

VARIATIONS ENZYMATIQUES DANS LE PLASMA DU RAT APRÈS INJECTION D'UNE DOSE RADIOPROTECTRICE DE CYSTEAMINE

G. PLOMTEUX, M. L. BEAUMARIAGE, Z. M. BACQ et C. HEUSGHEM

Laboratoire de Toxicologie; Laboratoire de Radiobiologie, Laboratoire de Recherches pour la Protection des Populations civiles, Université de Liège, Belgique

(Received 19 December 1966; accepted 28 January 1967)

Abstract—Various intracellular enzymes (TGO, LDH, MDH, GIDH, β /glycuronidase) have been titrated in the plasma of adult rats after an i.p. injection of 100 mg/kg of cysteamine (base). A large increase in the level of these enzymes is observed after 25 min; the maximum is reached in 2 hr; normal levels are observed after 6 hr. Regular variations in the LDH isoenzymes have not been seen, but in a number of rats a doubling of the fifth fraction has been observed in late (4 or 6 hr) plasma samples.

These facts show that a large radioprotective dose of cysteamine induced an intense and rapid, but easily reversible, cellular "shock"; they are compatible with the observations of various authors using electron microscopy.

CHEZ le rat, l'injection de substances radioprotectrices à fonction SH ou S-S provoque, en quelques minutes, de gros troubles métaboliques et de graves lésions des mitochondries et du réticulum endoplasmique, nettement visibles en microscopie électronique.^{1, 2} Ces lésions sont réversibles 90 à 120 min après leur apparition. Le présent travail a pour objectif de déterminer si cette atteinte cellulaire se traduit par le passage de certains enzymes hépatiques dans le plasma. Pour cela, nous avons déterminé l'évolution de l'activité plasmatique de la déshydrogénase lactique (localisation cytoplasmique), de la déshydrogénase glutamique (localisation exclusivement mitochondriale), de la déshydrogénase malique et de la transaminase glutamique oxaloacétique (localisation double, mitochondriale et cytoplasmique) et enfin de la β -glycuronidase, enzyme lysosomiale.

MATERIEL ET METHODES

L'expérimentation a été réalisée sur des rats mâles Wistar de souche pure, de 180 à 200 g. Huit groupes d'au moins 30 rats ont été étudiés: des témoins et 7 groupes saignés 10, 25, 45, 60, 120, 240 et 360 min après l'administration intrapéritonéale de cystéamine.

Nous insistons sur le grand nombre de rats utilisés pour ce travail. Ce nombre de trente est déterminé par la variabilité des activités enzymatiques du plasma des rats témoins; quelques observations préalables nous ont appris que cette variabilité est bien plus grande encore chez des rats d'un autre élevage de moindre qualité. Les animaux reçoivent une injection intrapéritonéale de 100 mg/kg de cystéamine* calculés en base (la solution de chlorhydrate est préalablement neutralisée par NaOH

* Nous remercions la firme Bracco de Milan d'avoir mis gracieusement la cystéamine à notre disposition.

N); le sang est prélevé par ponction cardiaque sous anesthésie à l'éther. Les témoins reçoivent une injection de solution saline.

Techniques de dosage

- (1) *La transaminase glutamique oxaloacétique (TGO).* Le dosage est réalisé à l'auto-analyseur suivant la méthode colorimétrique à la 2-4 dinitrophénylhydrazine en milieu alcalin.³
- (2) *La déshydrogénase lactique (LDH).* La diminution d'extinction résultant de la transformation du NADH en NAD, en présence de pyruvate est mesurée à 340 m μ .

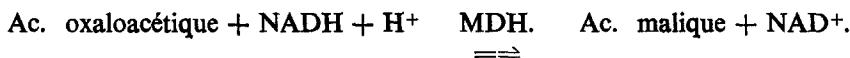


Ce dosage se fait à l'auto-analyseur.⁴

- (3) *Les isoenzymes de la déshydrogénase lactique.* Nous avons appliqué la technique de fractionnement de Wieme. Les différentes fractions sont révélées par réduction d'un sel de tétrazolium par le NADH formé dans la réaction enzymatique.



- (4) *La déshydrogénase malique (MDH).* La déshydrogénase malique catalyse la réaction:



L'activité de la déshydrogénase malique est fonction de la chute de densité optique, mesurée à 366 m μ . Ce dosage est réalisé avec les pochettes de tests enzymatiques Boehringer, au spectrophotomètre Zeiss.⁶

- (5) *La déshydrogénase glutamique (GIDH).* La mesure de l'activité de la déshydrogénase glutamique du sérum est basée sur la diminution de la densité optique à 366 m μ , en présence d' α -cétoglutarate et d'acétate ammonique:



Comme pour la déshydrogénase malique, les dosages ont été effectués au spectrophotomètre Zeiss, avec des pochettes de tests enzymatiques Boehringer.⁷

- (6) *La β -glycuronidase.* Le plasma est incubé, à 37°C et à l'abri de l'air, en présence de glycuronide de phénolphthaléine pendant 16 h. Après incubation, la réaction enzymatique est bloquée par addition de tampon-glycine de pH 10,4; il se développe une coloration rouge proportionnelle à la quantité de phénolphthaléine libérée à partir du substrat hydrolysé. La coloration est mesurée au colorimètre Bausch et Lomb à 540 m μ .⁸

RESULTATS

L'estimation de l'activité plasmatique de différents enzymes après administration intrapéritonéale de cystéamine chez le rat, nous a permis d'observer les faits suivants (Tableau 1 et Fig. 1).

- (1) L'activité de la TGO augmente de façon significative chez les rats saignés 25, 45, 60, 120 min après l'injection de cystéamine. La valeur de cet enzyme redescend

normale chez les rats 240 et 360 min après l'administration de la substance radioprotectrice.

- (2) La valeur de la LDH est statistiquement différente des valeurs normales chez les animaux ponctionnés 25, 45, 60, 120, 240 min après l'injection de cystéamine. Elle est redevenue normale après 360 min.
- (3) La MDH augmente beaucoup plus rapidement. Après 10 min, sa valeur est déjà statistiquement différente de celle des rats témoins. Après 240 et 360 min, elle est redevenue normale.

TABLEAU 1. INFLUENCE DE LA CYSTÉAMINE SUR CERTAINS ENZYMES PLASMATIQUES

Enzyme étudié	Rats témoins	Temps après l'administration intraperitoneale de la substance radioprotectrice (min)						
		10	25	45	60	120	240	360
TGO en unités Reitman-Frankel	50,7	71,2	95,4*	122*	134,3*	178,1*	62	70,9
LDH en unités Wroblewski	170,3	190,2	325*	340*	462,4*	599,1*	312,7*	187,4
MDH en unités internationales	62,3	163*	222*	225*	368,2*	420,3*	48,4	69,7
β -glycuronidase en unités Sigma	160	162	228*	303*	375*	425*	300,2*	159,3
GIDH en unités internationales	0,46	0,34	0,94	2,42*	4,74*	5,28*	3,79*	0,87

* Moyenne arithmétique statistiquement différente de la valeur contrôle (rats témoins). L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du test *t* de Student.

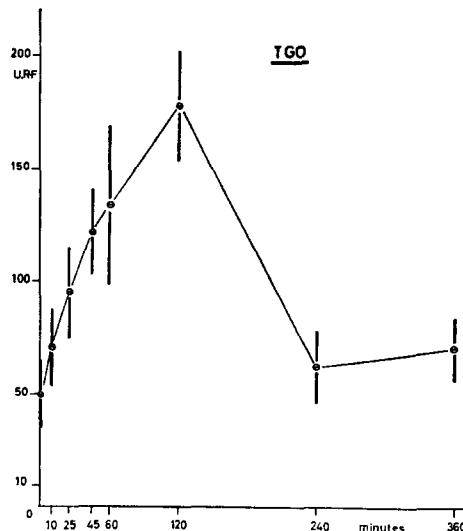


FIG. 1(a)

FIG. 1. Influence de la cystéamine sur certains enzymes plasmatiques.
Nous donnons aussi dans cette figure, ainsi que dans les figures 1 (b), (c), (d), (e), l'écart standard (σ) calculé pour chaque série de rats et pour chaque enzyme.

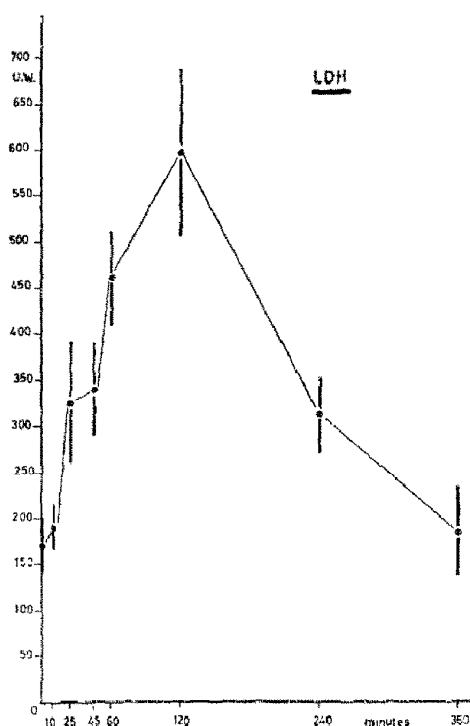


FIG. 1(b)

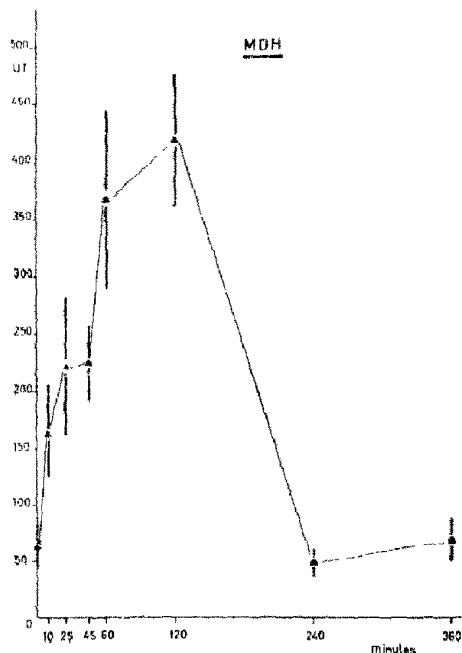


FIG. 1(c)

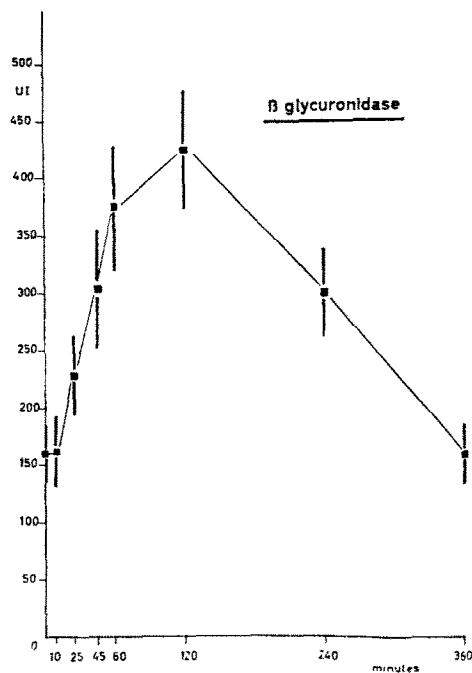


FIG. 1(d)

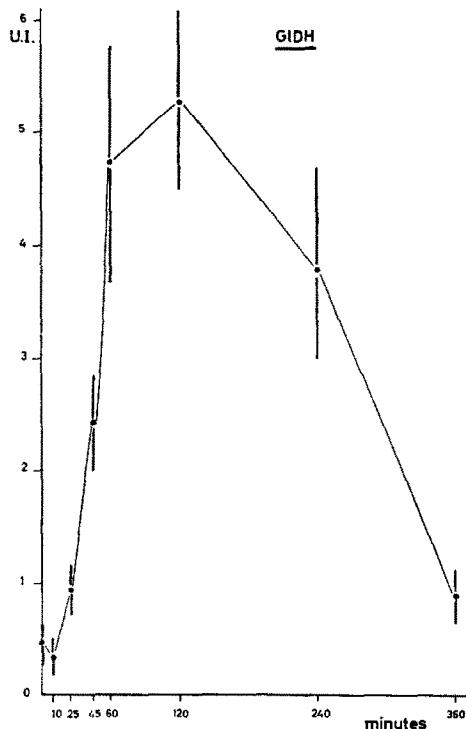


FIG. 1(e)

- (4) La GIDH est l'enzyme qui apparaît le plus lentement dans le plasma. Sa valeur est significativement différente de la valeur témoin 45 min après l'injection de cystéamine. Cet enzyme est redevenu normal après 360 min.
- (5) La β -glycuronidase se comporte de la même façon que la LDH.
- (6) L'étude des isoenzymes de la LDH n'a guère fourni de renseignements supplémentaires. Les variations des différentes fractions demeurent inférieures aux fluctuations des isoenzymes chez les rats témoins. Nous avons cependant observé chez 3 rats saignés 240 min après l'action de la drogue radioprotectrice et chez 4 autres rats saignés après 360 min un dédoublement de la cinquième fraction. Ce dédoublement n'a jamais été remarqué ni chez les autres animaux ayant reçu de la cystéamine ni chez les rats témoins. Toutefois, le petit nombre de cas (7 rats sur 60) rend l'observation sans valeur statistique (Fig. 2). Chez les rats qui présentent les taux de LDH les plus élevés (120 min après l'administration de la cystéamine), les fractions sont mieux marquées que chez les rats témoins, mais aucune d'elles n'augmentent de façon prédominante (Fig. 3).

DISCUSSION

Nos observations apportent une preuve nouvelle de grand poids à l'idée que la cystéamine provoque, à dose protectrice, de gros troubles cellulaires,^{1, 2} on voit passer dans le plasma aussi bien un enzyme lysosomal que des enzymes mitochondriaux ou cytoplasmiques. On ne peut manquer d'être frappé par le fait que les activités enzymatiques atteignent toutes un maximum à 120 min et que leur niveau redevient normal 3 h après l'injection. La déshydrogénase malique est le seul enzyme dont le niveau monte de façon significative 10 min déjà après l'injection; il faut attendre 25 min pour que les autres enzymes (excepté la GIDH) soient anormalement abondants dans le plasma.

Ces faits ont une importance dans la longue série des actions pharmacologiques déjà reconnues à la cystéamine (voir Bacq.⁹) Ce passage d'enzymes a-t-il quelque influence sur la réaction de l'animal aux radiations ionisantes? Ou, au contraire, les observations détaillées dans ce travail sont-elles tout simplement le témoin d'un état de choc cellulaire aisément réversible? Nous pensons que la dernière interprétation a beaucoup de chances d'être la plus plausible. En effet, on doit s'attendre à voir le taux des enzymes plasmatiques varier avec un certain retard par rapport aux lésions détectées au microscope électronique; or, les auteurs^{1, 2} s'accordent pour dire que les lésions (essentiellement des mitochondries et de l'ergastoplasme) apparaissent tôt (10 à 20 min) au moins dans les organes radiosensibles (rate, muqueuse intestinale, thymus, etc.) et disparaissent en 1 à 2 h. Or, les enzymes ne s'échappent des cellules que progressivement et doivent persister un certain temps dans le plasma après la réparation des lésions des mitochondries et de l'ergastoplasme. Il est donc normal qu'il y ait un certain retard dans l'augmentation du taux des enzymes plasmatiques sur les lésions cellulaires. Le choc est certainement profond puisqu'un enzyme strictement lysosomal participe au mouvement général. Reste à se demander si une partie au moins de ces enzymes ne provient pas du foie comme semblerait le démontrer le dédoublement de la cinquième fraction des LDH toujours observé dans les atteintes hépatiques, bien que les électro-microscopistes n'aient pas observé de lésions nettes

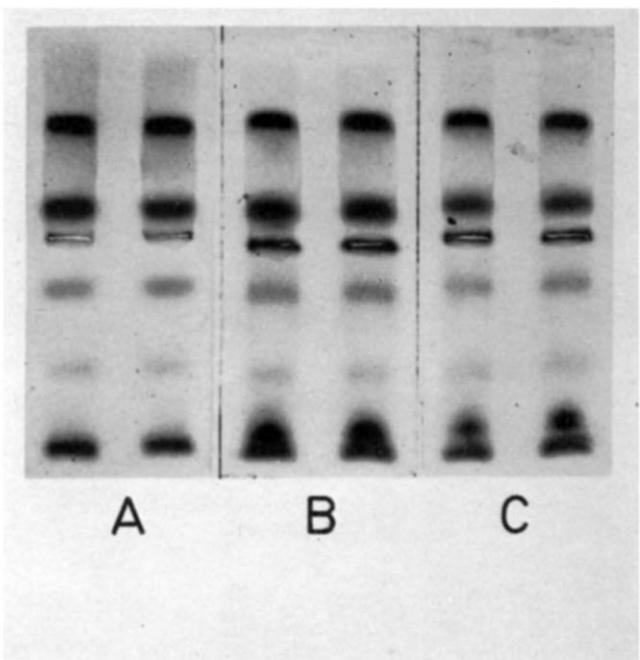


FIG. 2. Isoenzymes de la LHD. (A) Rat témoin; (B) Rat traité à la cystéamine, temps d'observation: 240 min. (C) Rat traité à la cystéamine, temps d'observation: 360 min.

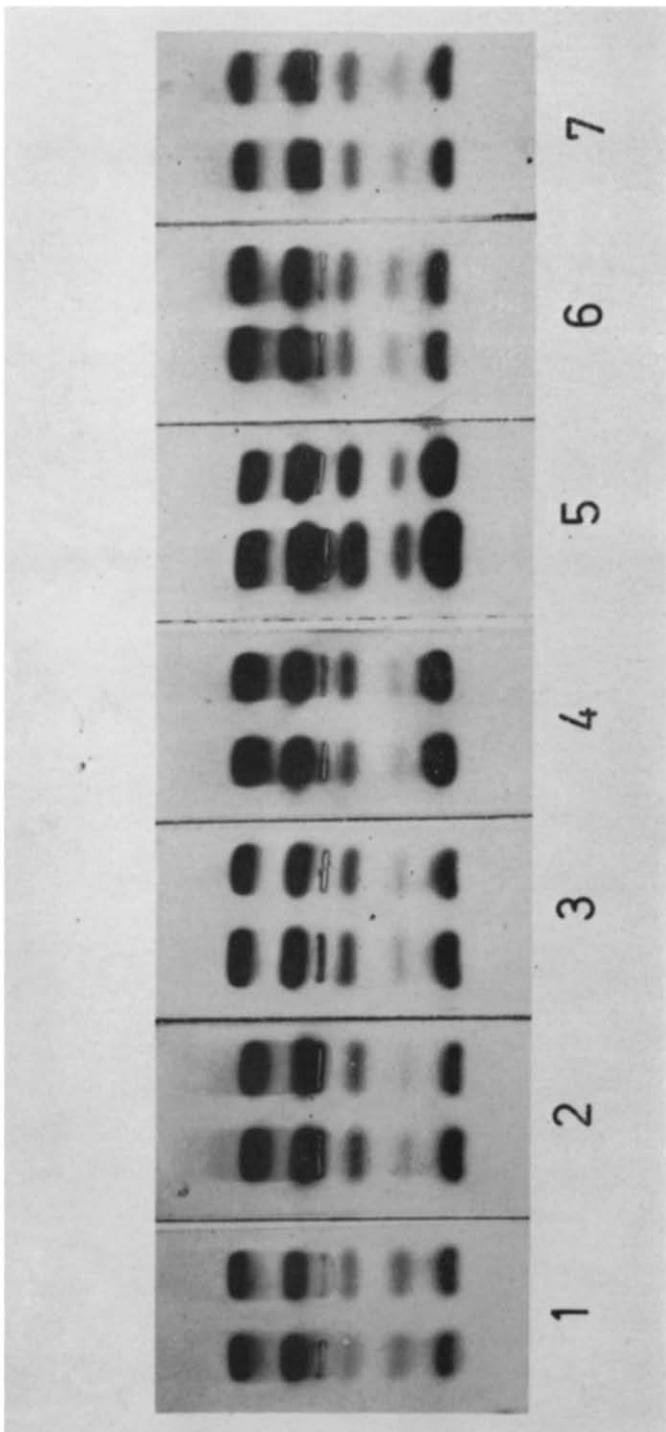


FIG. 3. Isoenzymes de la LDH. Rats traités à la cystéamine chez lesquels l'action de la drogue a été
de: 1-10 min; 2-25 min; 3-45 min; 4-60 min; 5-120 min; 6-240 min; 7-360 min.

de cet organe après injection de cystamine.* On ne peut rien affirmer mais les multiples troubles métaboliques que présentent les homogénats ou les tranches de foie après action des radioprotecteurs⁹ indiquent que le foie doit participer à la réaction enzymatique. On pourra s'en assurer en travaillant avec le foie perfusé.

Nous ne voyons pas pourquoi un enrichissement du plasma en enzymes pourrait modifier la réaction d'un mammifère aux radiations ionisantes. Il n'y a aucun parallélisme entre les variations du taux de ces enzymes et ceux de la radiorésistance; chez le rat elle est maximale 10 et 45 min après l'injection de cystamine ou de cystéamine et la mortalité est redevenue identique à celle des contrôles en 90 à 120 min^{10, 11}. Les effets observés par nous n'ont de spécifiques que l'allure générale de la courbe, la rapidité de la montée et le retour rapide à la normale. Toute agression chimique ou physique un peu vive provoque des phénomènes semblables mais toujours plus lents; par exemple l'exposition à 1000 r de rayonnement X.¹²

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1. Divers enzymes intracellulaires (TGO, LDH, MDH, GIDH, β -glycuronidase) ont été dosés dans le plasma du rat adulte après injection intrapéritonéale de 100 mg/kg de cystéamine base.
2. On observe une augmentation importante de ces enzymes 25 min après l'injection, le maximum est atteint en 120 min, le retour à la normale s'effectuant en 6 h.
3. Les isoenzymes de la LDH ne montrent pas de variations régulières, mais chez certains rats on a observé tardivement (4 où 6 h) un dédoublement de la cinquième fraction.
4. Ces faits témoignent d'une réaction rapide et intense de tous les éléments cellulaires, d'une sorte de choc cellulaire profond mais rapidement réversible.

* Puisque la cystamine se réduit dans l'organisme en cystéamine, il doit y avoir identité d'action entre ces deux substances.

REFERENCES

1. H. FIRKET et P. LELIEVRE, *Int. J. Radiat. Biol.* **10**, 403 (1966).
2. J. HUGON, J. R. MAISIN et M. BORGERS, *Int. J. Radiat. Biol.* **11**, 105 (1966).
3. H. VAN DEN BOSCH, *Clinica Chim. Acta* **12**, 601 (1965).
4. F. WROBLEWSKI et J. S. LADUE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **90**, 210 (1955).
5. R. J. WIEME, M. VAN SANDE, D. KERCHER et A. LAVENTHAL, *Clinica chim. Acta* **7**, 750 (1966).
6. H. U. BERGMAYER and E. G. BERNT, in *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. H. V. BERGMAYER), p. 757. Academic Press, New York (1963).
7. E. SCHMIDT, in *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. H. V. BERGMAYER), p. 752. Academic Press, New York (1963).
8. H. SCHON et H. LEIPOLD, *Klin. Wschr.* **40**, 292 (1962).
9. Z. M. BACQ, *Chemical Protection Against Ionizing Radiation*, pp. 60, 86 et 139. Thomas, Springfield (1965).
10. V. SMOLIAR, *C.R. Soc. Biol.* **156**, 1202 (1962).
11. V. SMOLIAR, M. L. BEAUMARIAGE, Z. M. BACQ et E. H. BETZ, *Int. J. Radiat. Biol.* **10**, 295 (1966).
12. Z. M. BACQ et P. ALEXANDER, *Fundamentals of Radiobiology*, p. 332. Pergamon Press, Oxford (1961).