

## INVESTIGATIONS SUR LES RÉSIDUS NON-EXTRACTIBLES DE L'ARYL-<sup>14</sup>C-ALBENDAZOLE CHEZ LE MOUTON

P. DELATOUR, Christiane LONGIN, F. GARNIER et E. BENOIT

Laboratoire de Biochimie INRA 54.189 Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon BP 31, 69752 Charbonnières Cedex, France

### Summary

INVESTIGATIONS ABOUT INTRACTABLE RESIDUES OF ARYL-<sup>14</sup>C-ALBENDAZOLE IN THE SHEEP. — The location of the intractable residues of <sup>14</sup>C-ring labelled-albendazole has been investigated in the sheep. Numerous biochemical compounds have been isolated : pulmonary CO<sub>2</sub>, blood dextrose, glycogen, triglycerides, cholesterol, hemoglobin, plasmatic, cytosolic and microsomal proteins, nucleic acids... No incorporation into intermediary metabolisms has been put into evidence. On the contrary, a significant covalently bound radioactivity has been observed on hepatic and plasmatic proteins. No covalent binding to hepatic DNA seems to be produced.

L'exploration du devenir des médicaments chez l'animal met souvent en œuvre des méthodes radioactives. Or, la littérature enseigne qu'à brève échéance après administration, la radioactivité totale peut ne plus constituer un fidèle traceur de la molécule. En effet, des phénomènes métaboliques peuvent permettre l'incorporation d'atomes radioactifs dans les constituants normaux de l'organisme. Parmi les antiparasitaires, cette éventualité est rencontrée avec le dichlorvos (Hutson *et al.*, 1971 ; Loeffler *et al.*, 1971 ; Page *et al.*, 1971), le parbendazole (Di Cuollo *et al.*, 1974), le thiabendazole (Rosenblum *et al.*, 1964), le cambendazole (Baer *et al.*, 1977), le nihydrasone (Herrett *et al.*, 1967), la dimétridasole, la furazolidone (Tennent et Ray, 1963), le ronidazole (Rosenblum *et al.*, 1972b). De ce fait, lors de la quantification de la radioactivité globale qui prétend exprimer le niveau des résidus totaux, il résulte une erreur par excès (Rosenblum *et al.*, 1972a) dont l'im-

portance quantitative est presque toujours méconnue.

Sont rapportés ci-dessous les résultats d'une exploration visant à mettre en évidence cet éventuel phénomène à propos de l'Albendazole chez le mouton, modèle choisi en raison de sa faculté à donner naissance à une radioactivité non extractible persistante. L'Albendazole est le N(propylthio-5, benzimidazolyl)2, carbamate de méthyle ; son métabolisme (Gyurik *et al.*, 1981) et sa toxicité (Delatour *et al.*, 1981) ont été préalablement étudiés chez les rongeurs et les ruminants.

### Matériel et Méthodes

#### 1. Animal, Traitement, Prélèvements

L'animal retenu est une jeune brebis de 29 kg en excellente santé. Sous légère anesthésie on

procède aseptiquement à la pose d'une sonde vésicale permanente à ballonnet. L'animal est alors mis en cage à métabolisme en acier inoxydable ; alimentation composée déshydratée et abreuvement à volonté. Les fèces sont recueillies en totalité et les urines sont collectées de façon continue par une pompe péristaltique. Après 48 heures d'observation, l'animal reçoit oralement sous capsule de gélatine, 1,09 g d'Albendazole (PM=265) d'activité spécifique 0,312 mCi/mM, soit au total : 1,26 mCi. L'échantillon utilisé est uniformément marqué au  $^{14}\text{C}$  sur le noyau aromatique du squelette benzimidazole.

Au moment de l'administration (0 h), puis aux délais 12 h, 24 h, 36 h et 48 h, on procède aux opérations suivantes : collecte des fèces et des urines, prélèvement sanguin jugulaire sur tube hépariné, piégeage de  $\text{CO}_2$  pulmonaire. A la 48<sup>e</sup> heure, l'animal est saigné par transfexion carotidienne bilatérale sous anesthésie : le sang est intégralement recueilli sur EDTA puis centrifugé. On conserve plasma et globules rouges lavés. Les nombreux prélèvements de tissus sont immédiatement effectués et mis en congélation.

## 2. Isolements, Dosages

Après détermination des cinétiques de la

radioactivité totale plasmatique, globulaire et urinaire, les radioactivités spécifiques sont déterminées selon l'une des deux procédures ci-dessous :

— soit : division du prélèvement biologique en deux aliquots distincts utilisés, respectivement, pour le dosage spécifique (enzymatique) et pour la séparation en vue du comptage (ex. cholestérol libre),

— soit : isolement préalable du composé à l'état pur dont deux aliquots serviront, parallèlement, au dosage par méthode physique et au comptage (ex. : acides nucléiques).

Le  $\text{CO}_2$  expiré est piégé par barbottage dans l'eau de baryte. Le comptage de la radioactivité du précipité est corrigé d'après des tables d'autoabsorption en fonction de la masse surfacique (Simonnet et Oria, 1980).

L'urée urinaire ou plasmatique est isolée par filtration sur colonne Sephadex G 15 ; repérage des éluats par méthode enzymatique, puis chromatographie sur couche mince sur silice F (éluant : butanol saturé d'eau). Révélation finale des spots ( $R_f=0,30$ ) par le paradiméthylaminobenzaldéhyde dans l'éthanol chlorhydrique (Randerath, 1971).

Le glucose sanguin, comme l'urée, est isolable par filtration sur gel Sephadex G 15.

Les protéines plasmatiques totales sont dis-

Tableau 1. — Séparation par filtration sur gel Sephadex G 15 de protéines, glucose et urée plasmatiques

Eluats ml	Radioactivité			Protéines (mg/ml) Glucose ( $\mu\text{mol/ml}$ ) Urée ( $\mu\text{mol/ml}$ )
	CPM/ml	2 S %	H	
10	16	15,9	59	
12	16	15,7	58	
14	16	15,5	59	
16	21	13,7	56	1,8
18	111	5,9	58	25,2 (P)
20	87	6,8	61	18,0
22	51	8,8	59	8,8
24	21	13,8	55	1,1
26	18	15,0	58	
28	18	14,9	56	
30	19	14,6	60	1,22
32	18	14,9	57	2,05 (G)
34	20	14,3	56	1,16
36	237	4,1	55	0,11
38	106	6,1	58	
40	23	13,3	55	0,83
42	18	14,9	56	1,66 (U)
44	16	15,8	58	1,16
46	18	14,8	55	0,17
48	18	15,0	55	
50	18	14,8	57	

sociées de la radioactivité libre par deux techniques. Soit extraction par l'acétate d'éthyle, à partir du précipité obtenu par TCA sur 1 ml de plasma (Thorgeirsson et Wirth, 1977), soit filtration sur colonne de Sephadex G 15, repérage des fractions protéiques à 280 nm et dosage selon la méthode de Lowry (1951). La fibrine est spécifiquement précipitée par le chlorure de calcium selon la technique de Le Polles et Frograin (Lecoq, 1972).

Les lipides plasmatiques sont extraits par le mélange méthylal méthanol (40:10), fractionnés sur silice selon la technique de Delsal rapportée par Lecoq (1977). On révèle successivement par fluorescence les métabolites extractibles, puis les fractions lipidiques par vapeurs d'iode. Par l'emploi d'étalons, sont identifiés : phospholipides, cholestérol libre, acides gras libres, triglycérides et cholestérol estérifié.

Les globules rouges sont lysés par l'eau distillée. La séparation de la radioactivité extractible de l'hémoglobine est assurée par filtration. Des aliquots sont prélevés en vue du dosage de l'hémoglobine par le réactif de Drabkin.

Les graisses de réserve : après détermination de la radioactivité totale, puis de la radioactivité

extractible par HCl, un aliquot de phase étherée est évaporé à sec. Le résidu est fractionné sur silice F selon la même méthode technique que pour les lipides plasmatiques. Identification des triglycérides grâce à l'emploi d'un étalon de trioléine.

Après un dosage de la radioactivité hépatique globale, le foie est soumis à une technique de fractionnement cellulaire par centrifugations différentielles. On sépare ainsi : membranes (et « débris »), noyaux, mitochondries, microsomes et cytosol. Les radioactivités respectives sont déterminées.

Les protéines cytosoliques sont isolées selon la même méthode technique que les protéines plasmatiques.

Le glycogène est purifié par la méthode de Lo (1970). Sa pureté est contrôlée par spectre UV, tandis qu'un aliquot est hydrolysé par voie acide : le glucose obtenu est enfin isolé en vue de la mesure de sa radioactivité.

Les protéines microsomales sont séparées de la radioactivité extractible comme précédemment. Elles sont soumises aux mêmes déterminations. En outre, après hydrolyse chlorhydrique totale selon Sanger (1952), on procède à l'isolement des acides aminés par

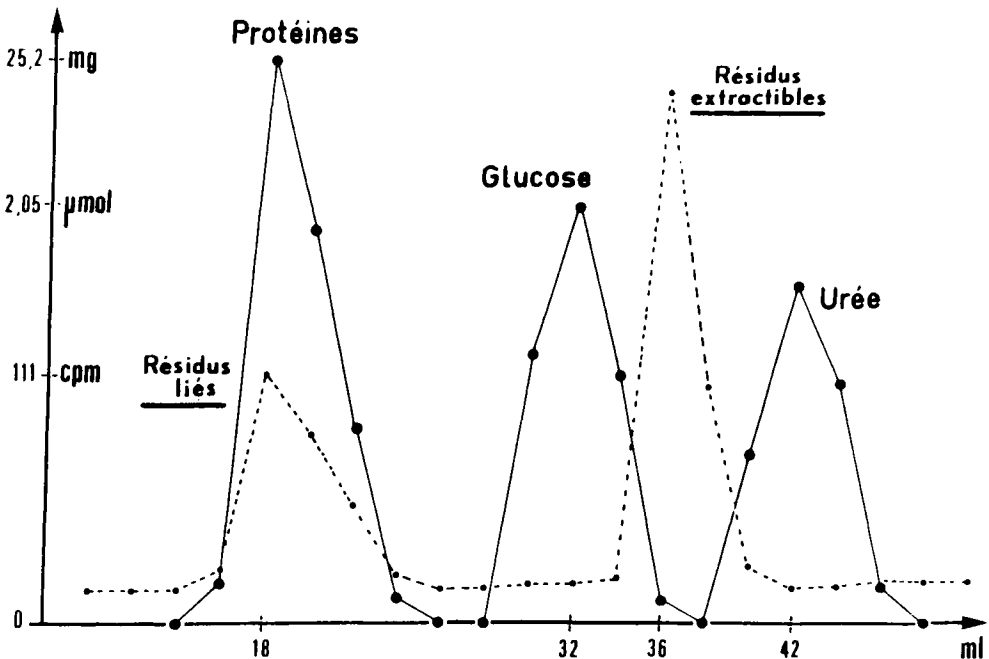


Fig. 1. — Séparation par filtration sur gel séphadex G 15 des protéines, glucose et urée plasmatiques.

Tableau 2. — Isolement et comptage de la radioactivité de l'ADN

	ADN	
	Contrôle	Hépatique
$\lambda$ max. (nm)	259	259
$\lambda$ min. (nm)	232	232
DO (nm)		
260	0,873	0,589
240	0,521	0,350
230	0,420	0,304
260/240	1,67	1,68
260/230	2,08	1,94
CPM (2 mg)	21,48	21,82
H	73	71
2 S %	6,10	6,05

chromatographie sur couche mince bidimensionnelle sur silice F à l'aide des systèmes : méthanol-chloroforme-ammoniaque à 12 % (2:2:1) et phénol-eau (3:1) (Randerath, 1971). Treize amino-acides sont ainsi isolés et recueillis.

Les acides nucléiques : ARN et ADN sont isolés respectivement, à partir des microsomes hépatiques selon la méthode au crésol-phénol de Kirby (1965) et à partir des noyaux selon la méthode au phénol de Lamonthéizie et Guerinéau (1965). La pureté des échantillons obtenus est contrôlée par critères spectraux UV.

### 3. Mesures de radioactivité

Elles ont été réalisées dans les conditions suivantes : compteur à scintillation liquide Beckman LS 7000 ; dissolution des échantillons solides dans le solubilisateur NCS Amersham ; liquide scintillant Packard TM 299 ; corrections de quenching par la méthode du standard externe après décoloration éventuelle ( $H_2O_2$ ) et/ou acidification (acide acétique concentré). Toutes les opérations ont été effectuées en parallèle sur trois échantillons d'une masse comprise, selon les cas, entre 0,25 et 25 mg).

Les détails méthodologiques ont été rapportés antérieurement (Longin, 1982).

### Résultats

Les radioactivités globales plasmatique et globulaire sont d'emblée maximales dès le prélèvement sanguin de la 12<sup>e</sup> heure. Elles décroissent parallèlement avec une demi-vie

proche de 12 heures. La teneur globulaire est constamment supérieure, de 10 % environ, à la teneur plasmatique. La radioactivité urinaire est maximale au prélèvement de la 36<sup>e</sup> heure.

La distribution cellulaire de la radioactivité globale hépatique dont le niveau est de 35 076 dpm/g d'organe frais, s'opère comme suit :

noyaux	3,2 %
membranes et débris	8,1 %
mitochondries	12,5 %
cytosol	18,7 %
microsomes	57,0 %

La radioactivité spécifique de tous les constituants naturels examinés ( $CO_2$ , urée, glucose sanguin, glycogène, triglycérides, acides gras libres, cholestérol, phospholipides, acides aminés, ARN et ADN) est inférieure à 1 dpm/mg au seuil de signification de 1 %.

En revanche, une part de radioactivité non extractible est détectée sur certaines protéines (table. 1, fig. 1). Son niveau s'établit comme suit à la 48<sup>e</sup> heure :

sang :	protéines plasmatiques	4,9 dpm/mg
foie :	protéines microsomales	8,7 dpm/mg
	protéines cytosoliques	9,1 dpm/mg

La radioactivité liée aux protéines plasmatiques évolue progressivement de 2,5 dpm/mg à la 12<sup>e</sup> heure à 4,9 dpm/mg à la 48<sup>e</sup> heure, alors que dans le même intervalle, la radioactivité plasmatique totale passe de 27 045 à 3 720 dpm/ml. Cependant, aucune radioactivité détectable n'a été mise en évidence sur l'hémoglobine en dépit d'une radioactivité intra-globulaire importante.

## Discussion

La diversité des molécules et des espèces animales (rat, volailles, porc, ruminants) concernées par l'incorporation de radioactivité exogène aux métabolismes indique que ce phénomène a valeur générale. Les voies intermédiaires permettant l'utilisation de  $^{14}\text{C}$  peuvent être imaginées simplement dans certains cas tels que lors d'incorporation directe : O-ethyl-thréonine (Hiremath *et al.*, 1971), glycérol de la trinitrine (Di Carlo *et al.*, 1969) ou lors de marquage type  $^{14}\text{C}$ -diméthylamino (Berenbom, 1962 ; Craddock *et al.*, 1968 ; Hucker et Porter, 1961 ; McMahan *et al.*, 1963). En revanche, ces processus restent souvent hypothétiques, tels que lors de conversion de nihydrazone en  $\alpha\text{KG}$  (Herrett *et al.*, 1967) chez le poulet, ou lors de fragmentation du noyau aromatique du cambendazole (Baer *et al.*, 1977) chez le veau. La présence de cette radioactivité incorporée à des constituants naturels est préjudiciable à l'appréciation quantitative des résidus et donc à la détermination des temps d'attente. En effet, pour des raisons méthodologiques, elle est classiquement comptabilisée dans les résidus non extractibles dont l'évaluation toxicologique est controversée.

Dans le cas présent de l'Albendazole chez le mouton, le fait qu'aucune radioactivité appréciable ne soit apparue chez un certain nombre de témoins des grands métabolismes (triglycérides et acides gras, glucose et glycogène, acides aminés et urée) donne à penser que la métabolisation de ce médicament respecte le noyau aromatique du squelette benzimidazole.

A propos des acides nucléiques, aucune radioactivité significative n'a été détectée sur ces constituants (tabl. 2), fait indiquant que n'est appréciable ni l'incorporation de radioactivité au métabolisme des bases, ni la création d'adduits. Ce dernier phénomène est exprimé par le Covalent Binding Index (CBI) représentant le nombre de molécules d'un composé chimique

liées par covalence pour  $10^6$  nucléotides de DNA après administration d'une dose unique de 1 mmol/kg p.v. Dans le cas présent, le CBI s'établit à 0,6 pour le DNA de mouton. On sait par ailleurs que pour le DNA hépatique du rat, le CBI qui rend compte du mécanisme moléculaire d'action des inducteurs tumoraux est de l'ordre de 1 000 pour les hépatocarcinogènes puissants, de 100 pour les modérés et de 10 pour les faibles (Jaggi *et al.*, 1980). Ce résultat semble militer en faveur de l'inocuité génotoxique de l'Albendazole dans les présentes conditions expérimentales.

En revanche, la radioactivité fixée sur les protéines, sans être incorporée aux acides aminés, rend compte de liaisons avec une fréquence théorique d'une greffe pour 645 000 (cytosol) à 1 100 000 (plasma) acides aminés. On ignore actuellement quelle est la nature des sites de fixation, ainsi que le degré d'intégrité du noyau benzimidazole fixé par covalence sur les restes amino-acides.

La présente méthodologie peut être adaptée, en fonction du comportement analytique des métabolites extractibles, à toute autre substance médicamenteuse. Elle peut alors apporter de précieux renseignements quant à l'importance quantitative de la fraction atoxique des résidus non extractibles et, éventuellement, laisser prévoir l'existence d'adduits sur le matériel génétique.

*Accepté pour publication, le 18 novembre 1982.*

## Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier M. le Professeur Dirheimer (Strasbourg) pour son aimable consultation lors de la préparation du manuscrit. La présente investigation a été réalisée grâce à l'aide du Département de Pathologie Animale de l'INRA.

## Résumé

La localisation des résidus non-extractibles de l'aryl- $^{14}\text{C}$ -albendazole a été étudiée chez le mouton. De nombreux composés biochimiques ont été isolés en vue de la détermination de leur radioactivité spécifique :  $\text{CO}_2$ , glucose sanguin, glycogène, triglycérides, cholestérol, hémoglobine, protéines plasmatiques, cytosoliques et microsomaux, acides nucléiques.

Aucune incorporation de radioactivité aux métabolismes intermédiaires n'a été mise en évidence. Au contraire, une radioactivité significative traduisant l'existence de résidus liés a été observée sur les protéines plasmatiques et hépatiques. Cependant, aucune liaison au RNA et DNA hépatiques n'a été produite.

## Références

- BAER J.E., JACOB T.A., WOLF F.J., 1977. Cambendazole and non-drug macromolecules in tissue residues. *J. Tox. Env. Health*, **2**, 895-903.
- BERENBOM M., 1962. Studies on the utilisation of the Carbon of p-dimethyl-aminoazobenzene for rat liver nucleic acid synthesis. *Cancer Res.*, **22**, 1343-1348.
- CRADDOCK V.M., MATTOCKS A.R., MAGEE P.N., 1968. The fate of 7(<sup>14</sup>C)-methylguanine after administration to the rat. *Biochem. J.*, **109**, 75-78.
- DELATOUR P., PARISH R.C., GYURIK R.J., 1981. Albendazole : a comparison of relay embryotoxicity with embryotoxicity of individual metabolites. *Ann. Rech. Vet.*, **12**, 159-167.
- DI CARLO F.J., VIAU J.P., MELGAR M.D., 1969. Incorporation of radioactivity from <sup>14</sup>C-nitroglycerine into rat liver glycogen, lipid, protein, ribonucleic acid, and deoxyribonucleic acid. *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 965-970.
- DI CUOLLO C.J., MILLER J.A., MENDELSON W.L., PAGANO J.F., 1974. Metabolic and tissue residue studies on Parbendazole in sheep. *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 948-953.
- GYURIK R.J., CHOW A.W., ZABER B., BRUNNER E.M., MILLER J.A., VILLANI A.J., PETKA L.A., PARISH R.C., 1981. Metabolism of albendazole in cattle sheep, rats and mice. *Drug Met. Disp.*, **9**, 503-508.
- HERRETT R.J., WILLIAMS C.W., HEOTIS J.P., BUZARD J.A., 1967. Metabolism of 5-Nitro-2-furaldehyde acetylhydrazone-C<sup>14</sup> (Nihydrazone) in the chick. *J. Agric. Food Chem.*, **15**, 433-438.
- HIREMATH C.B., OLSEN G., ROSENBLUM C., 1971. Incorporation of L-O-ethyl-threonine into chick muscle protein. *Biochemistry*, **10**, 1096.
- HUCKER H.B., PORTER C.C., 1961. Study on the metabolism of amitriptyline. *Fed. Proc.*, **20**, 172.
- HUTSON D.H., BLAIR O., HOODLEY E.C., PICKERING B.A., 1971. The metabolism of <sup>14</sup>C Vapona in rats after administration by oral and inhalation routes. *Tox. Appl. Pharmacol.*, **19**, 378-379.
- JAGGI W., LUTZ W.K., LUTHY J., ZWEIFEL U., SCHLATTER Ch. 1980. *In vivo* covalent binding of aflatoxin metabolites isolated from animal tissue to rat-liver DNA. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **18**, 257-260.
- KIRBY K.S., 1965. Isolation and characterization of ribosomal ribonucleic acid. *Biochem. J.*, **96**, 266-269.
- LAMONTHEIZIE N., GUERINEAU M., 1965. Modification et adaptation de diverses méthodes de préparation du DNA par emploi de phénol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47**, 807-819.
- LECOQ R., 1972. *Manuel d'analyses médicales et de biologie clinique*. Doin Ed., Paris.
- LECOQ R., 1977. *Manuel d'analyses médicales et de biologie clinique*. Supplément. Doin Ed., Paris.
- LO S., RUSSEL J.C., TAYLOR A.W., 1970. Determination of glycogen in small tissue samples. *J. Appl. Physiol.*, **28**, 234-236.
- LONGIN Ch., 1982. *Etude de la localisation et de la nature biochimique de la radioactivité non-extractible après administration de Aryl-<sup>14</sup>C-Albendazole chez le mouton*. Thèse Doct. Bioch. 3<sup>e</sup> cycle, Lyon.
- LOEFFLER J.E., DE VRIES D.M., YOUNG R., PAGE A.C., 1971. Metabolic fate on inhaled dichlorvos in pigs. *Tox. Appl. Pharmacol.*, **19**, 378.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- McMAHON R.E., MARSHALL F.J., CULP H.W., MILLER W.M., 1963. The metabolism of Nortriptyline-N-methyl-<sup>14</sup>C in rats. *Biochem. Pharmacol.*, **12**, 1207-1217.
- PAGE A.C., DE VRIES D.M., YOUNG R., LOEFFLER J.E., 1971. Metabolic fate of ingested dichlorvos in swine. *Tox. Appl. Pharmacol.*, **19**, 378.
- RANDERATH K., 1971. *Chromatographie sur couches minces*. Gautier-Villars Ed., Paris.
- ROSENBLUM C., TOCCO D.J., HOWE E.E., 1964. Complications in residues studies with radioisotopic drugs. *2nd Annual Oak Ridge Radioisotopes Conf.*, 19-22 April.
- ROSENBLUM C., TRENNER N.R., WOLF D.E., 1972a. The non-metabolic residue. A limitation to the tracer method. *J. Labelled Cpd.*, **7**, 225-232.
- ROSENBLUM C., TRENNER N.R., BUHS R.P., HIREMATH C.B., KONINSZY F.R., WOLF D.E., 1972b. Metabolism of Ronidazole (1-methyl-5-nitroimidazole-yl, methyl carbamate). *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 360-371.
- SANGER F., 1952. The arrangement of amino-acids in proteins. *Adv. Protein Chem.*, **7**, 1-67.
- SIMONNET G., ORIA M., 1980. *Les mesures de radioactivité à l'aide des compteurs à scintillateur liquide*. Eyrolles Ed., Paris, 180-181.
- TENNENT D.M., RAY W.H., 1963. Urinary metabolites of Furazolidone. *Fed. Proc.*, **22**, 367.
- THORGEIRSSON S.S., WIRTH P.J., 1977. Covalent binding of foreign chemicals to tissue macromolecules. *J. Tox. Env. Health*, **2**, 873-881.