

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 16, 1978, pp. 5-9

Differences dans le Comportement du Sang Humain et du Sang de Rat à l'Égard de la 3,4-Dihydroxy-*L*-phénylalanine et du 5-Hydroxy-*L*-tryptophane in Vitro

Données biochimiques et histochimiques

Par F. Geissbühler, J. Widmer, C. Bouras et J. Constantinidis

Laboratoires de Chimie et d'Histologie de la Clinique Psychiatrique de Bel-Air (Directeur de la Clinique: Prof. R. Tissot) CH-1225 CHENE-BOURG (Genève)

(Reçu Juin 3, 1977)

Résumé: La 3,4-dihydroxy-*L*-phénylalanine incubée à température ordinaire dans du sang humain complet reste stable pendant au moins 30 min. Dans les mêmes conditions, le 5-hydroxy-*L*-tryptophane tend à diminuer au cours du temps. Incubés dans du sang de rat anesthésié au pentobarbital, ces acides aminés diminuent en moins de 5 min à environ 50% de la quantité rajoutée au sang, puis se stabilisent (3,4-dihydroxy-*L*-phénylalanine) ou diminuent lentement (5-hydroxy-*L*-tryptophane).

Differences between human and rat blood towards 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine and 5-hydroxy-L-tryptophan in vitro. Biochemical and histochemical data

Summary: When incubated with whole human blood at ordinary temperature, 3,4-dihydroxy-*L*-phenylalanine remains unchanged for at least 30 min. Under the same experimental conditions, 5-hydroxy-*L*-tryptophan shows a tendency to decrease. When incubated with blood from pentobarbital anaesthetized rats, these aminoacids decrease to about 50% of the added quantity in less than 5 min; thereafter, their level remains stable (3,4-dihydroxy-*L*-phenylalanine) or slowly decreases (5-hydroxy-*L*-tryptophan).

Introduction

Bien que la 3,4-dihydroxy-*L*-phénylalanine (*L*-DOPA) et le 5-hydroxy-*L*-tryptophane soient largement utilisés, aussi bien comme agents thérapeutiques que comme moyens de recherche biologique, leur métabolisme dans le sang total in vitro ne semble pas, à notre connaissance, avoir été l'objet de recherches approfondies. Il nous a paru important d'en savoir plus à ce sujet, essentiellement pour préciser si des précautions techniques particulières doivent être prises entre le prélèvement du sang contenant ces acides aminés et l'exécution de leur dosage.

La présente étude a porté sur les variations in vitro de la concentration de *L*-DOPA et de 5-hydroxy-*L*-tryptophane exogènes dans le sang au cours du temps et à température ordinaire (environ 20°C), et sur la façon dont ces variations sont influencées par la concentration initiale de ces acides aminés, par le taux d'hémolyse du sang, et par un prétraitement du sang (hémolysé ou non) au moyen d'inhibiteurs des décarboxylases des acides

aminés aromatiques (bensérazide et 3-hydroxy-benzylhydrazine). Ces dosages biochimiques ont été complétés par des observations histochimiques fondées sur l'histofluorescence, et portant sur du sang prétraité ou non par un inhibiteur des monoamine-oxydases (nialamide) ou un inhibiteur des catéchol-O-méthyltransférases (tropolone).

Méthode

La concentration d'acide aminé ajouté au sang a été choisie par référence aux taux thérapeutiques(1). Le sang humain a été prélevé par ponction veineuse à l'aide de seringues en plastique contenant de l'héparinate de Na (50 U.UIP/ml de sang) chez des sujets normaux (4 femmes et 3 hommes de 21 à 42 ans) à jeun et s'abstenant de toute médication depuis au moins 15 jours. Le sang de rat a été obtenu par ponction cardiaque chez des animaux (mâles Wistar de 380 à 450 g) préalablement anesthésiés par du pentobarbital sodique (220 µmol/kg i.p.); en raison de la tendance accusée du sang de rat à l'hémolyse, les prélèvements ont été faits dans des seringues tout en verre et contenant de l'héparinate de Na (50 U.UIP/ml de sang). Le sang (1,5 ml par essai) a été incubé dans des tubes en verre ouverts à l'air libre et

laissés à température ordinaire (18–21 °C); la proportion, en volume, de réactifs ajoutés au sang n'a pas dépassé 1,4%; dans de telles conditions, aucun signe macroscopique d'hémolyse n'est jamais apparu. Le 5-hydroxy-*L*-tryptophane (2,0 mmol/l) a été dissous directement dans l'eau comme la bensérazide (51 mmol/l), le nialamide (112 mmol/l) et la tropolone (123 mmol/l). La *L*-DOPA (2,3 mmol/l), qui est peu stable dans l'eau, a été dissoute dans HCl 1 mmol/l. Le plasma a été séparé par centrifugation (2.600 g pendant 20 min pour le sang humain, mais 2.000 g au maximum pendant 20 min pour le sang de rat, en raison de la fragilité de ce dernier à l'égard des actions mécaniques), et déprotéinisé partiellement à pH 4,5 (2). Pour les dosages de DOPA portant sur le sang total, ce dernier a été déprotéinisé par l'adjonction de 7 volumes d'acide trichloracétique 0,4 mol/l. Les extraits déprotéinisés ont été immédiatement congelés et conservés à -20 °C. Les dosages ont été effectués dans un délai maximum de 4 jours. Après chromatographie de l'extrait déprotéinisé sur «DOWEX» 50W à pH 3,0, la DOPA a été dosée fluorométriquement après oxydation de l'éluat (CH₃COONa 50 mmol/l, pH 6,5) par K₃FeCN₆ en présence de Na₂B₄O₇ et réarrangement en milieu alcalin contenant de l'ascorbate de Na (rendement global de la méthode: 96,2 ± 3,9% (N = 10)) (2). Le 5-hydroxy-*L*-tryptophane a été dosé fluorométriquement sur le même éluat par condensation en milieu acide avec l'*o*-phthaldialdéhyde, selon Maickel (3) (rendement global de la méthode: 95,0 ± 5,2% (N = 10)); pour la 3-O-méthyl-dopa, l'extrait déprotéinisé a été laissé 10 min à pH 12,0 en vue de détruire les catéchols interférents, puis chromatographié comme ci-dessus; la fluorométrie a été effectuée après oxydation de l'éluat à pH 6,5 par NaIO₄ et réarrangement en milieu alcalin contenant de l'ascorbate de Na et du 3-mercapto-propionate de Na (4) (rendement global de la méthode: 92,3 ± 4,5% (N = 6)). Il existe une corrélation statistiquement significative entre les dosages de DOPA effectués sur le sang total (x) et ceux qui ont été faits après séparation du plasma (y): en calculant sur des résultats obtenus à partir de 4 échantillons dosés tels quels et dilués 1 : 1, on trouve que $r = 0,996$, $t = 27,3$ et $p < 0,001$; la droite de régression a pour valeur $y = 63 \text{ pmole} + 0,92 x$, alors que la limite de sensibilité de la méthode-définie comme la quantité de DOPA qui donne une lecture au fluoromètre égale à celle du blanc- est de $380 \pm 30 \text{ pmole}$ de DOPA; enfin, 4 échantillons préparés de façon identique (15,2 nmol de *L*-DOPA dans 1 ml de sang humain; incubation : 30 min) ont été dosés par les deux méthodes; on a trouvé $12,6 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{mol/l}$ de sang en dosant le sang total, et $12,4 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{mol/l}$ de sang en séparant le plasma ($p > 0,1$).

Les méthodes utilisées ici présentent entre elles une interférence inférieure à 1% ainsi qu'à l'égard de la bensérazide, du nialamide, de la tropolone et de diverses substances d'intérêt biologique (tryptophane, 5-hydroxytryptamine, noradrénaline, adrénaline, 3-O-méthyl-noradrénaline, 3-O-méthyladrénaline, dopamine, 3-O-méthyl-dopamine, tyrosine, phénylalanine). L'hémolyse a été

provoquée par exposition aux ultra-sons (sang humain) ou par simple agitation (sang de rat). L'importance de l'hémolyse a été estimée par simple appréciation visuelle.

Pour les observations histologiques, du sang humain et du sang de rat ont été incubés à la température ambiante pendant 30 min, en présence de 250 nmol de *L*-DOPA, 5-hydroxy-*L*-tryptophane, dopamine ou 5-hydroxytryptamine par ml de sang, sans ou après 30 min de préincubation avec un inhibiteur de la monoaminoxydase (nialamide: 87 $\mu\text{mol/l}$ de sang). Après l'incubation du sang, des frottis ont été effectués, séchés à l'air, traités aux vapeurs de formaldéhyde à 80° (méthode de Falck & Hillarp, (5)), et examinés au microscope à fluorescence. Dans ces conditions, les catécholamines et la *L*-DOPA donnent une fluorescence verte et la 5-hydroxytryptamine et le 5-hydroxy-*L*-tryptophane une fluorescence jaune.

Résultats

Pour permettre une comparaison entre les divers essais du même genre, les résultats ont été calculés en % molaire de la quantité d'acide aminé ajouté au sang. Les résultats obtenus sur le plasma ont été rapportés au sang total en tenant compte de la valeur de l'hématocrite.

L-DOPA

Les résultats concernant la stabilité de la *L*-DOPA au cours du temps (tab. 1) montrent que, chez l'homme et chez le rat, le taux de cet acide aminé ne varie pratiquement pas dans les conditions décrites ici. Cependant, le % de *L*-DOPA retrouvé dans le sang de rat ne représente environ que la moitié de celui qui caractérise le sang de l'homme. La concentration initiale de *L*-DOPA n'a pas d'effet significatif sur ces pourcentages. Des essais complémentaires ont montré que le prétraitement du sang par la bensérazide (340 $\mu\text{mol/l}$ de sang) ou la 3-hydroxy-benzylhydrazine (573 $\mu\text{mol/l}$ de sang) ne modifie pas les résultats. D'autre part, la *L*-DOPA incubée 30 min dans du plasma a été retrouvée quantitativement ($98 \pm 4, 7\%$, N = 6 pour l'homme, et $98,5 \pm 3,7, N = 6$ pour le rat). En revanche, la

Tab. 1. Relation entre le % de *L*-DOPA retrouvée et la durée d'incubation; influence du taux initial de *L*-DOPA. Les écarts-type sont indiqués chaque fois que possible. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'essais effectués.

Espèce	Durée d'incubation (en min)	Composition du mélange d'incubation							
		2	5	10	15	20	30	45	60
Homme	15,2 $\mu\text{mol/l}$ de sang <i>L</i> -DOPA	87,3 ± 3,2 (3)	98,8 ± 1,4 (3)	90,2 ± 1,1 (7)	90,4 ± 2,9 (3)	89,7 ± 2,9 (6)	91,4 ± 4,3 (4)		
	4,1 $\mu\text{mol/l}$ de sang <i>L</i> -DOPA			47,7 ± 4,2 (2)		47,0 ± 1,9 (2)			46,1 ± 2,6 (2)
Rat	15,2 $\mu\text{mol/l}$ de sang <i>L</i> -DOPA			49,6 (1)		50,8 (1)	46,6 ± 2,2 (17)	46,5 (1)	48,5 (1)
	4,1 $\mu\text{mol/l}$ de sang <i>L</i> -DOPA								

L-DOPA incubée dans du sang hémolysé même partiellement (plasma de teinte rose pâle) tombe à un taux inférieur à 5% après 5 min chez l'homme, et à $19 \pm 11\%$ (4) après 30 min chez le rat. Le prétraitement du sang hémolysé par la bensérazide (340 $\mu\text{mol/l}$ de sang) aboutit, chez l'homme comme chez le rat, à des taux de *L*-DOPA qui ne se distinguent pas, statistiquement, de ceux du sang correspondant non hémolysé. La formation de 3-O-méthyl-dopa à partir de *L*-DOPA exogène par le sang humain hémolysé est faible: $10,0 \pm 1,3\%$ ($N = 6$). Enfin, les taux de DOPA et de 3-O-méthyl-dopa dans les éléments figurés du sang non hémolysé incubé avec 15,2 $\mu\text{mol/l}$ *L*-DOPA de sang se sont révélés inférieurs à la limite de sensibilité des méthodes appliquées ici, aussi bien chez l'homme que chez le rat (limites de sensibilité calculées pour 1 g de culot récupéré après centrifugation du plasma: 760 \pm 25 pmol/g pour la *L*-DOPA et 954 \pm 32 pmol/g pour la 3-O-méthyl-dopa).

5-Hydroxy-*L*-tryptophane

Les résultats concernant l'évolution du pourcentage de 5-hydroxy-*L*-tryptophane en fonction de la durée de l'incubation (tab. 2) montrent qu'ici aussi, le % retrouvé est plus faible chez le rat que chez l'homme. De plus, ce pourcentage tend à décroître avec le temps; dans les deux cas, cette diminution est statistiquement significative après 45 min. Des essais préliminaires ont montré que le prétraitement du sang humain avec de la bensérazide (340 $\mu\text{mol/l}$ de sang) ou de la 3-hydroxy-benzylhydrazine (573 $\mu\text{mol/l}$ de sang), suivi d'une incubation de 20 min, ne modifie pas le pourcentage de 5-hydroxy-*L*-tryptophane retrouvé. En revanche, du sang de rat hémolysé, incubé 20 min, ne contient plus que $6,3 \pm 0,3\%$ ($N = 3$) de la dose initiale de 5-hydroxy-*L*-tryptophane; ce pourcentage atteint $46,4 \pm 4,5\%$ ($N = 3$) après prétraitement du sang par la bensérazide (340 $\mu\text{mol/l}$ de sang).

Tab. 2. Relation entre le % de 5-hydroxy-*L*-tryptophane retrouvé et la durée d'incubation; influence du taux initial de 5-hydroxy-*L*-tryptophane. Les écarts-type sont indiqués chaque fois que possible. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'essais effectués.

Espèce	Durée d'incubation (en min)							
	Composition du mélange d'incubation	5	10	20	30	45	60	180
Homme	13,6 $\mu\text{mol/l}$ de sang 5-hydroxy- <i>L</i> -tryptophane		99,2 \pm 3,7 (5)	100,3 \pm 2,1 (4)	97,7 \pm 5,1 (4)	92,8 \pm 5,1 (3)		
Rat	13,6 $\mu\text{mol/l}$ de sang 5-hydroxy- <i>L</i> -tryptophane	69,0 (1)	65,7 \pm 3,0 (6)	62,1 \pm 3,8 (3)	62,1 \pm 4,0 (6)	61,1 \pm 2,3 (4)	57,8 \pm 4,1 (6)	54,7 \pm 4,2 (3)
	3,6 $\mu\text{mol/l}$ de sang 5-hydroxy- <i>L</i> -tryptophane		67 (1)		63 (1)		56 (1)	

Tab. 3. Localisation et intensité de la fluorescence observée au microscope à fluorescence sur des frottis de sang incubés 30 min en présence de 250 nmole de *L*-DOPA, 5-hydroxy-*L*-tryptophane, *L*-dopamine et 5-hydroxytryptamine par ml de sang, avec ou sans prétraitement au nialamide (875 $\mu\text{mol/l}$ de sang) et après exposition, pendant 30 min, à des vapeurs de CH_2O à 80°C. Les estimations de la fluorescence ont été faites sur la base de trois expériences. Les résultats portant sur la dopamine et la 5-hydroxytryptamine sont donnés à titre de référence.

	Homme				Rat			
	Plasma	Plaquettes	Leucocytes	Hématies	Plasma	Plaquettes	Leucocytes	Hématies
Témoins	(+)	—	—	—	—	—	(+)	—
<i>L</i> -DOPA	++	—	—	—	+	++	++	—
<i>L</i> -DOPA + nialamide	++	—	—	—	++	+++	++	—
Dopamine	++	++	++	—	+	+++	++	—
Dopamine + nialamide	++	+++	+++	—	++	++++	+++	—
5-Hydroxy- <i>L</i> -tryptophane	+	—	—	—	(+)	++	—	—
5-Hydroxy- <i>L</i> -tryptophane + nialamide	++	—	+	—	+	+++	—	—
5-Hydroxytryptamine	++	—	—	—	(+)	+	—	—
5-Hydroxytryptamine + nialamide	++	+	—	—	+	+++	—	—

Histologie

Le tableau 3 montre que:

- le plasma humain incubé avec *L*-DOPA ou dopamine montre une fluorescence verte diffuse, avec ou sans nialamide;
- l'incubation avec 5-hydroxy-*L*-tryptophane ou 5-hydroxytryptamine avec ou sans nialamide donne une fluorescence plasmatique jaune;
- le même phénomène est observé avec le plasma du rat, mais ici le nialamide accentue la fluorescence verte et jaune;
- les plaquettes humaines montrent, en présence de dopamine, une fluorescence verte accentuée par le nialamide;
- Les plaquettes du rat présentent le même phénomène, mais plus intense, et montrent également après incubation avec *L*-DOPA une fluorescence verte accentuée par le nialamide;
- les leucocytes de l'homme et du rat se comportent comme leurs plaquettes avec *L*-DOPA et dopamine;
- les plaquettes du rat se chargent en fluorescence jaune en présence de 5-hydroxy-*L*-tryptophane et de 5-hydroxytryptamine, et cette fluorescence est accentuée par le nialamide;
- les plaquettes humaines montrent une fluorescence jaune en présence de 5-hydroxytryptamine + nialamide, tandis que les leucocytes humains la montrent en présence de 5-hydroxy-*L*-tryptophane + nialamide;
- les hématies de l'homme et du rat ne se chargent pas en fluorescence verte ou jaune avec aucun de ces traitements, ni même avec un traitement supplémentaire par un inhibiteur de la catechol-*O*-méthyltransferase (tropolone, 820 $\mu\text{mol/l}$).

Discussion

La stabilité de la *L*-DOPA et du 5-hydroxy-*L*-tryptophane dans le sang *in vitro* joue certainement un rôle important dans la conception d'expériences mettant en oeuvre le taux sanguin de ces acides aminés. Nos résultats suggèrent qu'à la condition formelle d'éviter toute hémolyse, la *L*-DOPA présente une stabilité suffisante pour qu'il soit possible de la doser sans entourer le sang de précautions particulières, au moins pendant les 30 premières minutes qui suivent la prise de sang chez l'homme. En ce qui concerne le rat, si l'on admet que la chute initiale rapide du taux d'acide aminé que nous avons constatée a lieu aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, on peut estimer à 60 min le délai maximum entre la prise de sang et la séparation du plasma. En revanche, étant donné la diminution du 5-hydroxy-*L*-tryptophane au cours du temps, il semble judicieux de procéder à la séparation du plasma à temps fixe, au plus tard 45 min après la prise de sang.

En ce qui concerne la *L*-DOPA chez l'homme, les observations histologiques montrent que les éléments

figurés du sang ne deviennent pas fluorescents, même après nialamide, alors que le plasma présente une fluorescence que le nialamide ne fait pas varier; ces faits suggèrent l'idée que, chez l'homme, la *L*-DOPA rajoutée au sang *in vitro* ne pénètre pratiquement pas dans les éléments figurés et demeure quasiment inchangée dans le plasma, ce que corroborent nos observations biochimiques (90% de la *L*-DOPA incubée se retrouve dans le plasma; la formation de 3-*O*-métyldopa est négligeable; la *L*-DOPA est présente en concentration insignifiante dans le culot de centrifugation du sang). D'ailleurs, *Dairman* et al. ont montré que les hématies intactes et purifiées ne décarboxylent pas la *L*-DOPA (6). En contrepartie, dans le sang du rat incubé avec la *L*-DOPA, les leucocytes, les plaquettes et le plasma présentent une fluorescence verte qui, dans les deux derniers cas, est accentuée par le nialamide. En conséquence, certains éléments figurés du sang de rat paraissent jouer un rôle actif dans le catabolisme sanguin de la *L*-DOPA. Le cas des hématies semble particulier puisqu'elles ne présentent pas de fluorescence, même si, avant d'être incubé avec la *L*-DOPA, le sang est traité avec du nialamide ou de la tropolone; ce qui pourrait s'expliquer en admettant que, chez le rat comme chez l'homme, les hématies ne captent pas la *L*-DOPA (6). Enfin, les taux très bas de *L*-DOPA relevés dans le culot de centrifugation du sang de rat surchargé en cet acide aminé suggèrent l'idée que si de la *L*-DOPA a pénétré dans les éléments figurés du sang, elle y a été rapidement métabolisée.

En ce qui concerne le 5-hydroxy-*L*-tryptophane, la situation est différente: en effet, un prétraitement du sang humain par le nialamide fait apparaître de la fluorescence dans les leucocytes et augmente celle du plasma. On peut voir là le signe d'un métabolisme leucocytaire du 5-hydroxy-*L*-tryptophane, concept qui est en accord avec la baisse du 5-hydroxy-*L*-tryptophane que nous avons décelée *in vitro* au cours du temps. Chez le rat, après 5-hydroxy-*L*-tryptophane ou 5-hydroxytryptamine, seules les plaquettes présentent de la fluorescence qui, par ailleurs, est augmentée après nialamide. Comme il est admis que les plaquettes du rat sont pauvres (7) sinon dépourvues (8) en monoamineoxydases, cette accumulation de la fluorescence après nialamide peut être interprétée comme une augmentation de la capture et du stockage de 5-hydroxytryptamine, rendus tous deux possibles par le blocage du catabolisme de la 5-hydroxytryptamine dans le milieu où se trouvent les plaquettes.

Chez le rat, la succession dans le temps d'une chute initiale rapide (en moins de 2 min) des taux de *L*-DOPA et de 5-hydroxy-*L*-tryptophane et d'une situation beaucoup plus stable pose un problème d'interprétation qui ne peut être entièrement résolu à l'aide de nos résultats. En effet, si nos observations histologiques ont montré que certains éléments figurés du sang de rat semblent agir sur ces acides aminés, elles ne permettent pas d'y situer ou d'en exclure le lieu de l'évolution en

deux temps que nous avons constatée. D'autre part, l'absence d'effet des inhibiteurs des décarboxylases avec lesquels nous avons prétraité le sang intact de rat permet d'écarter l'intervention de la 3,4-dihydroxy-*L*-phénylalanine carboxylase (EC 4.1.1.26) et de la 5-hydroxy-*L*-tryptophane carboxylase (EC 4.1.1.28). On peut également estimer que le plasma de sang de rat est pratiquement dépourvu d'activité décarboxylasique propre puisqu'on y retrouve toute la *L*-DOPA qui y a été incubée. En outre, étant donné qu'en modifiant par un facteur de 3,7 la concentration initiale d'acide aminé on n'altère pas son pourcentage de diminution, on peut estimer que, dans ces conditions, on se trouve en présence d'un phénomène non saturé. Enfin, un effet

dû à l'anesthésique est également possible. Quant aux effets de l'hémolyse sur les taux sanguins de *L*-DOPA et de 5-hydroxy-*L*-tryptophane, ils peuvent être attribués, pour une large part, aux décarboxylases spécifiques libérées par l'hémolyse, puisqu'en prétraitant le sang hémolysé par un inhibiteur des décarboxylases des acides aminés aromatiques on empêche presque totalement la disparition des deux acides aminés étudiés ici. Enfin, comme les décarboxylases spécifiques ne se trouvent pratiquement pas dans les hématies (6), la participation de ces dernières à la décarboxylation de la *L*-DOPA et du 5-hydroxy-*L*-tryptophane par le sang hémolysé doit être peu importante dans nos conditions expérimentales.

Bibliographie

1. Geissbühler, F., Constantinidis, J., Eisenring, J.-J., Krassoievitch, M., Yanniotis, G. & Tissot, R. (1971). *Rev. Europ. Etudes Clin. Biol.* 17, 38-44.
2. Geissbühler, F. (1973). *Clin. Chim. Acta* 45, 423-427.
3. Maickel, R. P. (1972). *Methods Neurochem.* 2, 101-129.
4. Geissbühler, F. & Hovaguimian, Th. (en préparation).
5. Falck, B., Hillarp, N. A., Thieme, G. & Torp, A. (1962). *J. Histochem. Cytochem.* 10, 348-354.
6. Dairman, W. & Christenson, J. G. (1973). *Eur. J. Pharmacol.* 22, 135-140.
7. Paasonen, M. K. & Solatunturi, E. (1965). *Ann. Med. Exp. Fenniae* 43, 98-100.
8. Da Prada, M. (communication personnelle).

Dr. F. Geissbühler, P.D.
Chef du Laboratoire de Chimie de la
Clinique Psychiatrique de Bel-Air
CH-1225 Chêne-Bourg (Genève)
Suisse

