

produced per h per g of wet tissue for CSD activity. They are presented as the mean \pm SEM. Statistical significance is estimated with the Student's t-test.

Results and discussion. The data of experiments 1 and 2 are presented in tables 2 and 3. They show that 3 or 4 weeks feeding (15 g/day) with these diets depressed body weight, and cholesterol plus cholic acid supplementation increased the liver weight as was shown recently⁶.

In the liver, the CNase activity was significantly higher in the control A group than in rats fed the control B diet. Therefore dietary cholic acid enhanced CNase activity. In contrast, when cholic acid and cholesterol were associated in the diet, CNase activity was not increased. The diets containing cholic acid led to a drastic decrease of CSD activity (about 15 μ moles of CO₂ produced per h per g instead of 44 μ moles in rats fed the control B diet). When expressed as μ moles of CO₂ produced per h per liver, CSD activity was higher in chol. rats than in control A rats but was still lower than in control B rats. These results clearly

indicate that cholic acid was responsible for lowering CSD activity. This striking alteration in CSD activity was not associated with an important change in taurine levels although CSD is involved in the major synthetic pathway of taurine in mammals. However it has been pointed out that in rat liver CSD activity does not reflect the taurine concentration^{7,8}. Furthermore, as Awapara has already shown⁹, we observed that dietary cholic acid did not induce change in the liver taurine concentration.

In the kidney, unlike in the liver, cholic acid, whether associated or not with cholesterol, seemed to be without effect on CNase and CSD activities and on the taurine concentration although the taurine concentration was slightly lower in the chol. group than in control A rats.

In this stage of our research, it is impossible to explain the opposite effects of cholic acid on liver CNase and CSD activities and also the effect of cholesterol associated with cholic acid which brought liver CNase activity to its normal level. The effect of cholic acid on biological membranes is known, whereas very little information is available about the action of cholic acid feeding on enzyme activities. However, Tsai and Dyer⁶ reported a depressant effect of cholic acid, or cholic acid plus cholesterol, on some liver enzymes whose activities are correlated with the rate of lipogenesis. From these preliminary results it appears that the use of cholic acid complicates the examination of the effect of cholesterol on CNase and CSD.

Table 3. Summary of experiment 2

	Control A	Control B
Initial body wt (g)	327 \pm 2	327 \pm 2
Final body wt (g)	315 \pm 11	326 \pm 13
Liver wt (g)	12.6 \pm 1.2	12.3 \pm 0.8
Kidneys wt (g)	1.25 \pm 0.09	1.18 \pm 0.11
Liver enzyme activity		
CNase μ moles H ₂ S per h per g	87.5 \pm 3.6 p < 0.01*	58.4 \pm 2.6
CSD μ moles CO ₂ per h per g	14.7 \pm 1.8 p < 0.01*	44.0 \pm 9.6
Kidney enzyme activity		
CNase	18.8 \pm 0.6	18.3 \pm 0.6
CSD	7.12 \pm 2.06	7.26 \pm 1.26
Taurine concentration μ mole/g		
Liver	1.42 \pm 0.07	2.02 \pm 0.27
Kidney	8.47 \pm 0.32	8.68 \pm 0.05

Dietary treatment for 3 weeks. Values are the mean \pm SEM for 3 rats. * Values different from control B.

- 1 This research was supported by INSERM (Contract 78.152.3) and by CEA.
- 2 K. S. McCully, Am. J. clin. Nutr. 28, 542 (1975).
- 3 M. A. Anzano, J. O. Naewbanij and A. J. Lamb, Clin. Chem. 24, 321 (1978).
- 4 D. Deme, O. Durieu-Trautmann and F. Chatagner, Eur. J. Biochem. 20, 269 (1971).
- 5 C. Loriette and F. Chatagner, Experientia 34, 981 (1978).
- 6 A. C. Tsai and I. A. Dyer, J. Nutr. 103, 93 (1973).
- 7 D. G. Spaeth and D. L. Schneider, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 147, 855 (1974).
- 8 C. Loriette, H. Pasantes-Morales, C. Portemer and F. Chatagner, Nutr. Metab. 23, 467 (1979).
- 9 J. Awapara, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 90, 435 (1955).

Effets du sevrage alcoolique sur les activités alcool- et aldéhyde-déshydrogénasiques extra-hépatiques chez le rat¹

Effect of withdrawal from alcohol on extra-hepatic and alcohol- and aldehyde-dehydrogenasic activities in the rat

Y. Lambœuf, G. de Saint Blanquat et R. Derache

Groupe de Recherche sur la Toxicologie des Aliments et des Boissons, INSERM U-87, 2, rue F. Magendie, F-31400 Toulouse (France), 11 juin 1979

Summary. Alcohol- and aldehyde-dehydrogenasic activities have been measured in different tissues; these activities are modified after chronic alcoholic intoxication and/or withdrawal in digestive tract, spleen, kidney and lung. The results underline the possible relationship between extra-hepatic ethyl-oxidation and withdrawal syndrome.

Parmi les différentes voies du catabolisme de l'alcool, tous les auteurs s'accordent pour estimer que la voie des déshydrogénases est prépondérante et que le foie à lui seul aurait une capacité métabolique suffisante pour dégrader la totalité de l'alcool ingéré². Cependant, la répartition des enzymes de l'éthyl-oxydation dans différents tissus est intéressante à étudier: en effet, ces enzymes permettraient, même faiblement, l'éthyl-oxydation, in situ, dans le cerveau, dans

des organes d'absorption, d'excrétion ou de stockage³⁻⁵ et interviendraient dans le métabolisme de composés endogènes comme les catécholamines ou la sérotonine⁶.

Le présent travail a donc pour objet la mesure des activités alcool-déshydrogénasiques et aldéhyde déshydrogénasiques dans le tractus digestif, la rate, le rein, le tissu adipeux, le poumon et le cerveau, comparativement au foie; cette mesure a été réalisée chez des animaux témoins, chez des

Tableau 1. Mesures pondérales à la fin de l'expérience

	Témoins	Alcoolisés	Sevrés	F global
Poids des animaux	413 ± 6,49	311 ± 12,88 ^a	341 ± 10,64 ^{b,c}	50,83***
Poids du foie	15,10 ± 0,690	9,51 ± 0,682 ^a	13,26 ± 0,570 ^c	38,42***
Poids de la rate	0,88 ± 0,024	0,65 ± 0,059 ^a	0,76 ± 0,044	12,92***
Poids des reins	2,93 ± 0,089	2,50 ± 0,106 ^a	2,52 ± 0,082 ^b	13,63***
Poids du tissu adipeux périépididymaire	5,10 ± 0,087	3,06 ± 0,143 ^a	3,26 ± 0,086 ^b	53,11***
Poids des poumons	2,68 ± 0,311	1,97 ± 0,208 ^a	1,96 ± 0,144 ^b	6,37**
Poids du cerveau	1,60 ± 0,072	1,55 ± 0,033	1,50 ± 0,062	1,32 NS

Les résultats sont exprimés en g ± l'erreur-type de la moyenne (Sm). L'analyse statistique (F) est une analyse de variance pour des expériences en blocs casualisés (n = 27). ** p < 0,01; *** p < 0,001; ^a A ≠ T; ^b S ≠ T; ^c S ≠ A; NS: non significatif.

Tableau 2. Activités alcool déshydrogénasiques (surnageant 17000 × g) après 16 semaines d'intoxication alcoolique puis après sevrage pendant 48 h

	Témoins	Alcoolisés	Sevrés	F global
Foie	5693 ± 779,6	7464 ± 1308,1	8491 ± 1235,2	3,09 NS
Estomac	42,0 ± 10,72	65,5 ± 8,64 ^a	63,1 ± 5,91 ^b	7,24**
Intestin	42,7 ± 9,75	122,1 ± 19,03 ^a	58,8 ± 12,11 ^c	17,50***
Rate	2,7 ± 0,58	8,4 ± 1,18 ^a	6,6 ± 1,31 ^b	14,66***
Rein	906,5 ± 135,35	907,1 ± 68,98	760,7 ± 75,55	1,48 NS
Tissu adipeux périépididymaire	95,8 ± 11,37	137,9 ± 26,45	118,1 ± 14,10	1,22 NS
Poumon	15,0 ± 1,42	20,3 ± 3,32	19,1 ± 1,93	1,55 NS
Cerveau	13,4 ± 1,90	19,2 ± 2,49	16,2 ± 2,38	3,28 NS

Les résultats sont exprimés en nM × h⁻¹ × mg de protéines⁻¹ ± l'erreur type de la moyenne (Sm). L'analyse statistique (F) est une analyse de variance pour des expériences en blocs casualisés (n = 27). ** p < 0,01; *** p < 0,001; ^a A ≠ T; ^b S ≠ T; ^c S ≠ A; NS: non significatif.

animaux alcoolisés chroniquement (16 semaines) et chez des animaux sevrés 48 h après cette même période d'alcoolisation.

Conditions expérimentales. 1. Intoxication alcoolique chronique. Nous avons utilisé 27 rats mâles, Sprague-Dawley souche O.F.A., d'un poids moyen de 180 g, répartis par tirage au sort en 3 groupes égaux: T (témoins) A (alcoolisés) et S (alcoolisés puis sevrés). Ils ont été nourris ad libitum avec un régime solide standard (U.A.R.). L'alcoolisation s'est effectuée d'une manière progressive: au début, une boisson à 5% d'éthanol (p/v) a été présentée aux animaux que l'on a en outre traités par voie intragastrique, 2 fois par jour, à la dose de 1 g/kg de poids corporel; pendant 6 semaines, ces quantités ont été progressivement augmentées jusqu'à 15% et 3 g/kg, respectivement; l'apport alcoolique par intubation a alors été réduit puis supprimé au cours des 6 semaines suivantes tandis que la teneur en alcool dans l'eau de boisson était augmentée jusqu'à 30%. Ainsi, les animaux consommaient en fin d'expérience 10,68 ± 0,373 g/kg/jour. Le groupe T recevait de façon similaire des intubations d'eau et avait à sa disposition de l'eau comme boisson. Les animaux ont été sacrifiés 16 semaines après le début de l'intoxication et dans le cas des rats du groupe S, le sevrage avait été effectué par suppression de l'alcool et remplacement par de l'eau pendant les dernières 48 h.

2. Préparation des fractions cellulaires. Immédiatement après la décapitation, il a été prélevé 0,5 g de foie, les muqueuses gastriques et intestinales, la rate, un rein, 1 g de tissu adipeux périépididymaire, 1 g de poumon et le cerveau; ces prises d'essai ont été homogénéisées à +4 °C avec un appareil de Potter dans 5 ml de tampon phosphate 0,15 M pH 7,4, puis centrifugées 10 min à 2000 × g; après décantation, le surnageant a été centrifugé 15 min à 17000 × g et le culot de cette 2e centrifugation (mitochondries) a été homogénéisé dans 5 ml de tampon phosphate 0,15 M pH 7,4 contenant 1% (p/v) de Triton X-100 pour libérer les activités intra-mitochondriales⁷.

3. Méthodes de dosage. L'activité alcool déshydrogénasique a été dosée dans les fractions surnageantes 17000 × g en utilisant la méthode de Raskin et Sokoloff⁸ basée sur le couplage de la réduction de la lactaldéhyde à l'oxydation de l'éthanol à pH 7,6 en présence du couple NAD/NADH et dosage colorimétrique du propanediol formé. L'activité aldéhyde déshydrogénasique a été estimée sur les fractions surnageantes 17000 × g et mitochondriales par le dosage fluorimétrique de l'acide indole-3-acétique produit à partir d'indole-3-acétaldéhyde en présence de NAD, selon la méthode décrite par Deitrich⁹.

L'azote protéique a été dosé dans les différentes fractions cellulaires par la méthode de Johnson¹⁰ après minéralisation sulfurique.

Les résultats sont exprimés dans les tableaux par la moyenne et l'erreur type (Sm) des valeurs expérimentales; les comparaisons statistiques ont été effectuées par analyse de variance pour des expériences en blocs casualisés.

Résultats. Le tableau 1 présente les mesures pondérales effectuées sur les animaux et les organes; le traitement alcoolique entraîne une forte diminution du poids corporel mais le sevrage de 48 h permet une récupération de 42% de la baisse pondérale. Par ailleurs, tous les organes étudiés, sauf le cerveau, diminuent significativement de poids à la suite du traitement alcoolique, et le sevrage assure une réversibilité du phénomène dans le foie et la rate; de plus, nous avons mesuré les teneurs protéiques qui restent statistiquement constantes dans tous les cas.

Le tableau 2 contient les valeurs des activités alcool déshydrogénasiques des différents tissus. Le traitement alcoolique augmente ces activités dans l'estomac, l'intestin et la rate mais le sevrage déclenche un retour vers la normale notamment dans l'intestin.

Les tableaux 3 et 4 présentent les résultats des activités aldéhyde déshydrogénasiques (surnageant 17000 × g et mitochondries); l'intoxication alcoolique élève certaines de ces activités dans le tube digestif et le poumon mais les diminue dans le rein; après le sevrage, ces perturbations enzymatiques ont disparu.

Tableau 3. Activités aldéhyde déshydrogénasiques (surnageant 17000×g) après 16 semaines d'intoxication alcoolique puis après sevrage pendant 48 h

	Témoins	Alcoolisés	Sevrés	F global
Foie	159,4 ± 20,27	117,8 ± 40,66	105,1 ± 20,54	1,84 NS
Estomac	59,5 ± 8,31	55,6 ± 6,59	56,4 ± 8,85	0,10 NS
Intestin	23,2 ± 2,34	45,5 ± 3,05 ^a	16,1 ± 2,72 ^c	27,25***
Rate	12,2 ± 2,31	10,6 ± 1,52	14,9 ± 1,83	2,50 NS
Rein	73,5 ± 11,84	46,8 ± 8,38	69,4 ± 8,12	3,48 NS
Tissu adipeux périépididymaire	41,8 ± 11,22	48,3 ± 12,43	51,1 ± 8,73	0,61 NS
Poumon	18,2 ± 2,08	15,3 ± 1,72	19,9 ± 2,22	1,89 NS
Cerveau	10,0 ± 2,38	9,8 ± 1,84	16,5 ± 0,67	2,16 NS

Les résultats sont exprimés en $\text{nM} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}$ de protéines⁻¹ ± l'erreur type de la moyenne (Sm). L'analyse statistique (F) est une analyse de variance pour des expériences en blocs casualisés (n=27). *** p < 0,001; ^aA ≠ T; ^cS ≠ A; NS: non significatif.

Tableau 4. Activités aldéhyde déshydrogénasiques mitochondriales après 16 semaines d'intoxication alcoolique puis sevrage pendant 48 h

	Témoins	Alcoolisés	Sevrés	F global
Foie	122,3 ± 15,23	127,4 ± 18,82	136,1 ± 11,37	0,41 NS
Estomac	55,8 ± 24,59	109,0 ± 23,23 ^a	48,3 ± 19,58 ^c	4,29*
Intestin	36,3 ± 3,43	42,4 ± 4,92	31,0 ± 5,69	2,84 NS
Rate	38,5 ± 2,63	44,0 ± 3,98	43,2 ± 3,14	1,61 NS
Rein	21,9 ± 2,46	16,0 ± 1,61 ^a	14,9 ± 1,84 ^b	7,09**
Tissu adipeux périépididymaire	50,7 ± 6,84	68,4 ± 20,46	61,7 ± 10,83	0,82 NS
Poumon	33,8 ± 7,63	45,5 ± 7,84 ^a	26,1 ± 4,12 ^c	4,04**
Cerveau	30,1 ± 5,68	22,6 ± 3,16	23,5 ± 3,17	1,91 NS

Les résultats sont exprimés en $\text{nM} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}$ de protéines⁻¹ ± l'erreur type de la moyenne (Sm). L'analyse statistique (F) est une analyse de variance pour des expériences en blocs casualisés (n=27). * p < 0,05; ** p < 0,01; ^aA ≠ T; ^bS ≠ T; ^cS ≠ A; NS: non significatif.

Discussion. Les diminutions pondérales notées après 16 semaines de traitement alcoolique sont un reflet global de l'ensemble des perturbations induites par l'éthanol. Dans le cas de régimes avec substitution des calories glucidiques par des calories alcooliques et comparaison à des témoins 'pair-fed', on observe une augmentation du poids du foie, accompagnée d'élévations des teneurs lipidiques et protidiques¹¹. Lorsque l'alcool est donné dans la boisson, le régime solide étant par ailleurs normal, on observe une diminution du poids du foie¹²; dans notre cas où la teneur en alcool atteint 30% de la solution de boisson, cette diminution est très importante et le contenu protéique diminue d'autant. La réversion de ce phénomène qui est très précoce pour le foie, comparativement aux autres organes, dès la suppression de la boisson, indique une capacité de réparation rapide de l'organisme malgré l'intoxication alcoolique sévère.

A propos de l'alcool déshydrogénase, nos résultats indiquent une large répartition tissulaire et des organes tels que le cerveau, le tissu adipeux, le poumon ou le tube digestif présentent une activité intéressante même par rapport au foie ou au rein; de tels résultats ont déjà été obtenus par

Fazekas et Rengei⁴ dans le rein et par Raskin et Sokoloff⁶ dans le cerveau. L'aldéhyde déshydrogénase est également très répandue dans les divers tissus étudiés comme l'a déjà noté Deitrich⁹ mais le foie reste le lieu principal du catabolisme de l'alcool.

A la suite de l'intoxication alcoolique chronique, la capacité métabolique du foie (quantité d'enzyme pour l'organe entier), malgré une légère augmentation de la teneur en alcool déshydrogénase, baisse par diminution de la masse hépatique; ainsi, les quantités d'alcool non utilisées par le foie seraient-elles plus grandes et le métabolisme extra-hépatique plus sollicité; ceci induirait alors les altérations métaboliques mesurées dans les autres tissus.

Après le sevrage, les modalités de retour à la normale, à la fois des teneurs enzymatiques et de la masse des organes, entraînent, notamment pour le foie, une augmentation de la capacité alcool déshydrogénasique; compte tenu de la récupération rapide de cette activité, le rapport alcool déshydrogénase/aldéhyde déshydrogénase serait perturbé augmentant ainsi l'acétaldéhyde libre dont la réactivité avec des neuroamines¹³ serait à l'origine de divers signes de la toxicité de l'alcool et du syndrome de retrait¹⁴⁻¹⁷.

- 1 Ce travail a été réalisé avec l'aide financière de l'INSERM (ATP 75/5/412/49) et de l'IREB.
- 2 E. Rubin et C.S. Lieber, *Prog. Liver Dis.* 4, 549 (1972).
- 3 E. Schmidt et F.W. Schmidt, *Klin. Wschr.* 38, 957 (1960).
- 4 I.G. Fazekas et B. Rengei, *Enzymologia* 34, 231 (1968).
- 5 V.G. Erwin et R.A. Deitrich, *Biochem. Pharmac.* 21, 2915 (1972).
- 6 R.A. Deitrich, *Psychoneuroendocrinology* 1, 325 (1976).
- 7 T. Koivula, M. Koivusalo et K. Lindros, *Biochem. Pharmac.* 24, 1807 (1975).
- 8 N.H. Raskin et L. Sokoloff, *J. Neurochem.* 15, 1677 (1970).
- 9 R.A. Deitrich, *Biochem. Pharmac.* 15, 1911 (1966).
- 10 M.J. Johnson, *J. Biol. Chem.* 137, 575 (1941).

- 11 E. Baroana, M.A. Leo, S.A. Borowsky et C.S. Lieber, *J. clin. Invest.* 60, 546 (1977).
- 12 R.G. Thurman et R. Scholz, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 357, 1443 (1976).
- 13 V.E. Davis et M.J. Walsh, *Science* 167, 1005 (1970).
- 14 R.A. Deitrich et C. Siew, dans: *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems*, vol. 1, p. 125. Academic Press, New York 1974.
- 15 F.A. Seixas, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 215, 89 (1973).
- 16 E.B. Truitt et M.J. Walsh, dans: *Biology of Alcoholism*, vol. 1, p. 161. Plenum Press, New York 1971.
- 17 E.D. Myers, *Alcoholism: clin. exp. Res.* 2, 145 (1978).