



Fixation covalente in vivo de la trenbolone et de l'estradiol à l'ADN hépatique de rat : étude comparative de la fixation de molécules tritiées et du postmarquage au radiophosphore

Christophe Petit, F Perin, D Tardieu, V Burgat, Ag Rico

► To cite this version:

Christophe Petit, F Perin, D Tardieu, V Burgat, Ag Rico. Fixation covalente in vivo de la trenbolone et de l'estradiol à l'ADN hépatique de rat : étude comparative de la fixation de molécules tritiées et du postmarquage au radiophosphore. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1991, 22 (3), pp.263-269. hal-00902027

HAL Id: hal-00902027

<https://hal.science/hal-00902027>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Fixation covalente *in vivo* de la trenbolone et de l'estradiol à l'ADN hépatique de rat : étude comparative de la fixation de molécules tritiées et du postmarquage au radiophosphore

C Petit ^{1*}, F Perin ², D Tardieu ¹, V Burgat ¹, AG Rico ¹

¹ École nationale vétérinaire, Laboratoire de toxicologie biochimique et métabolique,
23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex;

² Institut Curie, 15 rue Georges Clémenceau, 91400 Orsay cedex, France

(Séminaire international sur les anabolisants, 27-28 mai 1990, Toulouse, France)

Résumé — La fixation covalente *in vivo* de la trenbolone et de l'estradiol à l'ADN hépatique de rat a été quantifiée en utilisant d'une part des molécules radioactives, d'autre part la méthode de post-marquage au radiophosphore. L'indice de fixation covalente mesuré avec les molécules tritiées est de 2,4 pour l'isomère α de la trenbolone, de 5,4 pour son isomère β et de 5,4 pour le 17- β -estradiol. L'utilisation du post-marquage au radiophosphore à doses moyennes répétées ou à forte dose unique ne permet pour aucune des 3 substances de mettre en évidence un seul adduit spécifique parmi le « bruit de fond » d'adduits spontanément formés chez les témoins. La signification toxicologique de la fixation de ces 3 stéroïdes à l'ADN exclut donc vraisemblablement une action génotoxique directe.

fixation covalente / ADN / trenbolone / postmarquage / génotoxicité

Summary — *In vivo* covalent binding of trenbolone and estradiol to rat liver DNA. Comparative study between binding of tritiated molecules and ³²P-post labeling. *In vivo* covalent binding of trenbolone and estradiol was assayed using either radiolabeled compounds or ³²P-post labeling. The covalent binding index, as measured with tritiated molecules, was 2.4 for the α isomer of trenbolone, 5.4 for its β isomer and 5.4 for 17- β estradiol. Using ³²P-post labeling at repeated medium doses or a single high dose did not allow any of the 3 compounds to reveal specific adducts in the background of adducts spontaneously formed in control animals. It can therefore be concluded that these steroids most probably do not have a direct genotoxic action.

covalent binding / DNA / trenbolone / post labeling / genotoxicity

INTRODUCTION

La trenbolone (TB) est un stéroïde de synthèse utilisé sous forme d'acétate comme anabolisant dans plusieurs pays. Comme tout xénobiotique, son administration laisse persister des résidus du composé parental et de ses métabolites

dans la viande et les organes des animaux traités.

Les métabolites majeurs de phase I de la TB sont la 17- α -OH trenbolone (α TB) et la 17- β -OH trenbolone (β TB) (Laitem *et al*, 1978, fig 1).

Chez les bovins, le principal métabolite retrouvé dans le muscle est la β TB (Lai-

* Correspondance et tirés à part

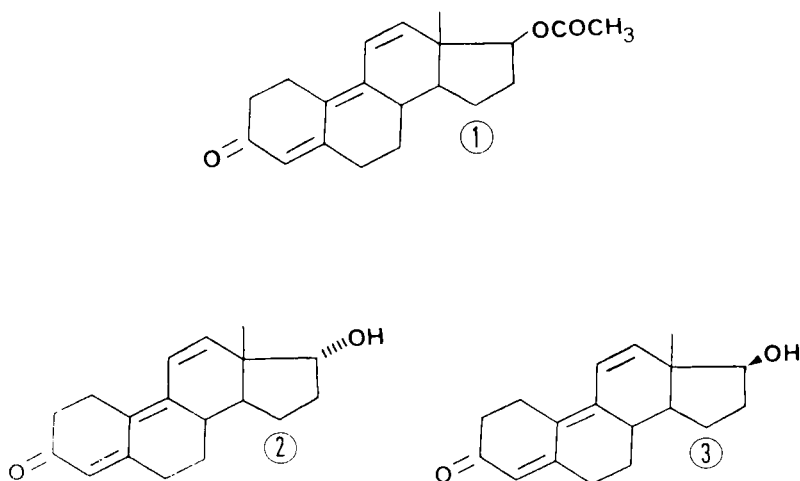


Fig 1. La trenbolone et ses métabolites majeurs; 1, acétate; 2, 17- α -OH trenbolone; 3, 17- β -OH trenbolone.

tem *et al*, 1978). Dans le foie et le rein, c'est l' α TB qui est dominante. Son niveau résiduel est 6 fois supérieur à celui de la β TB musculaire, mais son activité hormonale est 10 fois moindre (Heitzman et Darwood, 1977; Laitem *et al*, 1978).

La β TB s'est révélée capable, à long terme et à dose massive, d'induire des tumeurs hépatiques chez la souris (Lamming *et al*, 1987). Cependant, la quasi-totalité des tests à court terme réalisés sont en faveur de l'absence de génotoxicité directe de la molécule (Lamming *et al*, 1987; Richold, 1988).

La TB est toutefois capable de se fixer par covalence *in vivo* à l'ADN de foie de rat, encore que cette fixation soit très faible (Barraud *et al*, 1984; Lutz *et al*, 1988; Petit *et al*, 1989).

L'objectif de ce travail est de comparer les résultats de fixation covalente obtenus après administration de TB et de 17- β -estradiol marqués au tritium à ceux du

post-marquage au radio-phosphore, actuellement méthode de référence pour l'étude des adduits.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits chimiques

L'acétate de Trenbolone froid, la [^3H]17 α -OH trenbolone (activité spécifique 38 Ci/mmol) la [^3H]17 β -OH trenbolone (57 Ci/mmol) et le [^3H]17- β -estradiol (55 Ci/mmol) ont été fournis par les laboratoires Roussel-Uclaf. Leur pureté radiochimique mesurée par chromatographie sur couche mince est de 99%.

La RNase pancréatique provient de Boehringer Mannheim (Meylan, France), le trifluoroacétate de césium de Pharmacia (Saint-Quentin-en-Yvelines, France), la protéinase K de Merck (Darmstadt, Allemagne), l'ATP, la phosphodiestérase, la phosphonucléotide kinase, la nucléase micrococcale, la nucléase P1 et le 17- β -Estradiol froid de Sigma (St Louis, USA). Le ^{32}P (300 Ci/mmol) est fourni par Amersham (Les

Ulis, France), la polyéthylèneimine et la cellulose par OSI (Paris, France).

Les plaques de chromatographie polyéthylèneimine-cellulose ont été fabriquées extemporanément sur un support en vinyle Gampex (Twickenham, Grande-Bretagne) à l'aide d'un étaleur Desaga fourni par Roucaire (Vélizy-Villacoublay, France).

Tous les réactifs utilisés sont du plus haut degré de pureté disponible.

Animaux

Des rats males Sprague-Dawley (Charles River) de 120-150 g, 150-200 g et de 500-550 g soumis à un régime standard ont reçu les stéroïdes en solution dans le N-méthyl acétamide à 92% dans l'eau pour les molécules radioactives et dans le propylène glycol pour la trenbolone froide. Les témoins ont reçu le solvant correspondant.

Mesure de la fixation covalente à l'ADN des stéroïdes marqués

Vingt-quatre rats de 150-200 g ont reçu par groupes de 3 des doses de 2 000–5 000 $\mu\text{Ci/kg}$ (35–130 mmol/kg) d'estradiol, αTB ou βTB par voie ip. Les animaux ont été sacrifiés 16 h plus tard. Après prélèvement et broyage du foie, l'ADN a été isolé et ultrapurifié selon le protocole décrit précédemment (Petit *et al.*, 1989).

Le comptage en scintillation liquide d'échantillons de 1 mg d'ADN a été réalisé à l'aide d'un spectromètre Packard 3390. Le bruit de fond a été mesuré en présence d'ADN d'animaux témoins extrait dans les mêmes conditions. Les comptages ont été réalisés 3 fois 500 min afin d'obtenir une précision optimale.

La fixation covalente à l'ADN a été calculée en unités de CBI (Covalent Binding Index) selon Lutz (1979) :

$\text{CBI} = \text{Nombre de micromoles liées par mole de nucléotides/nombre de millimoles administrées par kg}$.

Post-marquage au radiophosphore

Dans une première expérience, 2 lots de 3 rats de 120-150 g ont reçu des doses quotidiennes par voie ip de 0,2 mg.kg⁻¹.j⁻¹ d'acétate de trenbolone froid (soit 730 nmol/kg) ou de 17- β -estradiol pendant 4 j. Les animaux ont été sacrifiés le 5^e j et leur ADN hépatique extrait. Trois témoins ont reçu le solvant dans les mêmes conditions.

Dans une seconde expérience, 0,8 mg/kg (soit 2 920 nmol/kg) d'acétate de TB ont été administrés par voie ip (dose massive unique) à 3 animaux de 500-550 g tandis que 3 témoins recevaient le solvant.

Les adduits ont été mis en évidence suivant la méthode décrite par Randerath *et al.* (1981) modifiée à la nucléase P1 par Reddy et Randerath (1986) afin d'en augmenter la sensibilité.

Brièvement, après digestion de l'ADN en nucléotides par la phosphodiesterase et la nucléase micrococcale, un traitement par la nucléase P1 permet la déphosphorylation sélective des nucléotides non porteurs d'adduits et leur transformation en nucléosides. Un traitement par la phosphonucléotide kinase (PNK) en présence de ³²P-ATP (préparé extemporanément) phosphoryle alors sélectivement les nucléotides restant dans la solution, c'est-à-dire les porteurs d'adduits. Les nucléosides étant de mauvais substrats pour la PNK, ils sont peu phosphorylés et donc faiblement marqués.

Les nucléotides parasites sont éliminés par chromatographie sur couche mince en utilisant un tampon d'élution phosphate de force ionique moyenne (PO₄NaH₂, 3M, pH 5,8).

Pour la séparation des adduits, 2 migrations sur gel de polyéthylèneimine cellulose sont réalisées avec 2 éluants (T1 et T2) de haute force ionique (T1 : urée 6,4 mol.l⁻¹; acide formique 2,7 mol.l⁻¹; hydroxyde de lithium qs pH 3,5. T2 : urée 7 mol.l⁻¹; Chlorure de lithium 0,7 mol.l⁻¹; Tris HCl 0,4 mol.l⁻¹, pH 8,0).

Après séchage, les gels sont autoradiographiés 6 h à -80 °C en présence d'un écran renforceur.

RÉSULTATS

CBI moyen de trenbolone et de l'estradiol

Les CBI moyens indiquent une très faible fixation covalente à l'ADN (tableau I). Leur reproductibilité est satisfaisante.

Tableau I. Indices de fixation covalente à l'ADN (CBI) de l' α -trenbolone, de la β -trenbolone et du 17- β estradiol.

Molécule	CBI
Alpha trenbolone	2,4 $\pm$ 0,3 (a)
Béta trenbolone	5,4 $\pm$ 1,7 (a)
Estradiol	5,4 $\pm$ 1,9 (b)

(a) Moyenne de 4 doses, 3 animaux par dose.

(b) Moyenne de 3 doses, 2 animaux par dose.

Fixation covalente en fonction de la dose

Dans l'étroite limite des doses administrées, seule la fixation de l' α TB apparaît linéaire en fonction de la dose (fig 2).

Post-marquage au radiophosphore

Doses moyennes réitérées

La fixation covalente de la trenbolone et celle de l'estradiol ne sont pas discernables du «bruit de fond» d'adduits spontanés des animaux témoins (fig 3).

Haute dose unique

Comme la fixation à doses moyennes réitérées, la fixation covalente de la trenbolone à haute dose n'est pas repérable dans le fond d'adduits des témoins (résultats non présentés).

Adduits / 10¹⁰ nucléotides

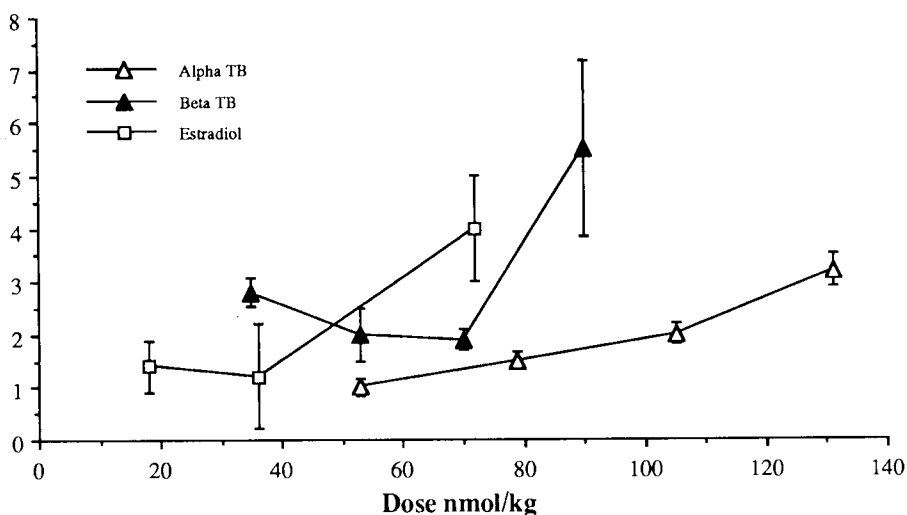


Fig 2. Fixation covalente en fonction de la dose d' α -trenbolone, de β -trenbolone et d'estradiol. Les traits verticaux représentent les écarts types.

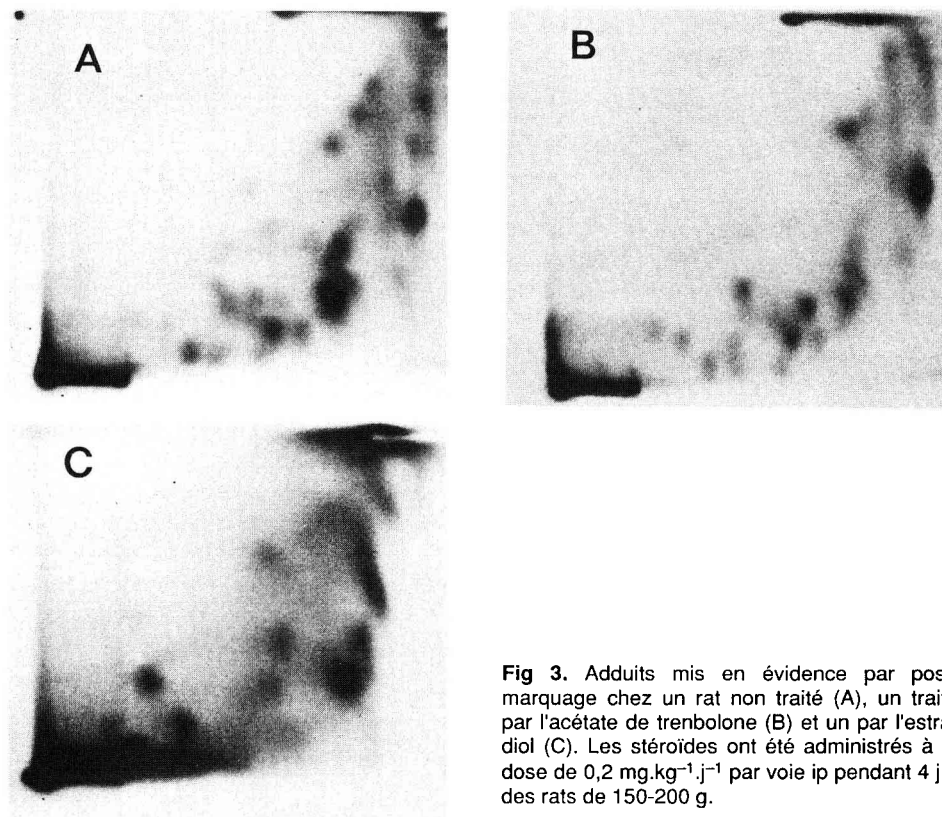


Fig 3. Adduits mis en évidence par post-marquage chez un rat non traité (A), un traité par l'acétate de trenbolone (B) et un par l'estradiol (C). Les stéroïdes ont été administrés à la dose de $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ par voie ip pendant 4 j à des rats de 150-200 g.

DISCUSSION

Fixation à l'ADN des molécules marquées

Les CBI de la trenbolone sont concordants avec ceux décrits dans la littérature par Barraud *et al* (1984) et Lutz *et al* (1988). De manière générale, le nombre d'adduits fixés augmente avec la dose. Le CBI du 17- β -estradiol mesuré par Barraud *et al* (1984) est de 11,4, soit globalement le double de celui rapporté ici. Bien que Lutz *et al* (1988) ne trouvent pas de fixation covalente du 17- β -estradiol, celle-ci a été dé-

montrée en postmarquage dans le foie (Liehr *et al*, 1986) et dans le rein (Liehr *et al*, 1987).

Le facteur critique de la mesure du CBI est la pureté de l'ADN obtenu. Les contrôles que nous avons réalisés tout au long de notre expérimentation ne laissent aucun doute quant à la pureté de l'ADN extrait, la quasi-absence de contamination protéique (moins de 1/5 000 en poids) et l'élimination totale de la radioactivité non liée.

Lutz *et al* (1988) ont mesuré le CBI de la β TB en utilisant des doses allant jusqu'à 950 nmol/kg , soit 27 fois supérieures à notre dose minimale. Ils trouvent un CBI

moyen de $10 \pm 4,2$, ce qui est de l'ordre de grandeur de nos résultats. Cette relative constance du CBI lorsque la dose varie entre 35 et 950 nmol/kg démontre une fixation covalente linéairement corrélée à la dose.

Les études avec les stéroïdes marqués laissent donc peu de doute quant à la réalité de la fixation covalente de la trenbolone; cette fixation est toutefois très faible, de l'ordre de grandeur de celle d'une hormone stéroïde naturelle comme le 17 β Estradiol. À titre de comparaison, les CBI que nous obtenons avec le 2-acétylaminofluorène, un génotoxique vrai, sont supérieurs à 300 (données non présentées).

Post-marquage

Les résultats rapportés ici constituent la première tentative de détection d'adduits de la trenbolone par post-marquage.

Le post-marquage au ^{32}P n'a pu confirmer ni la fixation de la trenbolone ni celle de l'estradiol en raison de la présence de nombreux adduits chez les animaux témoins. Cette fixation chez les animaux non traités s'est avérée reproductible (données non présentées); elle peut difficilement être imputée à un artefact car la grande force ionique des solvants de migration élimine tous les nucléotides non porteurs d'adduits. En outre, la présence d'adduits dans les tissus de rats non traités a déjà été décrite (Randerath *et al*, 1986) : leur taux augmente avec l'âge et leur origine est inconnue, quoiqu'elle soit probablement essentiellement alimentaire, *via* la présence d'hydrocarbures ou d'amines aromatiques contaminants. La présence de ces adduits peut contribuer à expliquer la carcinogenèse spontanée observée chez les mammifères.

Nos résultats démontrent que, même à dose massive, les adduits de la trenbolone et de l'estradiol ne sont pas décelables parmi ceux dus à l'environnement naturel. La signification toxicologique de cette fixation pourrait donc n'être pas supérieure à celle des lésions spontanées de l'ADN qui apparaissent au cours de la vie d'un individu.

Rappelons que les niveaux résiduels couramment observés après administration de trenbolone sont, si le délai d'attente est respecté, de 0,5 $\mu\text{g/kg}$ de l'isomère β dans le muscle (Pottier *et al*, 1973; Heitzman et Darwood, 1977; Laitem *et al*, 1978) : ceci signifie que la consommation de 200 g de viande correspond approximativement à une dose de $1,4 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/kg}$ de βTB pour un homme de 70 kg. La fixation étant proportionnelle à la dose, elle est donc dans ce cas *a priori* négligeable.

En conclusion, la trenbolone et l'estradiol sont capables de former des adduits sur l'ADN. La fixation est toutefois très faible. Les études en postmarquage suggèrent que l'importance quantitative par rapport aux lésions normales du génome en est négligeable. Par ailleurs, les tests à court terme de mutagenèse réalisés avec la trenbolone indiquent que cette fixation n'a pas de conséquence génotoxique. Il apparaît donc hautement probable que les tumeurs hépatiques induites à long terme par la βTB chez la souris soient dues à un effet promoteur, tel qu'il est observé avec les hormones stéroïdes naturelles.

RÉFÉRENCES

- Barraud B, Lugnier A, Dirheimer G (1984) Determination of the binding of trenbolone and zeranol to rat liver DNA *in vivo* as compared to 17- β estradiol and testosterone. *Food Addit Contam* 1, 147-155

- Heitzman RJ, Darwood DJ (1977) Residue levels of trenbolone and estradiol 17- β in plasma and tissues of steers implanted with anabolic steroid preparations. *Br Vet J* 133, 564-571
- Laitem L, Gaspar P, Bello I (1978) Detection of trenbolone residues in meat and organs of slaughtered animals by thin layer chromatography. *J Chromatogr* 147, 538-539
- Lamming GE, Ballarini G, Baulieu E *et al* (1987) Scientific report on anabolic agents in animal production. *Vet Rec* 121, 389-392
- Liehr JG, Avitts TA, Randerath E, Randerath K (1986) Estrogen-induced endogenous DNA adduction: possible mechanism of hormonal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 5301-5305
- Liehr JG, Hall ER, Avitts TA, Randerath E, Randerath K (1987) Localization of estrogen-induced DNA adducts and cytochrome P-450 activity at the site of renal carcinogenesis in the hamster kidney. *Cancer Res* 47, 2158-2159
- Lutz WK (1979) *In vivo* covalent binding of chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis. *Mutat Res* 65, 289-356
- Lutz WK, Deuber R, Caviezel M (1988) Trenbolone growth promotant: covalent DNA binding in rat liver and in *Salmonella typhimurium*, and mutagenicity in the Ames test. *Arch Toxicol* 62, 282-289
- Petit CR, Fournier PA, Rico AG, Burgat-Sacaze V, de Saqui-Sannes P (1989) *In vivo* covalent binding of 17- α -OH- and 17- β -OH-trenbolone to rat liver DNA. *Ann Rech Vét* 20, 319-326
- Pottier J, Busigny M, Grandaham JA (1973) Tissue residues in cows after implantation of trenbolone acetate. *J Anim Sci* 37, 256
- Randerath K, Reddy MV, Gupta RC (1981) ³²P post-labeling test for DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 6126-6129
- Randerath K, Reddy MV, Disher RM (1986) Age- and tissue-related DNA modifications in untreated rats: detection by ³²P-postlabeling assay and possible significance for spontaneous tumour induction and ageing. *Carcinogenesis (Lond)* 7, 1615-1617
- Reddy MV, Randerath K (1986) Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis (Lond)* 7, 1543-1551
- Richold M (1988) The genotoxicity of trenbolone, a synthetic steroid. *Arch Toxicol* 61, 249-258