

Détection voltamétrique des catécholamines dans le bulbe olfactif du rat

Abdelhalem MESFIOUI ¹✧, Aboubaker EL HESSNI ¹, François MATH ²,
Mohamed Khaled CHOULLI ¹ & Jean-Louis DAVRAINVILLE ²

(Reçu le 29/05/1995 ; Accepté le 21/05/1996)

تحديد فولتاميتري الكاتيكولامينات في البصلة الشمية للفأر

لقد استعملت في هذا البحث الفولتاميتري مرفقة بإليكترود من ليف الكربون لتحديد الكاتيكولامينات. مكنت دراسة في الزجاج من وضع علاج كهروكيميائي لتحديد الكاتيكولامينات و قد حسن هذا العلاج كثيرا من انتقائية، حساسية و استقرار جواب ليف الكربون في الكائن الحي . و مكنت الإليكترود المعالجة إليكتروكيميائيا من تحديد نسب جد قلية (710⁻ إلى 10⁻⁸) من الكاتيكولامينات في البصلة الشمية للفأر.

الكلمات المفتاحية : الفولتاميتري - الكاتيكولامينات - البصلة الشمية - الفأر.

Détection voltamétrique des catécholamines dans le bulbe olfactif du rat

La voltamétrie différentielle sur impulsions normales (D.N.P.V.) associée à une fibre de carbone traitée électrochimiquement a été conçue pour la détermination des catécholamines. Une étude *in vitro* a permis de mettre au point un traitement électrochimique pour la détection des catécholamines qui a amplement amélioré les performances de l'électrode en termes de sélectivité, de sensibilité et de stabilité de la réponse. *In vivo*, l'électrode ainsi traitée a servi pour l'évaluation de très faibles concentrations (10⁻⁷ à 10⁻⁸ M) des catécholamines extracellulaires au niveau du bulbe olfactif du rat.

Mots clés: Voltamétrie - Catécholamines - Bulbe Olfactif - Rat - Dosage *in vivo*

Voltammetric detection of catecholamines in the rat olfactory bulb

Differential normal pulse voltammetry (DNPV) associated to electrochemically treated carbon fiber electrode has been used for catecholamines determination. *In vitro*, study has permitted to take out electrochemical treatment for catecholamines detection. This treatment has widely improved selectivity, sensibility and stability of response. *In vivo*, treated electrode was used for determination of very low concentrations (10⁻⁷ to 10⁻⁸ M) of extracellular catecholamines in the rat olfactory bulb.

Key words: Voltammetry - Catecholamines - Olfactory bulb - Rat - Assay *in vivo*

¹ Unité de Pharmacologie et Toxicologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, 14 000 Kénitra, Maroc

² Laboratoire de Physiologie Générale II, Université de Nancy I, BP 239, 54506 Vandoeuvre-Les Nancy, Cedex, France

✧ Auteur correspondant

INTRODUCTION

Différentes techniques biochimiques, pharmacologiques et immuno-histochimiques ont été développées dans le but d'étudier la libération des neurotransmetteurs dans le système nerveux central. Ces techniques étaient, néanmoins, incapables d'aboutir à des données qualitatives et quantitatives.

L'application *in vivo* des méthodes électrochimiques présente une alternative pour évaluer la libération des monoamines.

En 1973, Kissinger *et al.* tentaient, pour la première fois, d'appliquer une méthode électrochimique pour la détection *in vivo* de substances électroactives. Depuis, l'électrochimie *in vivo* a été développée dans le but de détecter et d'évaluer la concentration de substances électroactives dans le système nerveux central. Elle permet, surtout, de suivre leurs variations en fonction des situations physiologiques ou pharmacologiques (Gonon *et al.*, 1981, 1983, 1984; Portela *et al.*, 1994 ; Brett *et al.*, 1994). Ces substances, facilement oxydables, présentes dans le système nerveux central, sont principalement les catéchols (Garris *et al.*, 1994; Wiczorek & Kruk, 1994), les 5-hydroxyindoles (Lory-Lavolée, 1984) et certains acides tels que l'acide ascorbique (Miele *et al.*, 1994).

Les méthodes électrochimiques consistent à mesurer le courant produit par l'oxydation des composés à proximité d'une électrode (capteur électrochimique) lors de l'application d'une variation de potentiel. Les caractéristiques techniques des différentes méthodes électrochimiques conditionnent leurs performances en termes de sélectivité, de sensibilité et de stabilité de la détection.

La polarographie et la voltamétrie sont les deux principales techniques d'étude des substances oxydables ou réductibles. Depuis les années 80, les électrophysiologistes s'intéressent davantage à la voltamétrie pour ses performances : simplicité d'utilisation de l'électrode à fibre de carbone, reproductibilité, rapidité.

Dans ce travail, on essaie d'adapter une étude électrochimique, la voltamétrie différentielle sur impulsions normales (DNPV) en l'occurrence, pour évaluer la concentration des catécholamines extracellulaires dans le bulbe olfactif lors de

diverses situations expérimentales chez le rat anesthésié.

MATÉRIEL & MÉTHODES

La DNPV (Differential Normal Pulse Voltametry) est très puissante et efficace mais requiert un matériel plus délicat à réaliser. Ce matériel (Gonon *et al.*, 1984), a été conçu selon les besoins des électrophysiologistes.

1. Dispositif et appareillage

Le capteur est une électrode à fibre de carbone de 8 μm de diamètre. On a repris la confection classique des électrodes au carbone (Gonon *et al.*, 1983).

La DNPV se base sur l'excitation du milieu par une suite d'impulsions doubles croissantes. Le générateur qu'on a réalisé fournit des impulsions montrant qu'effectivement la zone de potentiel est balayée par des pré-impulsions d'amplitude croissante permettant le retour de l'électrode à un potentiel de repos.

En plus, sur chaque pré-impulsion, une impulsion d'amplitude constante est imposée. Celle-ci permet une mesure différentielle après élimination de la composante capacitive.

La cellule potentiostatique est destinée à réguler le courant d'oxydation ou de réduction et à amplifier les courants apparaissant sur l'électrode de carbone. On a choisi le montage potentiostatique à 3 électrodes pour éviter les chutes ohmiques (Gonon *et al.*, 1984).

La chaîne de mesure est un dispositif électronique contenant deux parties principales:

- une sonde de petite taille permettant d'amplifier et de convertir le courant,
- un ensemble de mesure pour le traitement du signal et le calcul du courant propre dû à l'oxydation des substances électroactives présentes dans le milieu à étudier,
- éventuellement une table traçante pour enregistrer les résultats.

2. Paramètres de mesure

Pour l'étude des catécholamines, les paramètres des mesures sont les suivantes :

- gamme de potentiel explorée: -100 à + 400 mV ;
- différence de potentiel entre l'impulsion et la

- préimpulsion DV = 50 mV ;
- période T = 0.5 s ;
- durée de l'impulsion: 50 ms ;
- durée de la préimpulsion: 200 ms ;
- différence entre deux impulsions successives: DV = 2 mV, ce qui est équivalent à une pente de 4 mV/sec;
- nombre d'impulsions par cycle: 255 ;
- un cycle de mesure dure presque 2 min.

3. Traitement électrochimique de l'électrode à fibre de carbone

Pour la détection des catécholamines, et en absence d'un traitement rigoureux, on a imposé à la fibre de carbone le traitement électrochimique suivant:

- avant son utilisation, l'électrode est plongée dans une solution tamponnée à pH = 7,4 ("phosphate buffered saline: PBS") ;
- pour la dopamine: on applique à l'électrode un courant triangulaire, d'amplitude 1 V, de fréquence 70 Hz, pendant 1 min ;
- pour la noradrénaline: on applique à l'électrode un courant triangulaire, d'amplitude 1,5 V, de fréquence 70 Hz, pendant 1 min 30 sec.

4. Préparation animale

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des rats de race wistar d'un poids de l'ordre de 300 g. Les animaux sont anesthésiés par équithésine (2,5 mg/kg) puis immobilisés par injection intra-péritonéale du flaxédil (10 mg/kg). Ensuite, ils sont placés dans un appareil stéréotaxique. On a repris les mêmes conditions expérimentales utilisées dans les essais *in vitro*. La fibre de carbone (8 µm de diamètre et 500 µm de longueur active) traitée électrochimiquement est descendue à différents niveaux du bulbe olfactif.

RÉSULTATS

1. Étude *in vitro*

Les voltammogrammes obtenus, *in vitro*, avec une microélectrode en fibre de carbone non traitée plongée dans des solutions de noradrénaline (NA), de dopamine (DA) et d'acide ascorbique (AA), sont caractérisés par la présence de petits pics à 70, 100 et 120 mV respectivement (partie gauche de la figure 1).

Dans des solutions contenant un mélange de NA et d'AA ou de DA et d'AA, les différents pics sont

placés aux mêmes potentiels (partie gauche de la figure 2).

Ces données confirment la nécessité d'un traitement de la fibre de carbone pour résoudre deux problèmes majeurs, souvent rencontrés lors des études voltamétriques, qui sont la sensibilité et la sélectivité de la réponse.

Avec des électrodes traitées électrochimiquement et plongées dans des solutions de NA, de DA et d'AA ; et dans des mélanges contenant la NA et l'AA ou la DA et l'AA, les résultats (partie droite des figures 1 et 2) montrent que:

- le pic correspondant à l'AA est très réduit et parfois disparaît complètement ;
- l'amplitude des pics correspondant à la NA et à la DA augment respectivement d'un facteur de 4,5 et de 5 ;

Les réponses des électrodes traitées sont linéaires avec des concentrations croissantes de NA ou de DA 10^{-9} à 10^{-5} moles/l (Figures 3A et 3B).

Le signal enregistré *in vitro* pendant plus de deux heures dans des solutions de NA ou de DA, est d'amplitude constante et ne se déforme pas (Figures 4A et 4B).

Ces essais *in vitro* montrent que le traitement qu'on a préconisé pour l'étude des catécholamines a nettement amélioré les performances de l'électrode en termes de sélectivité, de sensibilité et de stabilité de la détection.

2. Étude *in vivo*

Avec une fibre de carbone traitée électrochimiquement et descendue à différents niveaux du bulbe olfactif, on a obtenu les pics de NA et de DA aux mêmes potentiels (70 et 100 mV respectivement) et avec les mêmes caractéristiques que celles de l'étude *in vitro*, alors que le pic d'AA (120 mV) n'apparaît que très faiblement. Cette technique nous a permis de mesurer les concentrations des catécholamines extracellulaires dans le bulbe olfactif du rat. Le tableau 1 montre que:

- la dopamine est environ 4 fois plus concentrée au niveau de la couche superficielle qu'au niveau de la couche profonde ;
- la distribution de la noradrénaline est plus ou moins homogène à travers les différentes couches du bulbe olfactif.

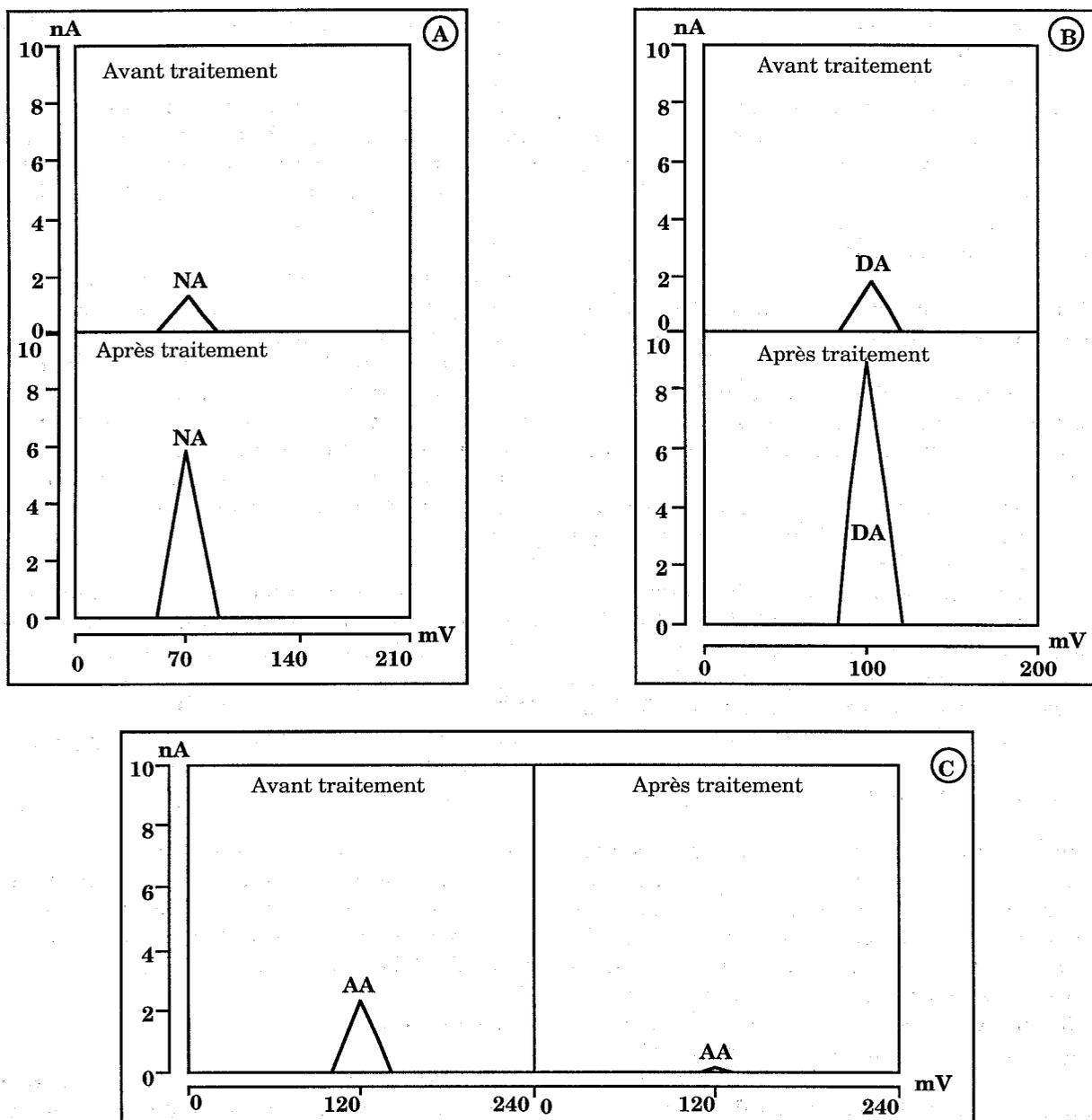


Figure 1. Effet du traitement électrochimique préconisé pour la détection des catécholamines sur le signal détecté par des micro-électrodes à fibre de carbone

Voltammogrammes établis par DNPV *in vitro* : A : dans une solution de noradrénaline (NA) (10^{-6} M) ; B : dans une solution de dopamine (DA) (10^{-6} M) ; C : dans une solution d'acide ascorbique (AA) (10^{-3} M)

DISCUSSION

Classiquement, la mise en évidence des substances neuroactives dont les catécholamines, au niveau du système nerveux central, fait appel à des techniques cytochimiques et immunohistochimiques.

Ces techniques sont généralement réalisées sur des coupes ou fractions tissulaires, autrement dit,

chez l'animal *post-mortem* (Jaffé & Cuello, 1980 ; Mc Lean & Shipley, 1987).

Les résultats obtenus démontrent, d'une façon indirecte, la présence des catécholamines au niveau de différentes régions du cerveau (Halasz & Shepherd, 1983). Cependant, ces résultats ne renseignent aucunement sur la dynamique de ces agents neuroactifs très abondants au niveau de la fente synaptique où ils assurent un rôle primordial

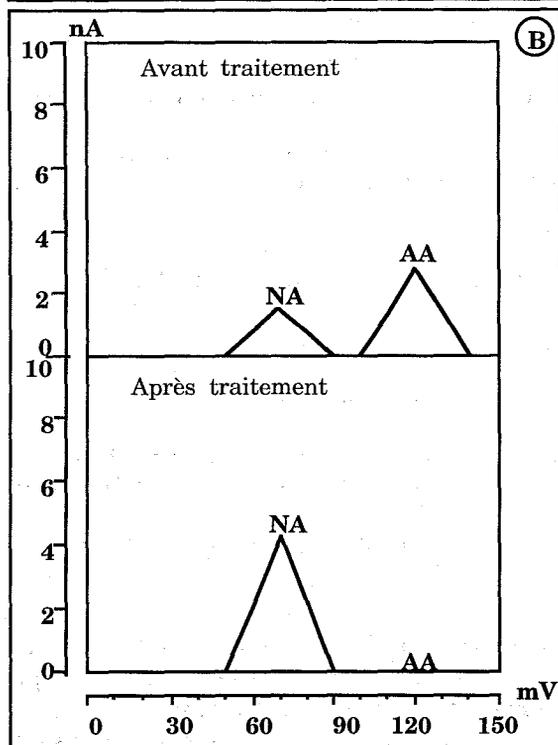
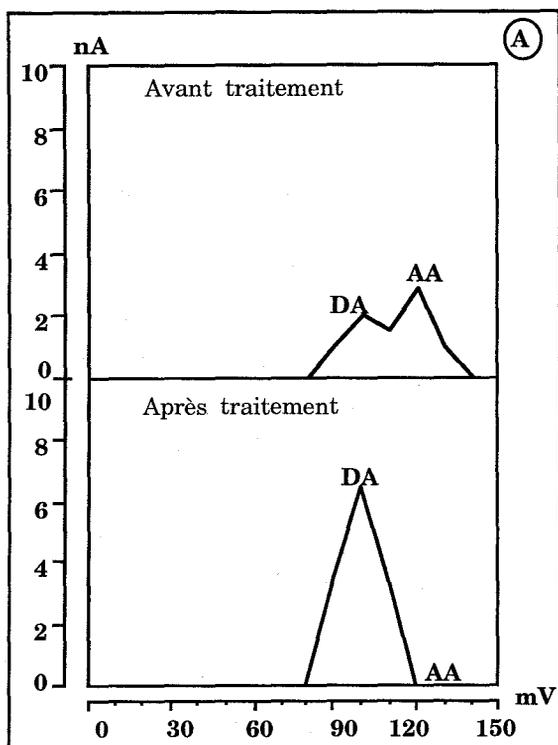


Figure 2. Effet du traitement électrochimique préconisé pour la détection des catécholamines sur le signal détecté par des micro-électrodes à fibre de carbone

Voltammogrammes établis par DNPV *in vitro* : A : dans un mélange DA ($10^{-7}M$) et AA ($10^{-3}M$) ; B : dans un mélange NA ($10^{-7}M$) et AA ($10^{-3}M$)

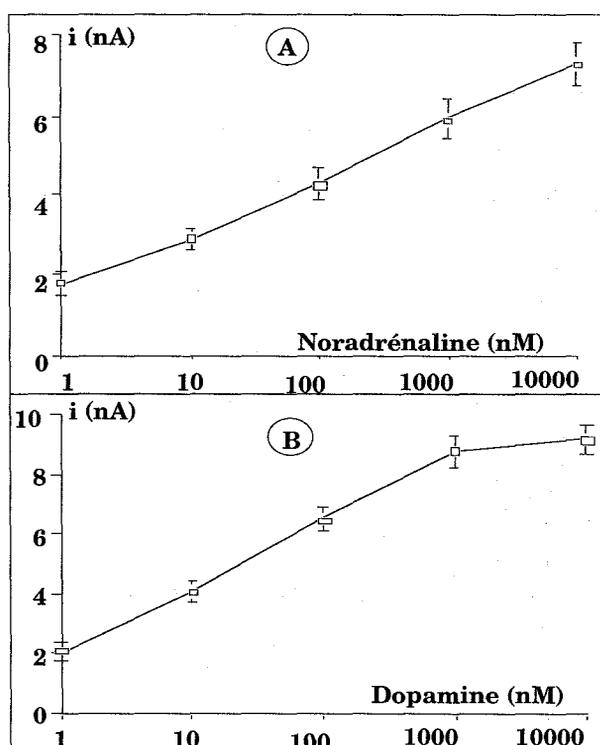


Figure 3. Courbes d'étalonnage (courant d'oxydation en fonction de la concentration) obtenues *in vitro* par la DNPV associée à la fibre de carbone traité

A: dans une solution de noradrénaline ; B: dans une solution de dopamine. Chaque point représente la moyenne de 4 déterminations \pm écart type

dans la neurotransmission. Cet handicap a incité les neurophysiologistes à faire d'autres investigations. En effet, de nombreux travaux ont montré l'intérêt des techniques électrochimiques pour la mesure *in vivo*, dans le cerveau, des concentrations extracellulaires des catécholamines (Stamford *et al.*, 1985).

Le problème majeur rencontré est dû à la présence d'acide ascorbique qui s'oxyde à un potentiel proche de celui des catéchols (Buda *et al.*, 1980 ; Mesfioui, 1988). En plus, la plupart des méthodes électrochimiques qui ont été proposées ne sont pas sélectives, ce qui rend difficile l'interprétation des variations du courant d'oxydation dans les divers protocoles expérimentaux. Buda *et al.* (1980), en utilisant la voltamétrie impulsionnelle différentielle associée à des micro-électrodes à fibres de carbone traitées électrochimiquement, ont pu mesurer *in vitro* ou *in vivo*,

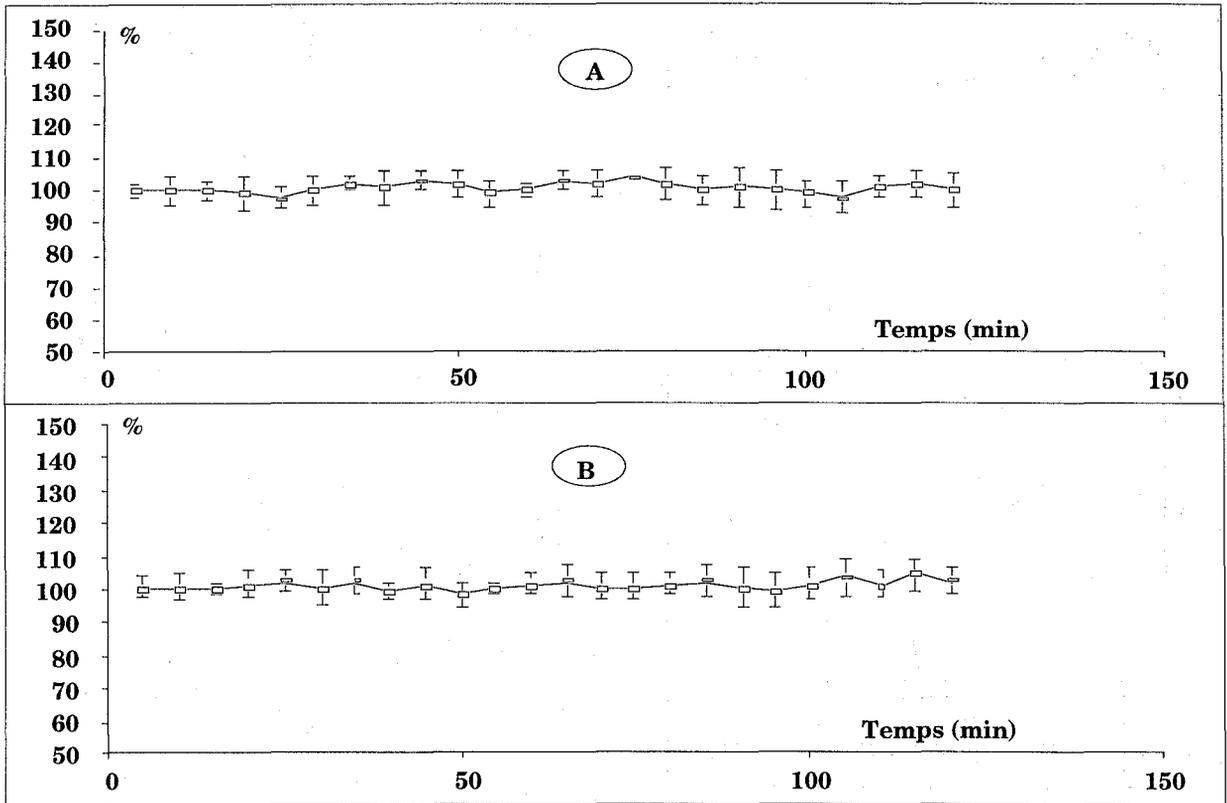


Figure 4. Évolution de la hauteur des pics mesurés à partir des voltamogrammes enregistrés *in vitro* par la DNPV associée à la fibre de carbone traitée

A: dans une solution de noradrénaline (NA) (10^{-7} M); B: dans une solution de dopamine (DA) (10^{-7} M). Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs observées pendant les 15 premières minutes. Chaque point représente la moyenne de 4 déterminations \pm écart type

Tableau 1. Mesure des concentrations des catécholamines extracellulaires dans les couches superficielle et profonde du bulbe olfactif du rat

	Dopamine ($\times 10^{-7}$ mole/l)	Noradrénaline ($\times 10^{-7}$ mole/l)
Couche superficielle (terminaisons du nerf olfactif + glomérules)	$2,40 \pm 0,30$ (n = 10)	$0,65 \pm 0,04$ (n = 7)
Couche profonde (couche mitrale + couche plexiforme)	$0,60 \pm 0,08$ (n = 6)	$0,80 \pm 0,06$ (n = 5)

Les concentrations en NA et en DA sont déduites à partir des courbes d'étalonnage. La hauteur des pics mesurée à partir de 15 à 20 voltamogrammes est calculée et moyennée.

indépendamment, les courants d'oxydation propres à l'AA et aux catéchols. Le traitement électrochimique, utilisé dans ces travaux, a amélioré très sensiblement les performances de la fibre de carbone: les courants d'oxydation dus respectivement à l'AA et aux catéchols sont résolus en deux pics distincts. De plus, la sensibilité de la micro-électrode aux catéchols est très largement augmentée.

Comme le montrent les résultats du présent travail, la DNPV associée à une microfibre de

carbone (8 μ m de diamètre) traitée électrochimiquement, reste l'une des techniques les plus performantes pour l'évaluation *in vivo* des substances neuroactives au niveau du système nerveux central.

Le traitement préconisé pour les catécholamines a permis, d'une part, d'amplifier le courant dû à l'oxydation de ces substances et, d'autre part, de rendre l'électrode presque insensible à l'AA. En outre, la très haute sensibilité de la sonde de mesure nous a permis de détecter *in vivo* des

concentrations très faibles de catécholamines de l'ordre de la nanomole (ce travail) et de suivre leurs variations en fonction des conditions physiologiques et pharmacologiques (Mesfioui *et al.*, 1994).

L'ensemble de ces données montrent, donc, l'intérêt du traitement électrochimique des électrodes à fibre de carbone avant leur emploi. Ceci peut mettre en cause certaines interprétations de plusieurs anciens travaux dans lesquels le courant d'oxydation mesuré dans certaines régions du cerveau, à l'aide d'électrodes non traitées et par certaines techniques non sélectives (ampérométrie) était attribué aux catécholamines et notamment à la dopamine. Certaines constatations, comme l'augmentation du courant d'oxydation après administration d'amphétamine chez l'animal, pourraient, alors, s'expliquer par la modification d'autres substances dont l'acide ascorbique.

CONCLUSION

Dans cette investigation, la voltamétrie différentielle sur impulsions normales (DNPV) associée à une fibre de carbone traitée électrochimiquement a été conçue en fonction des besoins de l'électrophysiologie. Le dispositif électronique (sonde pour amplification du courant et un ensemble de mesure, traitement et calcul du courant propre à l'oxydation) destiné à l'étude voltamétrique a été appliqué sur l'animal anesthésié dans le but d'étudier et d'évaluer les variations des catécholamines extracellulaires au niveau du bulbe olfactif du rat.

La très haute sensibilité de la sonde de mesure permet de détecter *in vivo* des concentrations très faibles de catécholamines de l'ordre de la nanomole.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Brett C.M.A., Brett A.M.O. & Mitoserlu L.C. (1994) Amperometric and voltammetric detection in batch injection analysis. *Anal. Chem.* 66: 3145-3150
- Buda M., Gonon F., Cespuglio R., Jouvét M. & Pujol J.F. (1980) Mesure voltamétrique *in vivo* de l'acide ascorbique et du DOPAC dans le striatum du rat et du cobaye. *C.R. Acad. Sc. Paris*
- Garris P.A., Ciolkowski E.L., Pastore P. & Wightman R.M. (1994) Efflux of dopamine from the synaptic cleft in the nucleus accumbens of the rat brain. *J. Neurosci.* 14 (10): 6084-6093
- Gonon F., Fombarlet C.M., Buda M. & Pujol J.F. (1981) Electrochemical treatment of pyrolytic carbone fiber electrodes. *Anal. Chem.* 53: 1386-1389
- Gonon F., Cespuglio R., Buda M. & Pujol J.F. (1983) *In vivo* electrochemical detection of monoamine derivatives. *Meth. Biogen. Amines Res.* 7: 165-187
- Gonon F., Navare F. & Buda M. J. (1984) *In vivo* monitoring of dopamine release in the rat brain with differential normal pulse voltammetry. *Anal. Chem.* 56: 573-575
- Halasz N. & Shepherd G.M. (1983) Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. *Neuroscience* 10: 579-619
- Jaffé E.H. & Cuello A.C. (1980) The distribution of catecholamines, glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase in layers of the rat olfactory bulb. *Brain Res.* 186: 232-237
- Kissinger P.T., Hart J.B. & Adams R.N. (1973) Voltammetry in the brain tissue a new neurophysiological measurement. *Brain Res.* 55: 209-213
- Mc Lean J.H. & Shipley M.T. (1987) Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: I. Origins and laminar specificity of serotonergic inputs in the adult rat. *J. Neurosci.* 7: 3016-3028
- Mesfioui A. (1988) Contribution à l'étude des mécanismes mis en jeu dans les flux transmembranaires de neurotransmetteurs. Action de l'amphétamine, de la phényléthylamine et de la tranlycypromine sur la libération des catécholamines et l'activité des composantes du système de l'adénosine triphosphatase. Thèse de l'Université de Nancy I
- Mesfioui A., Math F., El Hessni A., Choulli M.K. & Davrainville J.L. (1994) Catecholamines in the rat olfactory bulb: evidence for dopamine higher concentration in the superficial layers. *In Monitoring Molecules in Neurosciences: Proceedings of 6th International Conference on in vivo Methods.* pp 142-143 Ed. by A. Louilot, T. Durkin, U. Spampinato & M. Cadour
- Miele M., Boutelle M.G. & Fillenz M. (1994) The physiologically induced release of ascorbate in the rat brain is dependent on impulse traffic, calcium influx and glutamate uptake. *Neuroscience* 62(1): 87-91
- Ory-Lavolée L. (1984) Voltamétrie impulsionnelle différentielle: Détection des 5-hydroxyindoles dans la moelle lombaire et le cortex somesthésique primaire du rat. Thèse de 3ème cycle, Paris

Portela M.J., Barrio R.J. & Goicolea M.A. (1994) Voltammetric method for the determination of the flavour enhancer inosinic acid. *Analyst* 119 : 2183-2186

Stamford J.A. (1985) *In vivo* Voltammetry: Promise and Perspective. *Brain Res.* 10 : 119-135

Wieczorek W.J. & Kruk Z.L. (1994) A quantitative comparison on the effects of benztropine, cocaine and nomifensine on electrically evoked dopamine overflow and rate of re-uptake in the caudate putamen and nucleus acumbens in the rat brain slice. *Brain Res.* 657 : 42-50