

Influence du cadmium sur le métabolisme du calcium. Action sur le cytochrome P₄₅₀

Influence of cadmium on calcium metabolism. Effect on cytochrome P₄₅₀

A. M. Casanovas, M. J. Fauran-Clavel et J. Oustrin

Laboratoire de Biophysique, Faculté de Pharmacie, 31 allées Jules Guesde, F-31000 Toulouse (France), 2 avril 1980

Summary. Oral administration of cadmium to female rats for 6 weeks does not reduce the microsomal cytochrome P₄₅₀ levels in the liver and kidneys, nor the cytochrome P₄₅₀ content in the renal mitochondria.

Dans des travaux précédents¹ les auteurs ont montré que la diminution de l'absorption active du calcium par l'intestin consécutive à l'administration de cadmium² pouvait être corrigée par la 1,25 dihydroxyvitamine D₃(1,25(OH)₂D₃) du moins en ce qui concerne l'effet sur l'activité ou le turnover du transporteur. Dès lors au moins 2 hypothèses peuvent être formulées: a) les effets du cadmium sur le transporteur du calcium pourraient résulter d'une interaction directe au niveau de la "calcium binding protein"; b) les résultats obtenus pourraient traduire un effet indirect du cadmium sur la biosynthèse de la ou des protéines de transport du calcium dépendantes de la 1,25(OH)₂D₃. In vivo, ce métabolite de la vitamine D₃ résulte d'une 25 hydroxylation par la fraction microsomale du foie suivie d'une 1a-hydroxylation dans les mitochondries du cortex rénal, les hydroxylases de la vitamine D₃ étant toutes des oxygénases à fonction mixte et la 1a-hydroxylase étant clairement un système à cytochrome P₄₅₀. Étant donné l'accumulation préférentielle du cadmium au niveau du foie et du rein^{3,4} les auteurs se sont proposés dans le présent travail d'étudier chez des rats intoxiqués par le cadmium l'influence de ce métal sur le taux de cytochrome P₄₅₀ dans les fractions microsomales du foie et du rein et dans la fraction mitochondriale rénale.

Matériel et méthodes. Animaux et traitement. Les rats femelles de souche Wistar âgés d'environ deux mois reçoivent quotidiennement pendant 6 semaines, 6 jours sur 7, par sondage gastrique, une dose de cadmium de 8 mg par kg de poids corporel sous forme d'acétate de cadmium. Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale.

Microsomes. Les microsomes ont été isolés par la méthode d'Omura et Sato⁵. Le foie et les reins de l'animal sont lavés et homogénéisés dans un tampon composé de KCl à 150 g/l, d'EGTA 0,1 mM et de Tris 0,38 mM. L'homogénat est centrifugé à 15 000 × g pendant 10 min, le surnageant récupéré est centrifugé à 105 000 × g pendant 1 h. Le culot microsomal résultant est mis en suspension en vue de la mesure spectrométrique différentielle; les 2 cuves reçoivent quelques mg de dithionite de sodium et, dans la cuve de mesure seule, la solution est saturée en CO. Le taux de cytochrome P₄₅₀ est déterminé à partir de la variation de densité optique entre 450 et 490 nm et de son coefficient d'extinction molaire égal à 91 mM⁻¹ cm⁻¹. Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Lowry et al.⁶.

Mitochondries. Les mitochondries de rein ont été préparées par une méthode décrite par Pederson et al.⁷. Nous pratiquons une perfusion des reins *in situ* en injectant une solution de NaCl à 0,9% dans les artères rénales, jusqu'à ce que le tissu soit complètement blanchi⁸. Le tissu est homogénéisé dans un tampon et centrifugé 2 fois à 600 × g pendant 15 min; les 2 surnageants obtenus sont centrifugés à 4600 × g pendant 15 min. Le culot mitochondrial est mis en suspension et recentrifugé 3 fois, la dernière centrifugation étant faite à 18 400 × g. Les mesures spectrométriques différentes sont effectuées selon la méthode mise au point par Ghazarian et al.⁹: chaque cuve contient 2,5 ml de solution mitochondriale, dans la cuve de référence on ajoute 10 µl d'antimycine A, 25 µl d'ascorbate 1 M pH 7, 30 µl de TMPD 15 mM, la cuve servant d'échantillon reçoit

10 µl de malate 1 M pH 7, 25 µl d'ascorbate 1 M pH 7, 30 µl d'eau. Les 2 cuves sont ensuite saturées en CO. Le taux de cytochrome P₄₅₀ est déterminé à partir de son coefficient d'extinction molaire déjà mentionné ci-dessus.

Résultats et discussion. Les résultats obtenus pour les microsomes de foie et des reins de rats ayant reçu le cadmium sont portés dans les tableaux 1 et 2. La comparaison entre les valeurs des animaux témoins et traités ne montre pas de différence significative. Dans le foie on note cependant une augmentation d'environ 16% de la concentration en cytochrome P₄₅₀ après 6 semaines d'intoxication. Dans les mitochondries du tissu rénal (tableau 3) les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative entre les taux de cytochrome P₄₅₀ des témoins et des animaux traités pendant 6 semaines par le cadmium. Un résultat identique a été obtenu par Becking¹⁰ sur des rats intoxiqués à 200 ppm pendant 180 jours, ainsi que par Hietanen¹¹ sur des rats mâles recevant le cadmium à raison de 250 ppm pendant 2 ou 8 semaines. Nos résultats montrent que l'administration de cadmium par voie orale pendant 6 semaines n'affecte pas le taux de cytochrome P₄₅₀ des microsomes de foie et de reins chez le rat. Par contre

Tableaux 1 et 2. Concentration de cytochrome P₄₅₀ dans les microsomes de foie et de reins après administration de cadmium

Tableau 1.

Cytochrome P ₄₅₀	Foie nM/mg de protéines (M ± SE)	nM/g de tissu (M ± SE)
Témoins (N = 7)*	0,238 ± 0,018	2,99 ± 0,318
Traités (N = 10)*	0,282 ± 0,022	3,46 ± 0,314

Tableau 2.

Cytochrome P ₄₅₀	Rein nM/mg de protéines (M ± SE)	nM/g de tissu (M ± SE)
Témoins (N = 7)*	0,0567 ± 0,0056	0,67 ± 0,08
Traités (N = 10)*	0,0583 ± 0,0064	0,78 ± 0,08

* Nombre de mesures. La comparaison des moyennes a été effectuée à l'aide du t de Student dans les conditions d'application de ce test.

Tableau 3. Concentration de cytochrome P₄₅₀ dans les mitochondries du cortex rénal après administration de cadmium

Cytochrome P ₄₅₀	Rein nM/mg de protéines (M ± SE)	nM/g de tissu (M ± SE)
Témoins (N = 6)*	0,0226 ± 0,0015	0,454 ± 0,038
Traités (N = 5)*	0,0209 ± 0,002	0,360 ± 0,062

* Nombre de mesures. La comparaison des moyennes a été effectuée à l'aide du t de Student dans les conditions d'application de ce test.

d'autres auteurs¹²⁻¹⁴ ont mesuré une diminution importante du taux de cytochrome P₄₅₀ dans les microsomes hépatiques lorsque le cadmium est administré par voie i.p. en une seule dose. Au niveau des mitochondries du cortex rénal où la 1 α -hydroxylation de la 25 hydroxyvitamine D₃ s'effectue, aucune différence dans les taux de cytochrome P₄₅₀ entre animaux témoins et traités n'a pu être mise en évidence. Cependant Lorentzon¹⁵ trouve que la conversion de 1,25 (OH)₂D₃ dans les reins après administration de 25 hydroxy 26, 27 méthyl ³H cholécalciférol est très diminuée chez des rats femelles soumis à un régime normal en calcium et intoxiqués chroniquement par le cadmium per os. Kimura¹⁶ montre in vivo que, chez des rats soumis pendant 3 semaines à un régime pauvre en calcium et vitamine D contenant 300 ppm de cadmium, cette réaction d'1 α -hy-

droxylation du 25 (OH) D₃ s'effectue. En outre Suda⁷ montre que, in vitro, l'addition de 0,025 mM de CdCl₂ inhibe complètement l'activité de la 25 (OH) D₃ 1 hydroxylase dans les mitochondries de reins de poulets, mais que chez des rats soumis à un régime pauvre en vitamine D, l'hydroxylation du C₁ du 25 (OH) D₃ se faisait même si les animaux recevaient des quantités importantes de cadmium. Ces résultats conduisent les auteurs à envisager la protection possible vis à vis du cadmium par la "cadmium binding protein" dont la synthèse est induite lors de l'administration continue de cadmium^{10,17,18} ce métal étant pratiquement sans effet sur les hydroxylases de la vitamine D₃. Conformément à divers travaux¹⁹⁻²³ un effet direct du cadmium sur la "calcium binding protein" apparaît dès lors vraisemblable.

- 1 M.J. Fauran-Clavel, Thèse Doctorat, Pharmacie No 111, Toulouse 1979.
- 2 M.J. Fauran, J. Oustrin and F. Fauran, Toxic. appl. Pharmac. 50, 95 (1979).
- 3 M. Valéro, Thèse, 3^{ème} cycle No 2230, Toulouse 1979.
- 4 F. Caujolle, J. Oustrin and G. Silvemamy, Eur. J. Toxic. 4, 310 (1971).
- 5 T. Omura and R. Sato, J. biol. Chem. 239, 2370 (1974).
- 6 O. Lowry and N. Rosebrough, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).
- 7 J. Pedersen, J.G. Ghazarian, R. Orme Johnson and H.F. De Luca, J. biol. Chem. 252, 3933 (1976).
- 8 K.M. Botham, Y. Tanaka and H.F. De Luca, Biochemistry 13, 4961 (1974).
- 9 J.G. Ghazarian, C.R. Jefcoate, J.C. Knutson, H. Milliam, R. Orme-Johnson and H.F. De Luca, J. biol. Chem. 249, 3026 (1974).
- 10 G. Becking, Med. Clin. North Am. 60, 813 (1976).
- 11 E. Hietanen, Arch. environ. Contam. Toxic. 7, 291 (1978).
- 12 W. Hadley, T. Miya and W. Bousquet, Toxic. appl. Pharmac. 28, 284 (1974).
- 13 R. Craig Schnell, Fed. Proc. 37, 28 (1978).
- 14 M. Sagai, F. Shiraishi and K. Kentaro, Jap. J. Hyg. 32, 463 (1977).
- 15 R. Lorentzon and S.E. Larsson, Clin. Sci. molac. Med. 53, 439 (1977).
- 16 M. Kimura, N. Otaki, S. Yoshiki, M. Suzuki, N. Horiuchi and T. Suda, Archs Biochem. Biophys. 165, 340 (1974).
- 17 T. Suda, N. Horiuchi, E. Ogata, I. Ewaza, N. Otaki and M. Kimura, Febs Letters 42, 23 (1974).
- 18 F. Kotsonis and C. Klaassen, Toxic. appl. Pharmac. 46, 39 (1978).
- 19 R. Ingersoll and R. Wasserman, J. biol. Chem. 246, 2808 (1971).
- 20 N. Sugawara, Jap. J. Hyg. 29, 399 (1974).
- 21 N. Sugawara, Bull. environ. Contam. Toxic. 14, 653 (1975).
- 22 P. Wasako and R. Cousins, J. Nutr. 107, 5920 (1977).
- 23 R. Corradino dans: Vitamin D. Basic Research and its Clinical Application, p. 731. Ed. A.W. Norman. Walter de Gruyter, Town 1979.

Relationship between the enantiomeric composition of α -pinene in host trees and the production of verbenols in *Ips* species¹

D. Klimetzek and W. Francke

Forstzoologisches Institut der Universität, D-78 Freiburg/Br. (Federal Republic of Germany), and Institut für Organische Chemie der Universität, D-2 Hamburg (Federal Republic of Germany), 29 February 1980

Summary. Upon exposure to the vapours of oleoresin from 8 conifers, bark beetles *Ips typographus* and *I. amitinus* produced verbenol, a terpene alcohol, in a predictable pattern. Apparently, this pattern changed in relation to the varied enantiomeric composition of the α -pinene contained in the resin of the various coniferous species. For calibration, defined mixtures of (+)- and (-)- α -pinene were used to establish the different levels of beetle response in the production of cis- and trans-verbenol. Methodical and ecological implications of the phenomenon are discussed.

Derivatives of monoterpene hydrocarbons may act as important signals in the chemical communication systems of bark beetle species feeding in the phloem tissue of conifers². For instance, several species of the genus *Ips* use 2-methyl-6-methylene-2,7-octadien-4-ol (ipsdienol) and 2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-en-4-ol (verbenol) as components of their aggregation pheromone³.

Hughes⁴ found ipsdienol in male *Ips paraconfusus* Lanier after exposure to vapours of 2-methyl-6-methylene-2,7-octadiene (myrcene), a host plant monoterpene. Also, quantitative relations between myrcene concentration and ipsdienol production have been reported recently⁵.

I. paraconfusus selectively converts the enantiomers of 2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene (α -pinene) to diastereomeric isomers of verbenol⁶ and the same phenomenon has since been observed in other species⁷ suggesting

the existence of oxidase systems generating hydroxyl groups in the allyl position of certain host terpenes. Whereas under natural conditions the oxygenation of myrcene appears to be restricted to males only, the occurrence of the verbenols does not seem to be sex specific.

The object of this study was to quantify the relationship which seems to exist between the enantiomeric ratios of the α -pinene contained in the oleoresin of the various conifers and the verbenols produced by the *Ips* beetles upon exposure to the resinous vapours. Our work, however, did not intend to investigate possible routes of verbenol biosynthesis as the verbenols may be produced by direct conversion of α -pinene or de novo upon pinene induction and, possibly, also by associated microorganisms⁸.

Materials and methods. Beetles of *Ips typographus* (L.)