

## Dosage de la noradrénaline, de la dopamine et de l'acide dihydroxyphénylacétique dans certains noyaux du cerveau de Rat<sup>1</sup>

La technique chromatographique sur couche mince d'AURÈS et al.<sup>2</sup> s'est révélée intéressante pour l'analyse qualitative des catécholamines et de leurs métabolites dans des fragments de cerveau<sup>3</sup>. Une mise au point quantitative s'imposait. Elle fait l'objet de cette publication.

**Matériel et méthode.** 1. Réactifs. La noradrénaline (NA) et la dopamine (DA), sous forme de sels bitartrate et bromhydrate, proviennent de la firme Fluka; l'acide 3-4 dihydroxyphénylacétique (DOPAC) de Calbiochem.

Les réactifs employés sont des produits chimiques pour analyse. L'éthylénediamine est distillée deux fois avant l'usage; l'isobutanol est chauffé à reflux pendant 3 h avec de la soude caustique (10 g/l) puis distillé<sup>4</sup>. La cellulose MN 300 HR (Mackerey et Nagel) est répartie sur des plaques de verre de 20 × 20 cm en une couche de 250 µm d'épaisseur suivant la méthode de Stahl. Les traces de métaux sont éliminées des chromatogrammes par le solvant servant de phase mobile. L'eau utilisée pour ces expériences est déminéralisée puis distillée sur verre.

2. Extraction et séparation par chromatographie. Des rats mâles et femelles d'un poids moyen de 200 g sont tués par décapitation. Les deux noyaux caudés et l'hypothalamus sont prélevés aussi rapidement que possible puis refroidis sur de la glace et pesés. Ils sont homogénéisés sur une lame porte-objet de microscope par environ 100 µl d'acétone acidifiée. Après évaporation à sec à 20 °C, le résidu est repris par 50 µl de HCl 0,001 N. On centrifuge à froid. Une partie de l'extrait acide sert au dosage proprement dit, l'autre à la localisation des substances sur les chromatogrammes. Les pertes sont calculées en ajoutant une quantité connue de NA, de DA ou de DOPAC à un aliquot de l'extrait acétonique initial amené à un volume déterminé.

Les extraits du noyau caudé sont chromatographiés en une dimension dans la phase butanol-pyridine-Hac glacial-H<sub>2</sub>O: 15:2:3:5 (I). Pour les extraits hypothalamiques, le solvant suivant est utilisé: acétate d'éthyle-Hac glacial-H<sub>2</sub>O: 5:1,5:3, phase organique (II)<sup>5</sup>. Il sépare l'acide dihydroxymandélique (DOMA) de la NA. Un troisième solvant (NaCl 10%, Hac glacial 1%, H<sub>2</sub>O, III)<sup>6</sup> fut parfois employé. Après chromatographie, les substances séparées sont révélées par l'éthylénediamine<sup>7</sup>.

3. Elution et dosage fluorométrique. Les aires de cellulose qui contiennent les amines et le métabolite séparés sont grattées au moyen d'une spatule et recueillies dans des tubes à centrifuger en polypropylène.

L'élution diffère suivant qu'il s'agit des amines ou de l'acide phénolique. Les amines sont élues par agitation pendant 30 min à température ordinaire dans l'acide acétique 1 M. Après centrifugation à 30 000 g à 2 °C, le surnageant est divisé en 2 parties, une pour le standard interne, l'autre pour le dosage quantitatif. Le «blanc» est préparé à partir d'une bande de cellulose ne contenant pas d'extrait; il donne une mesure fluorométrique équivalente à un «blanc tissulaire» préparé dans les mêmes conditions à partir du cervelet. La condensation avec l'éthylénediamine<sup>8</sup> est réalisée de la façon suivante: à 3,5 ml de surnageant, on ajoute 0,6 ml d'éthylénediamine, puis 0,5 ml d'une solution aqueuse 2 M de chlorhydrate d'éthylénediamine. On agite, place en étuve à 55 °C pendant 30 min, refroidit, sature la phase aqueuse par NaCl et extrait les produits fluorescents formés par 4 ml d'isobutanol.

Pour le DOPAC, l'élution se fait par 2,5 ml du mélange suivant: H<sub>2</sub>O 35 ml, HCl 2 N 1 ml, éthylénediamine

1,5 ml, agiter 3 min 30 sec. On centrifuge, divise en 2 parties, on continue ensuite suivant la technique décrite par MURPHY et al.<sup>9</sup>.

Les lectures se font au spectrofluorimètre Aminco Bowman; les différentes longueurs d'ondes (non corrigées) d'excitation et de fluorescence sont les suivantes:

	Excitation (nm)	Fluorescence (nm)
Noradrénaline	420	490
Dopamine	416	520
DOPAC	385	450

Certains dosages de NA et de DA ont été réalisés au fluorimètre Turner, modèle 110.

**Résultats.** Les courbes de référence établies à partir de quantités connues de NA, DA et DOPAC sont linéaires pour les concentrations comprises entre 0 et 50 ng/ml pour la NA et la DA et 0 et 300 ng/ml pour le DOPAC. Ces courbes sont également linéaires après chromatographie et élution. Le pourcentage de récupération varie entre 80 et 100% pour 40 et 200 ng d'amines et d'acide déposés sur les chromatogrammes. Les pertes totales subies pendant les différentes phases du dosage sont représentées au Tableau.

La sensibilité de la réaction varie en ordre décroissant de la façon suivante: NA, DA, DOPAC<sup>10</sup>.

**Noyau caudé et hypothalamus.** Après chromatographie des extraits de noyau caudé, nous observons la présence de DA (Rf 0,56) et de DOPAC (Rf 0,79). L'acide ascorbique (Rf 0,48), fluorescent dans nos conditions de tra-

Concentration en DA et DOPAC du noyau caudé et en NA de l'hypothalamus de rat

	N	Moyenne ± ES (µg/g)	Pourcentage de récupération
DA	5	9,55 ± 2,80	67,20 ± 12,00
DOPAC	5	2,85 ± 1,16	60,21 ± 6,32
NA	6	1,82 ± 0,39	42,80 ± 5,30

<sup>1</sup> Ce travail a été réalisé grâce à un subside du Fonds National de la Recherche Scientifique.

<sup>2</sup> D. AURÈS, R. FLEMING et R. HÅKANSON, J. Chromat. 33, 480 (1968).

<sup>3</sup> J. GÉRARDY, N. QUINAUX, T. MAEDA et A. DRESSE, Archs int. Pharmacodyn. Thér. 177, 492 (1969).

<sup>4</sup> S. UDENFRIEND, *Fluorescence Assay* (Academic Press, New York 1962), p. 154.

<sup>5</sup> A. VAHIDI et D. V. SIVA SANKAR, J. Chromat. 43, 135 (1969).

<sup>6</sup> J. B. PARRATT et G. B. WEST, J. Physiol., Lond. 137, 169 (1957).

<sup>7</sup> H. F. SCHNEIDER et C. N. GILLIS, Biochem. Pharmacol. 14, 623 (1965).

<sup>8</sup> H. WEIL-MALHERBE et A. D. BONE, Biochem. J. 51, 311 (1952).

<sup>9</sup> G. F. MURPHY, D. ROBINSON et D. F. SHARMAN, Br. J. Pharmac. 36, 107 (1969).

<sup>10</sup> J. KÄGI, M. BURGER et K. GIGER, Arch. exp. Path. Pharmak. 230, 470 (1957).

vail, a été identifié par réduction de  $\text{AgNO}_3$  en milieu acétique à froid. La teneur en acide homovanillique (HVA, Rf 0,90) du striatum des rats témoins est inférieure à la limite de sensibilité de la méthode.

Dans l'hypothalamus, nous retrouvons les substances déjà révélées auparavant<sup>3</sup> ainsi que le DOPAC. Les valeurs obtenues pour la DA, le DOPAC et la NA sont indiquées au Tableau. Les valeurs sont corrigées en fonction des pertes.

Nous avons injecté par voie i.p. à des rats plusieurs agents pharmacologiques modifiant la biosynthèse ou la métabolisation des catécholamines.

Des expériences préliminaires réalisées avec l'halopéridol (0,63 mg/kg), la réserpine (5 mg/kg), la L-dopa (200 mg/kg), le probenecid (200 mg/kg) et la tranylcypromine (2,5 mg/kg) nous ont montré les modifications cérébrales du taux d'amines et de leurs métabolites signalées par d'autres auteurs<sup>11-15</sup>. La Figure donne un exemple d'une expérience réalisée avec l'halopéridol.

**Discussion.** La condensation avec l'éthylénediamine de Weil-Malherbe s'est révélée une méthode suffisamment sensible pour doser de faibles quantités de catécholamines et métabolite dans le cerveau. Étant donné sa faible spécificité, une séparation préalable des différents composés est indispensable. A la différence d'autres auteurs<sup>9, 12, 13, 16</sup>,

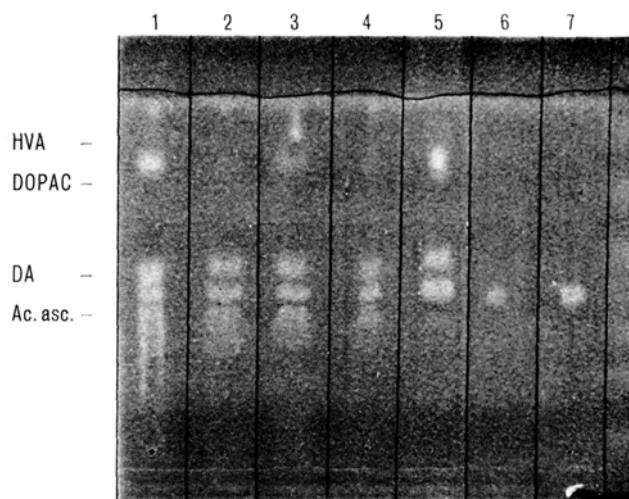
nous avons préféré la chromatographie sur couche mince de cellulose pour sa sensibilité, sa rapidité et son maniement facile<sup>17</sup>.

Les récupérations que nous obtenons sont acceptables, elles rejoignent des valeurs déjà publiées<sup>9, 12, 16</sup>, sauf pour la noradrénaline et l'hypothalamus où les pertes sont plus importantes. Une explication possible est l'adsorption de cette amine sur les protéines lors de l'évaporation sous vide.

Dans nos conditions opératoires, les spectres de fluorescence et les Rf de la dopamine et de la 5-hydroxytryptamine (5HT) sont fort rapprochés. Une séparation complète de ces deux amines sur chromatogramme dans la phase III nous autorise à rejeter l'éventualité d'une interférence de la 5HT<sup>18</sup> dans le dosage fluorométrique de DA.

Les valeurs des dosages effectués sont de l'ordre de grandeur des quantités trouvées précédemment<sup>19</sup> ou plus élevées.

La mise en évidence de l'acide ascorbique, cofacteur de la dopamine-β-hydroxylase<sup>20</sup> est intéressante. En effet, alors que cet enzyme est présent dans le noyau caudé<sup>21</sup>, la noradrénaline y est pratiquement absente.



Cellulose. But.-Pyr.-HAC-H<sub>2</sub>O (30:4:6:10). Ethylène diamine 5% K<sub>3</sub> Fe(CN)<sub>6</sub>.

Colonne 1: 25 µl extrait de noyau caudé de rat ayant reçu de l'halopéridol (0,63 mg/kg).

Colonne 2: 25 µl d'un extrait de rat témoin.

Colonne 3: 15 µl du même extrait que 1.

Colonne 4: 15 µl du même extrait que 2.

Colonne 5: mélange en solutions pures (acide ascorbique, DA, DOPAC, HVA).

Colonnes 6 et 7: acide ascorbique en solution pure.

**Summary.** After thin-layer chromatography separation, we have assayed quantitatively noradrenaline, dopamine and its deaminated metabolite 3,4 dihydroxyphenylacetic acid by the ethylenediamine method. In the hypothalamus and the caudate nucleus, the values obtained for the amines and phenolic acid estimation are equivalent or higher than those found by other authors. The presence of ascorbic acid has been shown in the caudate nucleus.

J. GÉRARDY, N. QUINAUX  
et A. DRESSE

*Institut de Thérapeutique expérimentale,  
Université de Liège, Boulevard de la Constitution, 32,  
B-4000 Liège (Belgium), 6 juillet 1970.*

<sup>11</sup> N. E. ANDEN, B. E. ROOS et B. WERDINIUS, *Life Sci.* 3, 149 (1964).

<sup>12</sup> N. E. ANDEN, B. E. ROOS et B. WERDINIUS, *Life Sci.* 2, 319 (1963).

<sup>13</sup> A. CARLSSON et N. A. HILLARP, *Acta physiol. scand.* 55, 95 (1962).

<sup>14</sup> D. F. SHARMAN, *Br. J. Pharmac.* 28, 153 (1966).

<sup>15</sup> H. GREEN et R. W. ERICKSON, *J. Pharmac. exp. Ther.* 129, 237 (1960).

<sup>16</sup> R. LAVERTY et D. F. SHARMAN, *Br. J. Pharmac.* 24, 759 (1965).

<sup>17</sup> W. P. DE POTTER, R. F. VOCHTEN et A. F. DE SCHAEFDRYVER, *Experientia* 21, 482 (1965).

<sup>18</sup> R. KUNTZMAN, P. A. SHORE, D. BOGDANSKI et B. B. BRODIE, *J. Neurochem.* 6, 226 (1961).

<sup>19</sup> H. NYBÄCK et G. SEDVALL, *Eur. J. Pharmac.* 5, 245 (1969).

<sup>20</sup> S. KAUFMAN, *Pharmac. Rev.* 18, 61 (1966).

<sup>21</sup> S. UDENFRIEND et C. R. CREVELING, *J. Neurochem.* 4, 350 (1959).

## Ein abstimmbarer Verstärker zur Aufnahme von Insektenstimmen

Bei der Registrierung leiser Tiergesänge (zum Beispiel Grashüpfer, aber auch Grillen) in Anwesenheit stärkerer Schallerzeuger (Oszillographenkamera usw.) tritt oft das Problem einer Isolierung des Gesanges vom Umweltlärm

auf. Dabei muss die Erhaltung der Tonfolgen und eine definierte Erfassung der aufgezeichneten Frequenz gewährleistet sein. Außerdem sollte die registrierbare Frequenz variabel sein, um sich den unterschiedlichen Tier-