

## Influence du cadmium sur le métabolisme du calcium. Action sur le cytochrome P<sub>450</sub>

### Influence of cadmium on calcium metabolism. Effect on cytochrome P<sub>450</sub>

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 P<sub>450</sub> levels in the liver and kidneys, nor the cytochrome P<sub>450</sub> content in the renal mitochondria.

Dans des travaux précédents<sup>1</sup> les auteurs ont montré que la diminution de l'absorption active du calcium par l'intestin consécutive à l'administration de cadmium<sup>2</sup> pouvait être corrigée par la 1,25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) 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)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. In vivo, ce métabolite de la vitamine D<sub>3</sub> résulte d'une 25 hydroxylation par la fraction microsomale du foie suivie d'une 1 $\alpha$ -hydroxylation dans les mitochondries du cortex rénal, les hydroxylases de la vitamine D<sub>3</sub> étant toutes des oxygénases à fonction mixte et la 1 $\alpha$ -hydroxylase étant clairement un système à cytochrome P<sub>450</sub>. Etant donné l'accumulation préférentielle du cadmium au niveau du foie et du rein<sup>3</sup>,<sup>4</sup> 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 P<sub>450</sub> 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 Sato<sup>5</sup>. 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 15000  $\times$  g pendant 10 min, le surnageant récupéré est centrifugé à 105000  $\times$  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 P<sub>450</sub> 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<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Lowry et al.<sup>6</sup>

**Mitochondries.** Les mitochondries de rein ont été préparées par une méthode décrite par Pederson et al.<sup>7</sup>. 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 blanchi<sup>8</sup>. Le tissu est homogénéisé dans un tampon et centrifugé 2 fois à 600  $\times$  g pendant 15 min; les 2 surnageants obtenus sont centrifugés à 4600  $\times$  g pendant 15 min. Le culot mitochondrial est mis en suspension et recentrifugé 3 fois, la dernière centrifugation étant faite à 18400  $\times$  g. Les mesures spectrométriques différentielles sont effectuées selon la méthode mise au point par Ghazarian et al.<sup>9</sup>: chaque cuve contient 2,5 ml de solution mitochondriale, dans la cuve de référence on ajoute 10  $\mu$ l d'antimycine A, 25  $\mu$ l d'ascorbate 1 M pH 7, 30  $\mu$ l de TMPD 15 mM, la cuve servant d'échantillon reçoit

10  $\mu$ l de malate 1 M pH 7, 25  $\mu$ l d'ascorbate 1 M pH 7, 30  $\mu$ l d'eau. Les 2 cuves sont ensuite saturées en CO. Le taux de cytochrome P<sub>450</sub> 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 P<sub>450</sub> 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 P<sub>450</sub> des témoins et des animaux traités pendant 6 semaines par le cadmium. Un résultat identique a été obtenu par Becking<sup>10</sup> sur des rats intoxiqués à 200 ppm pendant 180 jours, ainsi que par Hietanen<sup>11</sup> 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 P<sub>450</sub> des microsomes de foie et de reins chez le rat. Par contre

Tableaux 1 et 2. Concentration de cytochrome P<sub>450</sub> dans les microsomes de foie et de reins après administration de cadmium

Tableau 1.

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

Tableau 2.

Cytochrome P <sub>450</sub>	Rein nM/mg de protéines (M $\pm$ SE)	nM/g de tissu (M $\pm$ SE)
Témoins (N = 7)*	0,0567 $\pm$ 0,0056	0,67 $\pm$ 0,08
Traités (N = 10)*	0,0583 $\pm$ 0,0064	0,78 $\pm$ 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 P<sub>450</sub> dans les mitochondries du cortex rénal après administration de cadmium

Cytochrome P <sub>450</sub>	Rein nM/mg de protéines (M $\pm$ SE)	nM/g de tissu (M $\pm$ SE)
Témoins (N = 6)*	0,0226 $\pm$ 0,0015	0,454 $\pm$ 0,038
Traités (N = 5)*	0,0209 $\pm$ 0,002	0,360 $\pm$ 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 auteurs<sup>12-14</sup> ont mesuré une diminution importante du taux de cytochrome P<sub>450</sub> 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 $\alpha$ -hydroxylation de la 25 hydroxyvitamine D<sub>3</sub> s'effectue, aucune différence dans les taux de cytochrome P<sub>450</sub> entre animaux témoins et traités n'a pu être mise en évidence. Cependant Lorentzon<sup>15</sup> trouve que la conversion du 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dans les reins après administration de 25 hydroxy 26, 27 méthyl <sup>3</sup>H cholécalférol est très diminuée chez des rats femelles soumis à un régime normal en calcium et intoxiqués chroniquement par le cadmium per os. Kimura<sup>16</sup> 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 $\alpha$ -hy-

droxylation du 25 (OH) D<sub>3</sub> s'effectue. En outre Suda<sup>7</sup> montre que, in vitro, l'addition de 0,025 mM de CdCl<sub>2</sub> inhibe complètement l'activité de la 25 (OH) D<sub>3</sub> 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 C<sub>1</sub> du 25 (OH) D<sub>3</sub> 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<sup>10,17,18</sup> ce métal étant pratiquement sans effet sur les hydroxylases de la vitamine D<sub>3</sub>. Conformément à divers travaux<sup>19-23</sup> 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<sup>ème</sup> 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. Sugaï, F. Shiraishi and K. Kentaro, Jap. J. Hyg. 32, 463 (1977).
- 15 R. Lorentzon and S.E. Larsson, Clin. Sci. molec. 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 $\alpha$ -pinene in host trees and the production of verbenols in *Ips* species<sup>1</sup>

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  $\alpha$ -pinene contained in the resin of the various coniferous species. For calibration, defined mixtures of (+)- and (-)- $\alpha$ -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 conifers<sup>2</sup>. 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 pheromone<sup>3</sup>.

Hughes<sup>4</sup> 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 recently<sup>5</sup>.

*I. paraconfusus* selectively converts the enantiomers of 2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene ( $\alpha$ -pinene) to diastereomeric isomers of verbenol<sup>6</sup> and the same phenomenon has since been observed in other species<sup>7</sup> 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -pinene or de novo upon pinene induction and, possibly, also by associated microorganisms<sup>8</sup>.

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