text{ mg}$  d'organe. Le temps d'incubation adopté était de 30 mn.

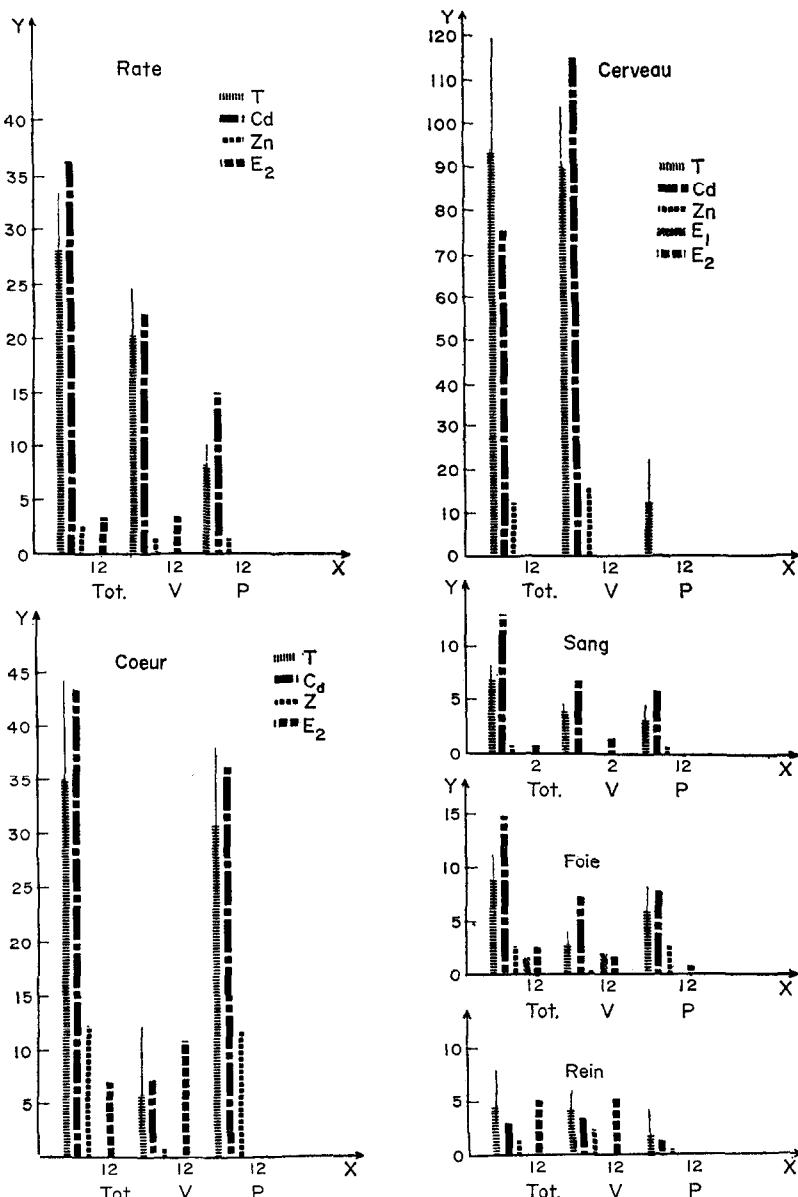


FIG. 1. Etude comparée *in vitro* de l'action de cadmium, du zinc, et de l'ésérine sur les activités cholinestérasiques du sang, du cerveau, du cœur, du foie et du rein de rat. Tot., activités cholinestérasiques totales. V, activités cholinestérasiques vraies. P, activités pseudocholinestérasiques. T, Témoin sans effeteur. Cd,  $\text{CdSO}_4$   $0,10\text{ mM}/100\text{ ml}$ , soit  $76,9\text{ mg}/100\text{ ml}$ . Zn,  $\text{ZnSO}_4$   $10\text{ mM}/100\text{ ml}$ , soit  $2876,6\text{ mg}/100\text{ ml}$ .  $E_1$ , sulfate d'ésérine  $2\text{ mg}/100\text{ ml}$ .  $E_2$ , sulfate d'ésérine  $2\text{ mg}/100\text{ ml}$ . y, activité cholinestérasique en  $\mu\text{g}$  de chlorure d'acétylcholine hydrolysée en 1 hr à  $38^\circ$  par  $\text{mm}^3$  de sang total ou par  $\text{mg}$  d'organe.

## RESULTATS EXPERIMENTAUX

(1) *Expériences in vitro* (Fig. 1)

Après des essais préliminaires, nous avons adopté les concentrations de 0,10 mM/100 ml soit 76,9 mg/100 ml de sulfate de cadmium et 10 mM/100 ml soit 2876,6 mg/100 ml de sulfate de zinc. Parallèlement, nous avons mesuré l'activité anticholinestérasique de l'ésérine (20 mg/100 ml et 2 mg/100 ml).

Cinq animaux ont été utilisés pour chaque concentration de chaque produit étudié.

La Fig. 1 rapporte comparativement les activités cholinestérasiques (totale, vraie et pseudo) de différents tissus (sang, cerveau, cœur, foie, rate, rein) sous l'action du zinc, du cadmium et de l'ésérine.

Il ressort de notre étude que :

(a) Le sulfate de zinc est inhibiteur de toutes les activités cholinestérasiques (totale, vraie, pseudo) de tous les tissus étudiés (sang, cerveau, cœur, foie, rate, rein).

(b) Le sulfate de cadmium est inhibiteur des activités cholinestérasiques du rein (totale, vraie, pseudo). Par contre, il s'est montré activateur des activités cholinestérasiques du sang, du cœur, de la rate et du foie. Toutefois, il diminue l'activité cholinestérasique totale du cerveau tout en stimulant l'activité cholinestérasique vraie.

Par ailleurs, nous avons dosé les activités cholinestérasiques de différents tissus à différents temps d'incubation avec le zinc, le cadmium et l'ésérine, et nous avons retrouvé l'ensemble des résultats obtenus précédemment à savoir que le cadmium est activateur et le zinc inhibiteur des activités cholinestérasiques. Ces expériences démontrent que les effets relatifs de ces métaux ainsi que ceux de l'ésérine (aux concentrations utilisées) sont indépendants du temps d'incubation : leur action est immédiate et augmente avec le temps d'incubation. Par ailleurs, elles montrent que le pouvoir inhibiteur de l'activité cholinestérasique de 10 mM/100 ml de sulfate de zinc est dans l'ensemble sensiblement équivalent à celui de 2 mg/100 ml d'ésérine.

(2) *Experiences in vivo*

(a) *Toxicité immédiate.* Les animaux ont été traités par la dose IL (dose infraléthale : la plus grande dose qui ne détermine pas de mortalité) et la dose IL/5.

TABLEAU 1

	IL		IL/5	
	mM/kg	mg/kg	mM/kg	mg/kg
CdSO <sub>4</sub>	0,008	0,00615	0,0016	0,0012
ZnSO <sub>4</sub>	0,60	0,171	0,12	0,00342

Les animaux ont été sacrifiés 15, 60 mn et 24 hr après l'administration des produits : on prélève le sang et les organes pour doser leur activité cholinestérasique. Chaque dosage nécessite 5 animaux.

(i) Le zinc et le cadmium abaissent l'activité cholinestérasique plasmatique : leur action porte spécialement sur la pseudocholinestérase.

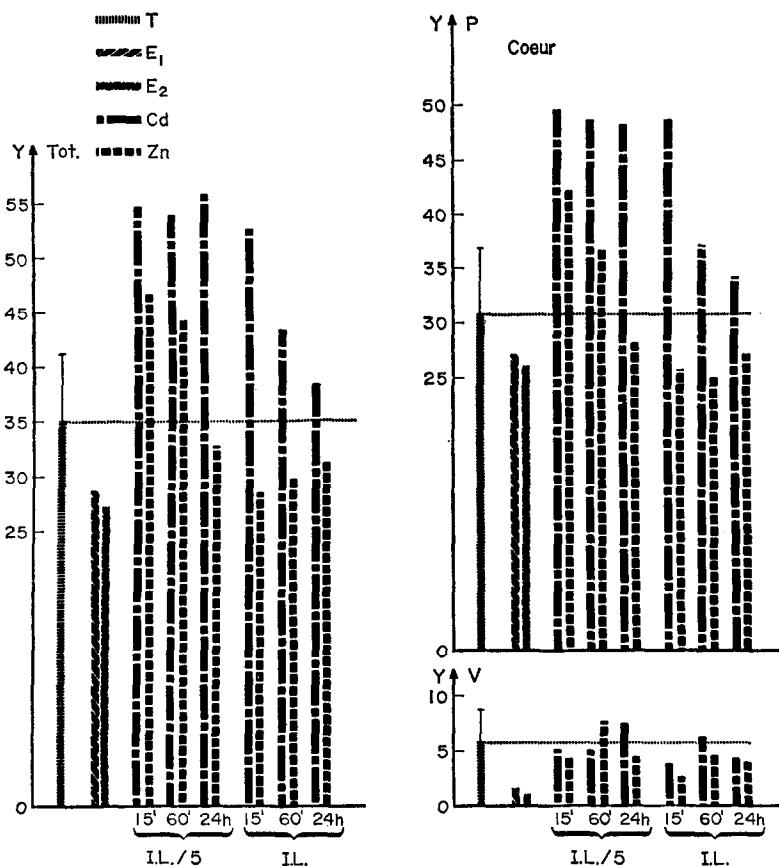


FIG. 2. Les activités cholinestérasiques (totales, vraies et pseudo) du cœur de rat traité par une dose unique de zinc et de cadmium (IL et IL/5) et d'ésérine. Tot., activités cholinestérasiques totales. V, activités cholinestérasiques vraies. P, activités pseudocholinestérasiques. T, Témoin traité par un volume équivalent de serum salé isotonique. Cd, CdSO<sub>4</sub>, IL, IL/5 (Tableau 1). Zn, ZnSO<sub>4</sub>, IL, IL/5 (Tableau 1). E<sub>1</sub>, sulfate d'ésérine 0,70 mg/kg. E<sub>2</sub>, sulfate d'ésérine 1,00 mg/kg. y, activité cholinestérasique en  $\mu$ g de chlorure d'acétylcholine hydrolysée en 1 hr à 38° par mm<sup>3</sup> de sang total ou par mg d'organe.

(ii) Le cadmium augmente nettement l'activité cholinestérasique cérébrale du rat; cette activité est maximale 15 min après l'administration du produit. Le zinc, qui n'a pas une action significative sur l'activité cholinestérasique cérébrale du rat dans l'heure qui suit son administration, a au contraire tendance à l'inhibiter 24 hr après.

(iii) A l'égard des activités cholinestérasiques cardiaques, l'action activatrice du cadmium peut durer 24 hr tandis que l'action du zinc est ambivalente : celui-ci augmente l'activité à la dose IL/5 et ce, pendant les 60 premières min qui suivent son administration, et il la déprime à la dose infraléthale (Fig. 2). Il en est presque de même des activités cholinestérasiques spléniques (Fig. 3).

Le cadmium augmente l'activité cholinestérasique vraie hépatique; le zinc n'a pas d'action significative. Aucun des deux métaux n'a une action significative sur les activités cholinestérasiques du rein.

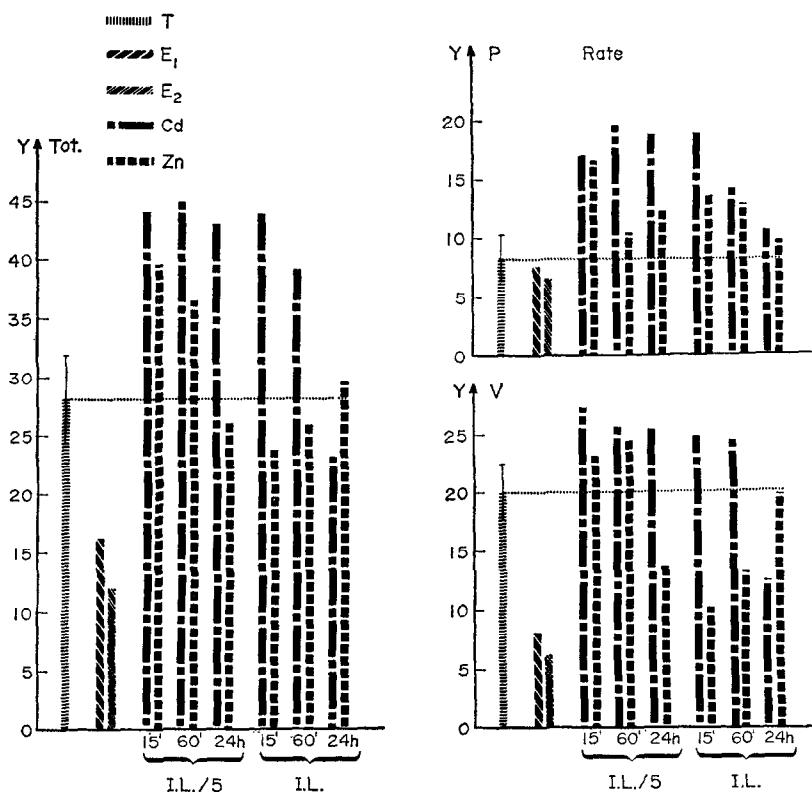


FIG. 3. Les activités cholinestérasiques (totale, vraie et psuedo) de la rate de rat traité par une dose unique de zinc et de cadmium (IL et IL/5) et d'éséristine (Même légende que Fig. 2).

(b) *Toxicité à terme.* Les animaux ont été traités par des doses quotidiennes IL/15/j soit:

$\text{CdSO}_4$  : 0,00053 mM/kg soit 0,00041 mg/kg i.p.

$\text{ZnSO}_4$  : 0,04 mM/kg soit 0,0114 mg/kg i.p.

à raison de 6 injections par semaine. Les dosages des activités cholinestérasiques ont été réalisés après 3, 9, 15, 21 et 27 injections pour le cadmium et 4, 10, 16, 22 et 28 injections pour le zinc : ils ont été effectués 24 hr après la dernière injection.

Dans l'ensemble, le cadmium a tendance à augmenter et le zinc à abaisser les activités cholinestérasiques des tissus : ceci est vrai pour les activités cholinestérasiques du sang, du cerveau, et du foie. Par contre, le zinc et le cadmium augmentent tous les activités cholinestérasiques du cœur et de la rate. Toutefois, l'action de ces deux métaux est peu significative et inconstante.

#### DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans les conditions expérimentales adoptées, les résultats obtenus ont mis en évidence l'opposition des effets du zinc et du cadmium sur les activités cholinestérasiques. En effet, dans l'ensemble, le cadmium s'est montré activateur alors que le

zinc est inhibiteur. Ces actions sont manifestes *in vitro* et *in vivo* dans les intoxications immédiates. Dans les intoxications à terme par administration de doses faibles réitérées quotidiennes, les effets de ces métaux sur les activités cholinestérasiques des animaux intoxiqués ne sont pas significatifs.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux des divers auteurs<sup>25-31</sup> selon lesquels le cadmium, le magnésium, le manganèse, le strontium, le baryum, le sodium et le potassium activent la cholinestérase, alors que le fluorure de sodium, l'oxalate, le phosphate, le citrate, l'arsénite, le pyrophosphate, le cyanure, le cuivre, le cobalt l'inhibent.

Nos résultats ne confirment pas ceux de Massart et Dufait<sup>26</sup> car selon ces auteurs le cadmium est indifférent à l'égard des cholinestérases. Par ailleurs, Massart et Dufait ont prétendu que le baryum n'a pratiquement pas d'action alors que selon Nachmansohn,<sup>30</sup> Friess<sup>25</sup> et d'autres auteurs, le baryum a une action activatrice de la cholinestérase non négligeable.

Van der Meer,<sup>31</sup> résumant les travaux de différents auteurs a constaté que: les sels avec des cations mono et divalents inhibent la cholinestérase vraie à de basses concentrations d'acétylcholine, tandis qu'ils l'activent à des concentrations élevées d'acétylcholine; les sels à cations monovalents inhibent tandis que les cations divalents activent la pseudocholinestérase.

Il est intéressant de remarquer que le cobalt, le cuivre et le zinc, inhibiteurs de la cholinestérase, font partie de la famille des éléments de transition, et leurs numéros atomiques se suivent, respectivement 27, 29 et 30.

L'importance de différents métaux vis à vis des cholinestérases a fait croire à plusieurs chercheurs que l'acétylcholinestérase est un métallo-enzyme. Mais cette hypothèse est infirmée par Wilson et Cabib<sup>32</sup> qui ont démontré que la cholinestérase n'est pas un métallo-enzyme et qu'aucune espèce d'ion métallique n'est nécessaire à la fonction catalytique de la cholinestérase. Myers était aussi de cet avis.

D'après Nachmansohn<sup>30,33</sup> l'activité de la cholinestérase vraie dépend de la présence des groupes sulfhydryles libres qui sont facilement inactivés par les impuretés métalliques. Mais ce même auteur a constaté également que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  réactivent l'enzyme dialysée et ceci est indépendant de la réactivation des groupes sulfhydryles.<sup>30</sup>

Myers<sup>28,29,34</sup> a suggéré que l'activation par les sels peut être due à une interaction avec le groupement ester du centre actif de la cholinestérase alors qu'un inhibiteur entrerait en compétition avec l'acétylcholine pour la position anionique dans le centre actif de la cholinestérase.

**Résumé**—Les auteurs ont étudié comparativement les effets du zinc et du cadmium sur les activités cholinestérasiques (totale, vraie et pseudo) des différents tissus du rat (sang, cerveau, cœur, foie, rate et rein). Ils ont étudié d'abord l'action du zinc et du cadmium *in vitro* sur les activités cholinestérasiques des différents tissus, puis les variations des activités cholinestérasiques des différents tissus des animaux intoxiqués soit par administration d'une dose unique de cadmium ou de zinc, soit par des administrations de doses faibles réitérées quotidiennes.

Ces expériences ont mis en évidence l'opposition des effets du zinc et du cadmium sur les activités cholinestérasiques tissulaires du rat: le cadmium s'est montré activateur alors que le zinc est inhibiteur. Ces actions sont manifestes *in vitro* et *in vivo* dans les intoxications immédiates. Mais dans les intoxications à terme par administration de doses faibles réitérées quotidiennes, les effets du zinc et du cadmium sur les activités cholinestérasiques des tissus des animaux intoxiqués ne sont pas significatifs.

## REFERENCES

1. F. CAUJOLLE, H. BOUSSOU, PHAM-HUU CHANH, M. T. FABRE et G. SILVE, *Bull. Acad. Nat. Med.* **149**, 146 (1965).
2. F. CAUJOLLE, PHAM HUU CHANH, P. KAN et F. MOULAS, *Ann. Pharm. Fr.* **23**, 81 (1965).
3. F. CAUJOLLE, PHAM HUU CHANH, G. MAMY, F. MOULAS et LUONG THI NGOC SUONG, *C. r. Acad. Sci. Paris* **258**, 375 (1964).
4. F. CAUJOLLE, PHAM HUU CHANH, NGUYEN LUONG THI NGOC SUONG et P. KAN, *Toulouse Pharm.* **13**, 113 (1966).
5. PHAM HUU CHANH, G. SILVE-MAMY et VU THU HUONG, *Thérapie* **24**, 965 (1969).
6. F. CAUJOLLE et PHAM HUU CHANH, *Archs int. Pharmacodyn.* **149**, 257 (1964).
7. F. CAUJOLLE, PHAM HUU CHANH, LUONG THI NGOC SUONG et J. PATTE, *Agressologie* **6**, 293 (1965).
8. F. CAUJOLLE, PHAM HUU CHANH, G. MAMY, LUONG THI NGOC SUONG et J. PATTE, *Agressologie* **5**, 263 (1964).
9. PHAM HUU CHANH, NGUYEN LUONG THI NGOC SUONG, G. SILVE-MAMY et Y. PLANCADE, *Agressologie* (sous presse).
10. G. BERTRAND et B. BENSON, *C. r. Acad. Sci. Paris* **175**, 289 (1922).
11. G. BERTRAND et B. BENSON, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **6**, 203 (1924).
12. G. BERTRAND et R. C. BHATTACHARYA, *C. r. Acad. Sci. Paris* **198**, 1823 (1934).
13. G. BERTRAND et R. C. BHATTACHARYA, *Ann. Inst. Pasteur* **55**, 265 (1935).
14. G. BERTRAND et R. VLADESCO, *C. r. Acad. Sci.* **173**, 176 (1921).
15. NGUYEN LUONG THI NGOC SUONG, Thèse Doct. Pharm. (Etat), Toulouse 1967.
16. S. KOSTYTSCHEW et G. MEDWEDEW, *Z. physiol. Chem.* **164**, 77 (1927).
17. S. KOSTYTSCHEW et SUBKOWA, *Hoppe Seylers Z.* **111**, 132 (1920).
18. H. A. KREBS, *Biochem. Z.* **220**, 289 (1930).
19. K. MYRBACK, *Hoppe Seylers Z.* **158**, 160 (1926).
20. C. NEUBERG et J. KERB, *Biochem. Z.* **58**, 158 (1914).
21. B. L. VALLEE, Proc. 4th Int. Congr. Biochemistry, Vienna (1958).
22. D. VINCENT, G. SEGONZAC et G. SESQUE, *Rev. Franç. Etud. Clin. biol.* **6**, 1083 (1961).
23. D. VINCENT, G. SEGONZAC et GHILONI, *Ann. Biol. Clin.* **23**, 1137 (1965a).
24. D. VINCENT et G. SEGONZAC, *Ann. Biol. Clin.* **23**, 353 (1965b).
25. S. L. FRIESS, I. B. WILSON et E. CABIB, *J. Am. chem. Soc.* **76**, 5156 (1954).
26. L. MASSART et R. DUFAIT, *Enzymologie* **6**, 282 (1939).
27. B. MENDEL et H. RUDNEY, *Science* **102**, 616 (1945).
28. D. K. MYERS, *Archs Biochem.* **37**, 469 (1952).
29. D. K. MYERS, *Archs Biochem.* **27**, 341 (1950).
30. D. NACHMANSOHN, *Nature, Lond.* **145**, n°3674, 513 (1950).
31. C. VAN DER MEER, *Nature, Lond.* **171**, 78 (1953).
32. I. B. WILSON et E. CABIB, *J. Am. Soc.* **76**, 5154 (1954).
33. D. NACHMANSOHN et E. LEDERER, *Cr Soc. Biol.* **130**, 321 (1939).
34. D. K. MYERS, *Archs Biochem. Biophys.* **31**, 29 (1951).