

N-Acétylation enzymatique de la tryptamine par des homogénats de cerveaux de *Locusta migratoria* avant et après intoxication par le chlordimeform ou le lindane

Enzymatic N-acetylation of tryptamine by brain homogenates of *Locusta migratoria* before and after intoxication by chlordimeform or lindane

J.-P. Allais, D. Grippo, Brigitte Moreteau et F. Ramade

Laboratoire de Zoologie, Université Paris-Sud, Equipe de recherche Associé au CNRS, no 227, F-91405 Orsay Cedex (France), et Laboratoire d'Endocrinologie, Université de Paris-Sud, F-91405 Orsay Cedex (France), 27 décembre 1978

Summary. Brain homogenates of *Locusta migratoria* are found to possess enzyme capable of catalyzing the N-acetylation of tryptamine. A main product of the enzymatic reaction is isolated and identified as N-acetyltryptamine by chromatography analyse. Both insecticides, chlordimeform and lindane, inhibit enzyme activity. A direct correlation between the degree of intoxication and acetylation of tryptamine is described.

Si de nombreuses amines biogènes: dopamine, adrénaline, noradrénaline, octopamine et hydroxy-5-tryptamine ont été caractérisées chez les insectes¹⁻⁶, on ne connaît que peu de choses sur leur synthèse et leur catabolisme. Certes, une activité monoamineoxydase (MAO) a été trouvée dans le tissu nerveux des blattes^{7,8} mais cette activité est très faible, comparée à celle des vertébrés; seuls les tubes de Malpighi de *Periplaneta americana*⁹ semblent montrer une activité comparable à celle des vertébrés mais il faut souligner que cela n'a jamais été retrouvé dans les autres espèces de blattes.

Par contre, une acétyl-N-transférase transformant la tryptamine en acétyl-N-tryptamine a pu être mise en évidence dans le tissu nerveux de *Drosophila*¹⁰; de même, des systèmes enzymatiques acétylant les indol-alkylamines ont été mis en évidence dans le cerveau de l'abeille *Apis mellifera*¹¹, dans celui de la blatte *P. americana*¹² et depuis peu dans différents tissus de *Locusta migratoria*¹³.

En 1977¹⁴, nous mettions en évidence, par la méthode de Wurtman et Axelrod¹⁵, dans le cerveau de *L. migratoria* une activité enzymatique comparable à celle de la MAO qui se montrait, cependant, assez indifférente vis-à-vis d'inhibiteurs spécifiques de la MAO tels que la pargyline, l'iproniazide ou la nialamide, ce qui impliquait l'existence d'autres voies métaboliques. Nous avons, donc, repris ces expériences afin d'analyser les produits formés et voir quelles interférences pouvaient être observées à la suite d'une intoxication des criquets par le chlordimeform ou le lindane.

Pour cela, nous avons incubé à pH 7,4 de la tryptamine ²¹⁴C (49,6 mCi/mM) en présence de broyats de cerveaux prélevés sur des criquets mâles pris au milieu de leur 5e stade larvaire (0,25 nmoles de tryptamine ²¹⁴C pour 10 cerveaux). Les conditions expérimentales sont les mêmes qu'en 1977¹⁴ mais la solution de toluène contenant les métabolites formés est évaporée sous azote à température ambiante et le résidu repris par l'éther, une partie aliquote servant aux mesures de radioactivité¹⁶, le reste étant chromatographié sur couche mince d'acide silicique (Uniplat Anachem de 250 nm d'épaisseur; phase solvante CH₂Cl₂:MeOH 100/3; migration ascendante de 15 cm) en présence de témoins internes d'acide indole-3-acétique et de son acétate, de tryptophol, d'indole-3-acétaldéhyde, de méthyl-N-tryptamine et d'acétyl-N-tryptamine (obtenu par acétylation de la tryptamine)¹⁷. La radioactivité des produits séparés par la chromatographie sur couche mince est mesurée en prélevant des bandes d'absorbant de 0,25 cm de haut, le support ainsi prélevé étant mis directement dans les fioles à scintillation.

Dans le cas où les larves sont intoxiquées, elles reçoivent une dose de 6 µg de lindane ou de 1,2 mg de chlordimeform (solution acétonique dans les 2 types d'essai) par application topique dans la région mésothoracique à la

base des ptérothèques; les incubations sont effectuées 24 h après l'intoxication, l'état physiologique des larves étant noté.

Dans un premier temps, pensant que la faible transformation de la tryptamine pouvait être due à un temps d'incubation trop court, nous avons testé plusieurs durées - 20, 40 et

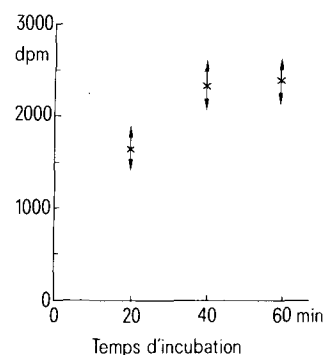


Fig. 1. Activité enzymatique* d'homogénats de cerveaux de *Locusta migratoria* (larves L5) en fonction du temps (min). *L'activité correspond à la radioactivité moyenne (5-6 mesures) retrouvée dans l'acétyl-N-tryptamine après incubation de 10 cerveaux en présence de 0,25 nmoles de tryptamine ²¹⁴C. * Ecart-type à la moyenne.

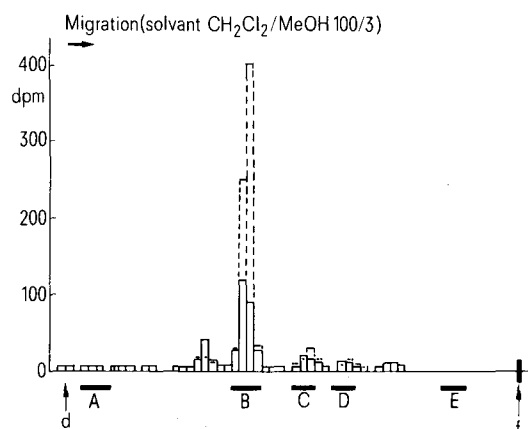


Fig. 2. Chromatographie sur couche mince d'acide silicique des produits de transformation de la tryptamine obtenus par incubation d'homogénats de cerveaux de *Locusta migratoria* (larves L5) en présence de tryptamine ²¹⁴C avant et après intoxication par le lindane. --- Larves L5 non-traitées; — larves L5 traitées par le lindane; d: départ; f: front. Chromatographie avec témoins internes de dérivés de la tryptamine: A: acide indolacétique; B: acétyl-N-tryptamine; C: indol-3-éthanol; D: indol-3-acétaldéhyde; E: ester méthylique de l'acide indolacétique.

60 min. Les radioactivités retrouvées dans les blancs en faisant des incubations en présence de broyats de cerveaux préalablement chauffés à 100 °C restent négligeables quel que soit le temps d'incubation; en effet, elles sont respectivement de 56, 62 et 70 dpm en moyenne. La figure 1 montre une augmentation très nette du rendement entre 20 et 40 min alors qu'elle est négligeable entre 40 et 60 min. Ceci est à rapprocher de ce qui a été obtenu au cours d'incubation de tryptamine avec des broyats de tête chez *P. americana*¹² où, dès la 40e min, on observe une baisse très nette du rendement. Il ne fait aucun doute que l'obtention aussi rapide d'un équilibre entre la tryptamine et ses dérivés est due à ce qu'aucun cofacteur n'a été rajouté au milieu d'incubation et au fait que très rapidement le milieu s'appauvrit en précurseurs intervenant dans les transformations observées.

Comme le montre la figure no 2, aucun composé oxydé de la tryptamine (acide-indole-3-acétique, indole-3-acétaldéhyde) n'a pu être mis en évidence dans le milieu d'incubation et ceci que ce soit après une durée de 20, 40 ou 60 min. Dans tous les cas, nous obtenons un produit majoritaire (90% de la radioactivité retrouvée) qui a été identifié à l'acétyl-N-tryptamine. Les 10% de la radioactivité résiduelle sont du même ordre de grandeur que la radioactivité obtenue quand nous inactivons l'enzyme des broyats de cerveaux en les portant à ébullition. Il s'agit de composés mineurs formés vraisemblablement par voie chimique et non enzymatique.

Ainsi, nous pouvons admettre que le catabolisme de la tryptamine dans le cerveau de *L. migratoria* suit une voie acétylante comme chez *A. mellifera*¹¹ ou *P. americana*¹² opposant ainsi les insectes aux vertébrés. La signification biologique (inactivation de substances physiologiquement actives?) est difficile à cerner dans l'état actuel des recherches car il semble que les insectes soient capables d'acétyler de nombreuses amines: dopamine en acétyl-N-dopamine, tyramine en acétyl-N-tyramine chez *P. americana*¹⁸; dopamine en acétyl-N-dopamine, octopamine en acétyl-N-octopamine, hydroxy-5-tryptamine en acétyl-N-hydroxy-5-tryptamine chez *L. migratoria*¹³. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité MAO dans les cerveaux de *L. migratoria*; ceci est en accord avec ce qui a été trouvé pour les insectes étudiés récemment¹¹⁻¹³, la mise en évidence d'activité MAO chez les insectes^{7,10,19-22} étant due au manque de spécificité des méthodes utilisées. Néanmoins, il semble que les tubes de Malpighi soient capables d'oxyder la tryptamine en acide indole-3-acétique^{9,13}, ce qui pourrait indiquer que l'activité des MAO chez les insectes serait liée à l'excrétion des amines biogènes sous forme oxydée.

La figure 2 fait ressortir que l'intoxication au lindane (ou au chlordimeform) des criquets se traduit par une baisse de l'aptitude que présentent leurs cerveaux à transformer la tryptamine en acétyl-N-tryptamine; par contre, on n'observe pas de déviation du métabolisme. 24 h après les applications topiques de lindane ou de chlordimeform, les criquets ne se trouvent pas tous au même degré d'intoxication (pénétration des produits plus ou moins grande, sensibilité des individus pouvant être différente); pour cela, nous avons réuni les criquets en 3 groupes correspondant chacun à un degré d'intoxication différent: le 1er groupe correspond à des animaux qui, 24 h après l'application topique de lindane ou de chlordimeform présentent une motricité peu ou pas perturbée, le 2e correspond à des insectes atteints d'une profonde ataxie locomotrice ou partiellement paralysés mais présentant encore une activité spontanée, le 3e groupe correspond à des individus paralysés au stade psérique.

Le tableau 1 fait ressortir qu'il y a une corrélation directe entre le degré d'intoxication et l'inhibition de l'acétylation de la tryptamine.

Tableau 1. Evolution de l'acétylation de la tryptamine par des broyats de cerveaux de *Locusta migratoria* en fonction de l'intoxication de ces derniers, par 6 µg de lindane

| | Activité moyenne par cerveau* |
|-------------------------|-------------------------------|
| Témoins | 2400 dpm |
| Animaux du 1er groupe** | 2451 dpm |
| Animaux du 2e groupe | 1761 dpm |
| Animaux du 3e groupe | 789 dpm |

* L'activité correspond à la radioactivité moyenne (5-6 mesures) retrouvée dans l'acétyl-N-tryptamine après incubation de 10 cerveaux en présence de 0,25 nmoles de tryptamine ²¹⁴C pendant 40 min. ** Voir le texte pour la définition des groupes.

Tableau 2. Comparaison de l'influence d'une intoxication au lindane et au chlordimeform sur la N-acétylation de la tryptamine

| | Activité moyenne* par cerveau | Etat physiologique |
|---|----------------------------------|--------------------|
| Témoins | 2500 dpm | |
| Intoxication par chlordimeform (1,2 mg/insecte) | 1590 dpm | 1/10 paralysés |
| Intoxication par lindane (6 µg/insecte) | 744 dpm | 9/10 paralysés |

* Cf. tableau 1.

Cette corrélation directe entre le degré d'intoxication et l'acétylation de la tryptamine se retrouve quand on compare l'action du chlordimeform à celle du lindane (tableau 2). Ce dernier très actif entraîne une diminution d'environ 70% de l'activité de la N-acétylase alors que le premier n'entraîne qu'une diminution de 36%. Cette différence se retrouve également si on observe l'état physiologique des criquets 24 h après leur intoxication: l'action du lindane se traduit par le fait que 9/10 des insectes sont en état psérique alors que celle du chlordimeform se traduit par la présence de 1/10 des individus paralysés.

Les 2 insecticides étudiés agissent sur le métabolisme de la tryptamine et il y a une corrélation directe entre le degré d'intoxication et la transformation en acétyl-N-tryptamine. Dans l'état actuel des recherches, il est difficile de dire quelle est la valeur spécifique de ce qui est observé. L'enzyme qui catalyse la N-acétylation doit jouer un rôle important dans le métabolisme des amines biogènes. Cependant, on ne connaît pas la fonction physiologique de l'enzyme et on ne connaît pas la spécificité de l'action du lindane et du chlordimeform. Dans ce dernier cas, on a suggéré que cet insecticide agissait chez les vertébrés en inhibant la MAO et chez les insectes en inhibant les N-acétylases²³⁻²⁵.

Toutefois, plus récemment, l'étude des constantes d'inhibition de plusieurs formamidines, phénylurées et carbamates, déterminées pour la MAO du foie de rat tend à montrer que, même chez les vertébrés, l'inhibition de la MAO ne serait pas le facteur essentiel dans l'empoisonnement par le chlordimeform. En effet, ces inhibitions se sont avérées réversibles et, en outre, aucune corrélation n'a été trouvée entre l'efficacité de ces inhibiteurs et leur toxicité intrinsèque pour le rat²⁶.

En conclusion, des investigations supplémentaires s'avèrent également nécessaires chez les insectes pour déterminer, dans quelle mesure, les effets d'inhibitions que nous avons observés sont spécifiques des N-acétyltransférases ou si d'autres systèmes enzymatiques sont affectés par le chlordimeform et le lindane. Une étude comparée des constantes d'inhibition des divers isomères du lindane dont le pouvoir insecticide est très variable d'un composé à l'autre, permettrait aussi de préciser le degré de corrélation entre les effets toxiques et celui de l'inhibition des N-acétyltransférases.

- 1 E. Oestlund, *Acta physiol. scand.* 112 (suppl. 31), 1 (1954).
- 2 J.H. Welsh et M. Moorhead, *J. Neurochem.* 6, 146 (1960).
- 3 M. Gersch, F. Fischer, H. Unger et W. Kabitza, *Z. Naturf.* 16B, 351 (1961).
- 4 E.H. Colhoun, *Experientia* 19, 9 (1963).
- 5 L. Hiripi et K. S-Rozsa, *J. Insect Physiol.* 19, 1481 (1973).
- 6 H.A. Robertson et J.E. Steele, *J. Physiol.* 237, 34 P (1974).
- 7 E.H. Colhoun, dans: *Insects and Physiology*. Ed. J.W.L. Beament and J.E. Treherne. Oliver & Boyd, Edinburgh and London 1967.
- 8 H. Blaschko, *Rev. Physiol. biochem. Pharm.* 70, 83 (1974).
- 9 M.C. Boadle et H. Blaschko, *Comp. Biochem. Physiol.* 25, 129 (1968).
- 10 S.A. Dewhurst, S.G. Croker, K. Ikeda et R.E. Mc Caman, *Comp. Biochem. Physiol.* 43, 975 (1972).
- 11 P.H. Evans et P.M. Fox, *J. Insect Physiol.* 21, 343 (1975).
- 12 K. Nishimura, T. Fujita et M. Nakajima, *Pest. Biochem. Physiol.* 5, 557 (1975).
- 13 S. Hayashi, L.L. Murdock et E. Florey, *Comp. Biochem. Physiol.* (C: Comp. Pharmac.) 58, 183 (1977).
- 14 D. Grippo, B. Moreteau et F. Ramade, *C. r. Acad. Sci. Paris* 284, 1079 (1977).
- 15 R.J. Wurtman et J. Axelrod, *Biochem. Pharmac.* 12, 1439 (1963).
- 16 Les comptages sont effectués par scintillation liquide (4 g de PPO et 0,3 g de dimethyl POPOP par l de toluène) avec un appareil SL 30 Intertechnic.
- 17 Tous les produits proviennent de Sigma.
- 18 R.R. Mills, C.R. Lake et W.L. Atworth, *J. Insect Physiol.* 13, 1539 (1966).
- 19 K.D. Chaudhary, U. Srivastava et A. Lemonde, *Biochim. biophys. Acta* 132, 290 (1967).
- 20 H. Blaschko, E.H. Colhoun et N. Frontali, *J. Physiol.* 156, 28p (1961).
- 21 D.K. Hayes, D.B. Wash et M.S. Schechter, *J. Econ. Ent.* 65, 1229 (1972).
- 22 P.W. Atkinson, K.C. Binnington et W.J. Roulston, *J. Aust. ent. Soc.* 13, 207 (1974).
- 23 R.W. Beeman et F. Matsumura, *Pest. Biochem. Physiol.* 4, 325 (1974).
- 24 F. Matsumura et R.W. Beeman, *Envir. Hlth Perspectives* 14, 71 (1976).
- 25 S.A. Aziz et C.O. Knowles, *Nature* 242, 417 (1973).
- 26 R. Neumann et G. Voss, *Experientia* 33, 23 (1977).

The interaction of warfarin with antacid constituents in the gut

J.C. McElnay, D.W.G. Harron, P.F. D'Arcy and P.S. Collier

Department of Pharmacy, The Queen's University of Belfast, Medical Biology Centre, 97 Lisburn Road, Belfast BT9 7BL (N. Ireland), 24 November 1978

Summary. A study was made of the effect of 4 constituents of antacid preparations on the absorption of the coumarin derivate warfarin sodium using an in vitro experimental model. The constituents tested were activated dimethicone (a silicone) magnesium trisilicate, bismuth carbonate and the adsorbant, kaolin. Slight decreased intestinal absorption was shown by magnesium trisilicate (19%) and bismuth carbonate (7%), the other 2 components showing no effects.

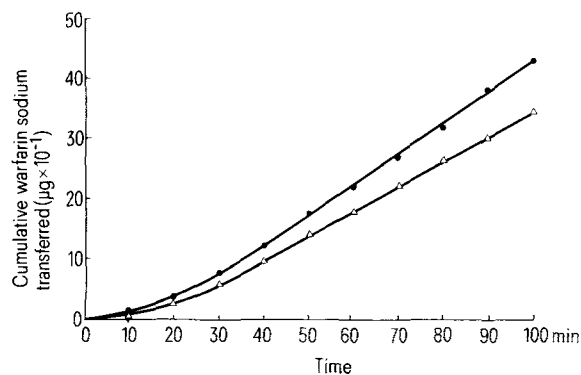
Drug interactions between apparently inert substances and certain groups of drugs giving rise to decreased drug absorption have been well documented¹. The best known interactions of this type are the tetracycline interaction with divalent and trivalent metal ions^{2,3} and digoxin's interaction with antacid constituents^{4,5}. It has been suggested that antacids may also effect the absorption of the anticoagulant warfarin from the gastro-intestinal tract⁶. Studies in human volunteers have since shown no change in the intestinal absorption of warfarin when administered together with both magnesium and aluminium hydroxides^{7,8}. A report by Tolbot and Meade⁹, however, suggested that the decreased absorption of warfarin seen in several patients could be attributed to dimethicone, a constituent in certain cooking oils.

Activated dimethicone is increasingly being used as a constituent in antacid preparations and it was, therefore, important to determine if, and to what extent, an interaction between warfarin and activated dimethicone may occur. The present study also examined the effects of magnesium trisilicate, bismuth carbonate and kaolin on the absorption of warfarin using an in vitro model.

Materials and methods. The study employed an in vitro model of drug interaction in the gut which has already been used in evaluating the tetracycline/metal ion¹⁰ and the digoxin/antacid¹¹ interactions, the results reflecting clinical findings. The technique involved the collection of warfarin absorbed across control and test everted rat intestinal segments by infusion of buffer through the segments. During each experimental run consecutive segments from the same rat were used as the control and test. The segments were bathed in a buffer solution (pH 7.4); the control chamber contained warfarin sodium (20 mg in 120 ml) while the test segment buffer contained the same amount of warfarin plus a clinically equivalent dose of

antacid constituent (table). Infused samples (10 ml) were collected each 10 min for 100 min; the samples were assayed for warfarin content using a fluorimetric technique¹². Each antacid constituent was tested in triplicate and the averaged cumulative absorption values of warfarin in the presence of the antacid constituents were then compared with control absorption values found for warfarin alone (taken as 100%).

Results. The results show that there were small percentage decreases in the cumulative absorption of warfarin when in the presence of magnesium trisilicate (19%) and bismuth carbonate (7%). No such decreases were seen in the cases of



Cumulative absorption profiles of warfarin sodium alone and while in combination with magnesium trisilicate across everted rat intestine. Each point is the average of 3 individual determinations in segments from individual rats. In both cases, as is normal with the technique, a lag period is followed by a period of linear absorption. ●—● warfarin sodium alone (control); △—△ warfarin sodium + magnesium trisilicate (test).