

FIXATION DE LA *dl* EPHEDRINE ^{14}C PAR LE COEUR ISOLE PERFUSE DE RAT

CHRISTIAN JACQUOT, JEAN BRALET, YVES COHEN et GUILLAUME VALETTE

Laboratoire de Pharmacodynamie, Faculté de Pharmacie, Paris
C.N.R.S. et I.N.S.E.R.M.

(Received 23 October 1968; accepted 3 December 1968)

Abstract—The uptake of *dl* ephedrine ^{14}C (concentration 0.1–10 mcg/ml) by the isolated rat heart was investigated. The ephedrine accumulation in the heart was directly dose-dependent and about 2.8 times higher than the concentration in the perfusion fluid. The maximal tissue:medium ratio was reached after 10 min and remained at this value. The ephedrine release by heart seemed slower than its accumulation. Neither noradrenaline, cocaine, guanethidine, present in the perfusion medium containing ephedrine ^{14}C , nor reserpine pretreatment impaired the ephedrine accumulation by hearts. These results indicated that the mechanism of ephedrine uptake by isolated heart was greatly different from that of catecholamines.

LA NORADRÉNALINE est fixée dans les terminaisons nerveuses sympathiques par un processus de transport actif; sa fixation est inhibée compétitivement par un grand nombre de substances comme la cocaïne, la guanéthidine, la tyramine, l'amphétamine et l'éphédrine.¹

Les amines sympathomimétiques comme l' α méthylnoradrénaline, le métaraminol, l'octopamine dont la structure est voisine de celle de la noradrénaline et qui possèdent toutes au moins un groupement hydroxyle phénolique et un groupement hydroxyle alcoolique en β se fixent d'une manière identique à celle des amines biogènes.²⁻⁴

D'autres, comme l'amphétamine, qui ne possèdent pas de groupement hydroxyle, se fixent différemment par un processus de transport passif.^{5, 6}

L'éphédrine, dépourvue d'hydroxyle phénolique, possède néanmoins un hydroxyle alcoolique et se place, par conséquent, du point de vue structural, entre la noradrénaline et l'amphétamine. Dans le but de mettre en évidence le rôle de l'hydroxyle alcoolique dans la fixation tissulaire de cette amine, nous avons envisagé l'étude de la fixation par le coeur isolé de l'éphédrine seule et en présence de diverses substances susceptibles d'inhiber sa captation.

METHODES

1. *Perfusion des coeurs*

Nous avons utilisé des rats mâles Charles River, de 200 à 240 g anesthésiés à l'éther et héparinés (2000 U par voie intraveineuse). Le coeur isolé est perfusé suivant la technique de Langendorff, par le liquide de Krebs Henseleit modifié, de composition suivante: NaCl 5.54 g; KCl 0.354 g; KH_2PO_4 0.163 g; $\text{Mg SO}_4/7\text{H}_2\text{O}$ 0.294 g; CaCl_2 anhydre 0.282 g; NaHCO_3 2.1 g; pyruvate de sodium 0.542 g; glucose 2.08 g; acide ascorbique 0.01 g; acide éthylènediaminetétracétique (sel disodique) 0.01 g;

eau distillée qsp 1000 ml. La température de la perfusion est de $38^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, la pression de 67 cm d'eau et le débit de 6 à 8 ml/min.

L'appareil de perfusion comprend deux flacons, contenant le liquide physiologique additionné dans l'un des flacons d'éphédrine ^{14}C , reliés par un robinet à trois positions.

2. Fixation de l'éphédrine ^{14}C

L'éphédrine utilisée est de la *dl* éphédrine β ^{14}C (C. E. N. Saclay) d'activité spécifique 16 mCi/mM, radiochimiquement pure et exempte de pseudoéphédrine. Les concentrations employées sont égales à 0.1, 1, et 10 mcg/ml. Toutes les solutions renferment la même concentration d'éphédrine radioactive (10 nanocuries/ml soit 0.1 mcg/ml). Pour les concentrations supérieures, le produit radioactif a été dilué avec de la *dl* éphédrine non radioactive (Merck). La durée de perfusion est limitée à 20 min.

3. Elimination de l'éphédrine ^{14}C

Les coeurs préalablement perfusés pendant 20 min par la solution contenant de l'éphédrine ^{14}C à la concentration de 1 mcg/ml sont "lavés" avec la solution dépourvue d'éphédrine pendant un temps équivalent: le liquide de perfusion est fractionné au cours du temps et sa radioactivité déterminée, de même que la radioactivité restant dans le coeur à la fin de l'expérience.

4. Influence de différentes substances sur la fixation de l'éphédrine ^{14}C par le coeur

Dans d'autres séries d'expériences, la fixation de l'éphédrine ^{14}C a été étudiée en présence, soit de 1 noradrénaline à la concentration de 0.1 mcg/ml, soit de chlorhydrate de cocaïne à la concentration de 10 mcg/ml, soit de guanéthidine base (10 mcg/ml). Ces substances ont été préalablement dissoutes dans le flacon perfuseur contenant l'éphédrine radioactive à la concentration de 0.1 mcg/ml (10 nCi/ml).

Lors des expériences réalisées avec des coeurs de rats réserpinés, la réserpine (Serpasil Ciba) a été injectée aux animaux par voie intrapéritonéale à la dose de 5 mg/kg, 48 h avant le prélèvement de l'organe.

5. Mesure de la radioactivité

A la fin du temps de perfusion, les coeurs sont divisés, essuyés rapidement sur du papier filtre, pesés et homogénéisés à l'Ultra-Turrax, dans 5 ml d'acide perchlorique 0.4 N.

Après centrifugation, 1 ml du liquide surnageant est ajouté dans une fiole pour scintillation liquide à 4 ml de méthanol et 12 ml de liquide scintillant de composition suivante: P.O.P.O.P. 100 mg, P.P.O. 7 g, naphtalène 80 g, dioxane 400 ml, toluène 400 ml, méthanol 125 ml.

La radioactivité est mesurée au moyen d'un compteur à scintillation liquide (Tracerlab LSC 10 B). L'autoextinction des échantillons est évaluée par addition d'un étalon interne.

Dans le cas où la radioactivité a été mesurée dans le liquide de perfusion, 1 ml de ce liquide a été compté dans les mêmes conditions que pour les extraits perchloriques.

D'autre part, les extraits perchloriques ont été analysés en vue de séparer l'éphédrine ^{14}C de ses métabolites éventuels. La méthode utilisée (extraction par le benzène en milieu alcalin) a été décrite précédemment en détail par Bralet et Coll.⁷

Les résultats sont exprimés en mcg d'éphédrine par gramme de coeur. Il n'a pas été effectué de correction pour l'espace extracellulaire. Les moyennes sont affectées des erreurs moyennes, Sm.

RESULTATS

1. Métabolisme de l'éphédrine par le coeur isolé

Comme nous n'avons pas décelé de métabolites de l'éphédrine ^{14}C , dans nos conditions expérimentales, la radioactivité retrouvée dans les homogénats de coeur a été attribuée à l'éphédrine ^{14}C .

2. Fixation de l'éphédrine ^{14}C

La fixation de l'éphédrine ^{14}C par le coeur isolé a été étudiée en fonction du temps et de la concentration en amine dans le liquide de perfusion. Les résultats sont rassemblés dans la Fig. 1. Pour une concentration d'éphédrine de 0.1 mcg/ml, de 1 mcg/ml et de 10 mcg/ml, les taux d'éphédrine fixés dans le coeur (en mcg/g de coeur) sont rassemblés dans le Tableau 1.

TABEAU 1.

Ephédrine mcg/ml dans le liquide de perfusion	Ephédrine dans le coeur			
	1 min	5 min	10 min	20 min
0.1	0.195 \pm 0.006	0.257 \pm 0.014	0.278 \pm 0.007	0.269 \pm 0.027
1	1.33 \pm 0.09	1.92 \pm 0.20	3.00 \pm 0.28	2.85 \pm 0.19
10	17.98 \pm 0.18	24.76 \pm 0.15	26.67 \pm 0.80	29.17 \pm 0.14

Dans tous les cas, la fixation de l'éphédrine par le coeur est maximale, au bout de 10 min et la prolongation du temps de perfusion n'influe pas sur l'accumulation de l'amine dans le coeur.

A chaque instant, le rapport de la concentration dans le muscle cardiaque à la concentration dans le milieu de perfusion exprime la capacité de fixation du muscle. Ce rapport est, dans les limites de l'expérience, indépendant du taux d'éphédrine introduite dans la perfusion puisque, comme le montre la Fig. 2, il n'est pas possible de distinguer de différence dans les rapports correspondant aux concentrations extrêmes. Ces rapports sont de 1.9 au temps de 1 min, 2.5 au temps de 5 min, 2.8 au temps de 10 et 20 min.

Ceci est confirmé par la Fig. 3 qui porte en coordonnées logarithmiques la concentration du coeur en éphédrine, en fonction de la concentration de la même substance dans le milieu de perfusion. Les points correspondant aux trois concentrations étudiées s'alignent en une droite que l'on retrouve pour tous les temps étudiés entre 1 et 20 min. Ces faits apportent un argument en faveur d'une proportionnalité directe entre les concentrations dans le liquide physiologique et dans l'organe étudié.

3. Elimination de l'éphédrine ^{14}C fixée par le coeur isolé

Après avoir été chargés pendant 20 min avec l'amine radioactive (liquide de perfusion à 1 mcg/ml en éphédrine ^{14}C) les coeurs sont perfusés de nouveau pendant le même temps par le liquide physiologique privé d'éphédrine.

L'élimination de l'éphédrine hors du coeur a été étudiée en fonction du temps, et la Fig. 4 illustre le phénomène de désaturation d'aspect exponentiel, dans lequel on distingue une première phase rapide de désaturation de période $T_1 \frac{1}{2}$ égale à 0.6 min et une deuxième phase plus lente de période $T_2 \frac{1}{2}$ égale à 5.5 min. Cette courbe admet l'équation $y = 2.7e^{-1.15t} + 0.54e^{-0.12t}$ pour laquelle le temps t est exprimé en minutes, et y est la concentration d'éphédrine ^{14}C dans le coeur en microgrammes par gramme; e , est la base des logarithmes népériens.

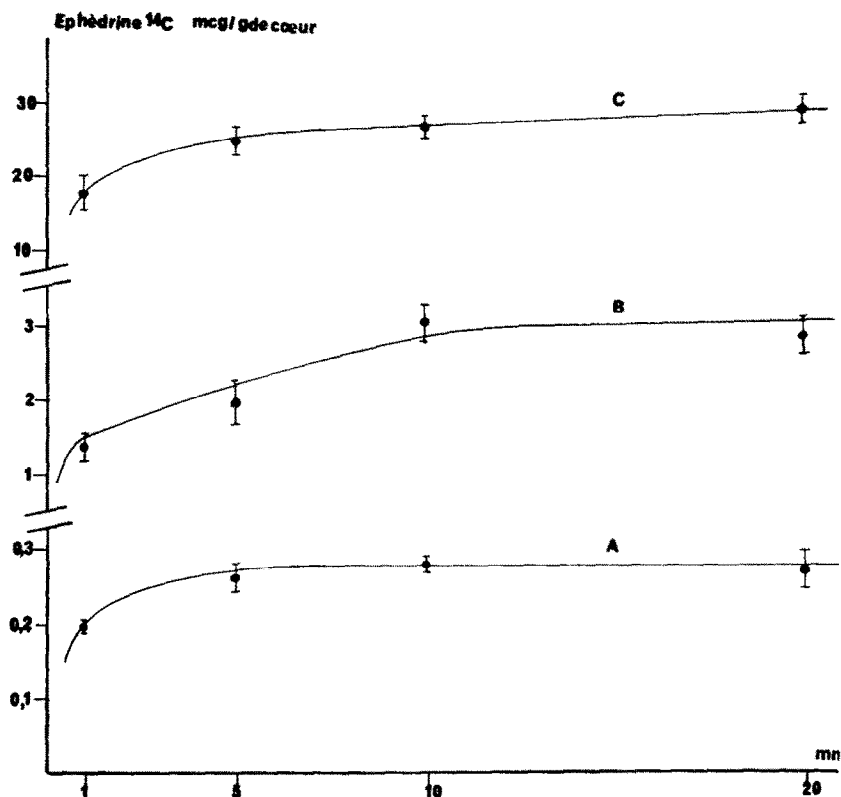


FIG. 1. Fixation de l'éphédrine ^{14}C par le coeur isolé perfusé.

Les coeurs ont été perfusés pendant 20 min, avec du liquide de Krebs, contenant la *dl* éphédrine ^{14}C à la concentration de 0.1 mcg/ml (A), de 1 mcg/ml (B), de 10 mcg/ml (C); l'éphédrine ^{14}C est pure ou diluée par de la *dl* éphédrine non radioactive (solutions B et C).

La première phase correspond à l'équilibre du liquide de perfusion avec le liquide extracellulaire du coeur chargé et la seconde phase représente le phénomène de désaturation cellulaire de l'éphédrine. Le phénomène de désaturation cellulaire est plus lent que le phénomène de saturation comme le montre la comparaison des Figs. 1 et 4. En effet, après l'élimination en 1 min de 61 pour cent de l'éphédrine fixée, la quantité retrouvée dans le liquide de perfusion au bout de 5 min totalise 94 pour cent, et au temps de 20 min, il ne reste plus dans le coeur que 1.4 pour cent de la quantité initialement fixée.

4. *Influence de la noradrénaline, de la cocaïne, de la guanéthidine, et du traitement à la réserpine sur la fixation de l'éphédrine ^{14}C par le coeur isolé*

L'addition de noradrénaline à la concentration de 0.1 mcg/ml au liquide de perfusion contenant l'éphédrine ^{14}C à la concentration de 0.1 mcg/ml ne modifie pas la cinétique de fixation de l'amine radioactive par le coeur (Fig. 5, courbe A). Les valeurs obtenues dans cette série d'expériences sont rapprochées de celles qui sont illustrées par la Fig. 1; celle-ci sert de terme de comparaison aux résultats trouvés. On n'observe pas de différence significative entre les deux courbes.

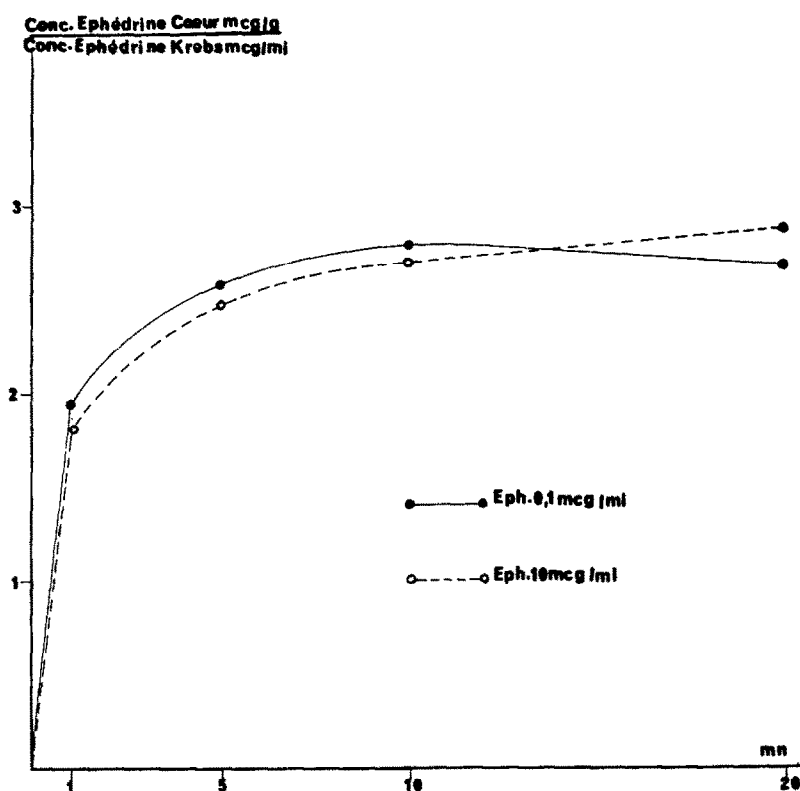


FIG. 2. Rapport de concentration de l'éphédrine ^{14}C fixée dans le coeur à la concentration de l'amine dans le milieu de perfusion en fonction du temps.

—Trait plein: pour une perfusion d'éphédrine ^{14}C de 0.1 mcg/ml.

—Trait pointillé: pour une perfusion d'éphédrine ^{14}C de 10 mcg/ml.

La présence de cocaïne à la concentration de 10 mcg/ml dans le liquide de perfusion contenant de l'éphédrine (0.1 mcg/ml) n'influe pas sur l'accumulation de l'éphédrine ^{14}C par le coeur (Fig. 5, courbe B). Cependant, on observe un point d'inflexion à dix minutes: à ce temps, la concentration d'éphédrine ^{14}C dans le coeur est de 0.248 ± 0.032 mcg/g, mais cette valeur n'est pas statistiquement différente de celle qui est observée en l'absence de cocaïne (0.278 ± 0.006 mcg/g).

Lorsque la fixation de l'éphédrine ^{14}C (0.1 mcg/ml) est étudiée en présence de guanéthidine à la concentration de 10 mcg/ml , la captation de l'amine radioactive par le coeur apparaît plus rapide que celle qui est observée en l'absence de guanéthidine (Fig. 5, courbe C). Néanmoins, les valeurs observées ne sont pas statistiquement significatives. Cette différence pourrait être due au fait que la présence de guanéthidine dans le milieu de perfusion augmente le débit des coronaires. Le débit moyen, observé au cours de la première minute, qui est de 7.3 ml en l'absence de guanéthidine, passe à 10.8 ml lorsque le milieu de perfusion renferme de la guanéthidine.

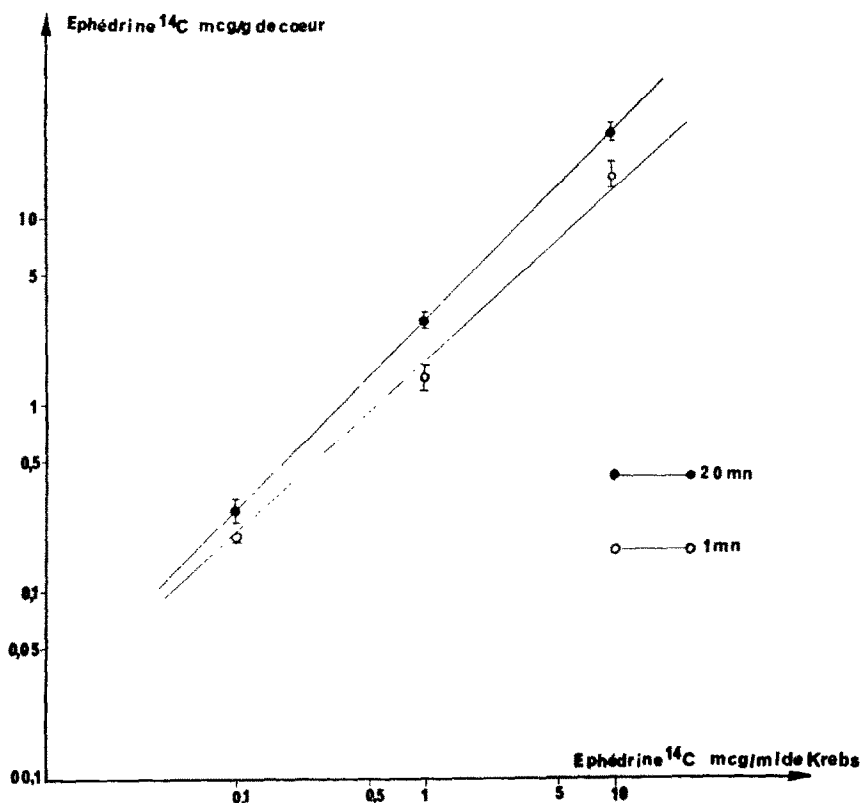


FIG. 3. Relation de proportionnalité entre la concentration d'éphédrine ^{14}C dans le liquide de perfusion et sa fixation dans le coeur en mcg/ml.

— Trait plein, après 1 min de perfusion.

- - - Trait pointillé, après 20 min de perfusion.

Le traitement des rats par la réserpine (5 mg/kg i.p. , 48 hr avant le prélèvement des coeurs) ne modifie pas la fixation de l'éphédrine ^{14}C par le coeur (Fig. 5—courbe D).

DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent que la quantité d'éphédrine, fixée par le coeur isolé, est directement proportionnelle à la concentration de l'amine dans le milieu de

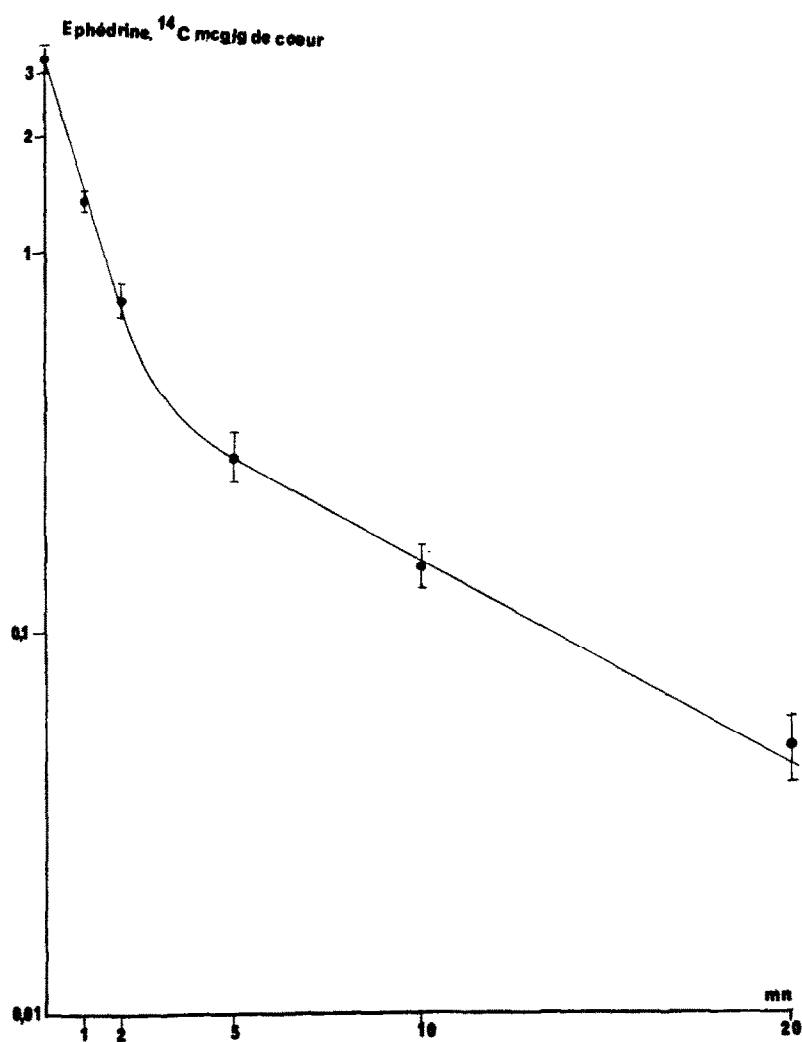


FIG. 4. Elimination de l'éphédrine ^{14}C fixée par le coeur isolé perfusé.

Les coeurs ont été perfusés pendant 20 min avec le liquide physiologique contenant la *dl* éphédrine ^{14}C à la concentration de 1 mcg/ml, puis perfusés pendant le même temps avec la solution de Krebs, sans éphédrine. Chaque point représente la moyenne de cinq expériences.

perfusion. L'éphédrine s'accumule selon un processus rapidement saturable. Le rapport des concentrations en éphédrine dans le coeur aux concentrations d'éphédrine dans le milieu de perfusion atteint la valeur de 2.8 après 10 min de perfusion. L'éphédrine fixée n'est pas retenue d'une manière durable, elle est néanmoins éliminée plus lentement qu'elle n'est fixée.

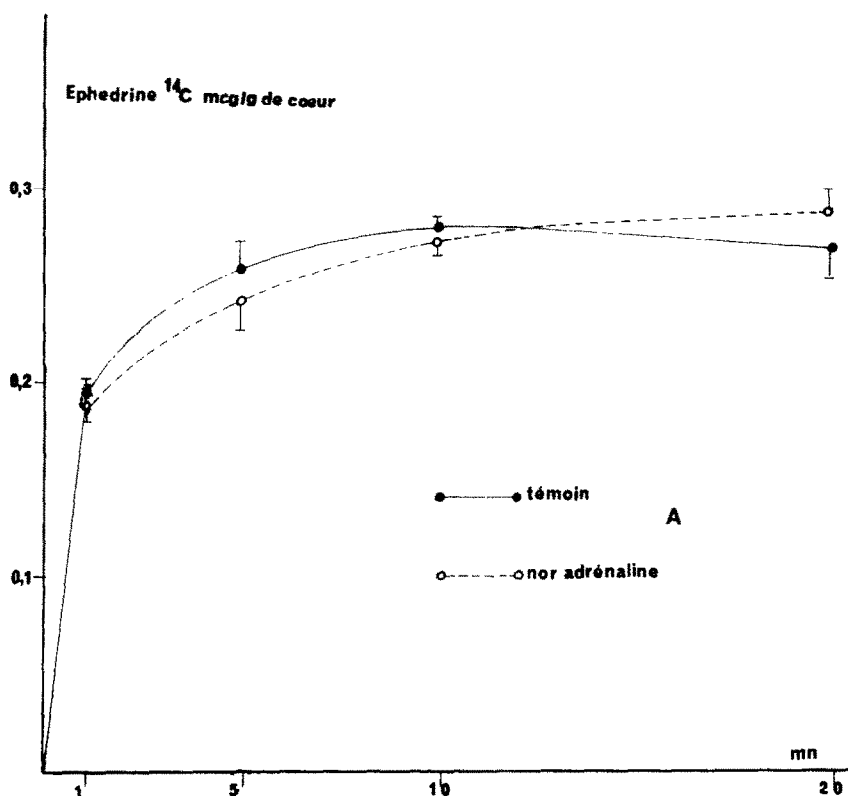


FIG. 5 A

FIG. 5. Influence de la noradrénaline 0.1 mcg/ml, cocaïne 10 mcg/ml, guanéthidine 10 mcg/ml, dans le liquide de perfusion des coeurs de rats et du prétraitement des rats à la réserpine 5 mg/kg, IP, 48 hr avant, sur la fixation de l'éphédrine ^{14}C (0.1 mcg/ml) par le coeur isolé perfusé.

Chaque point représente la moyenne calculée sur les résultats obtenus à partir de cinq coeurs. en trait plein: fixation par le coeur (en mcg/g) de l'éphédrine ^{14}C (voir Fig. 1)

— Courbe A: fixation par le coeur de l'éphédrine ^{14}C en présence de noradrénaline.

Ces particularités de la fixation de l'éphédrine sont très différentes de celles qui ont été décrites pour la noradrénaline,^{8, 9} l' α méthyl-noradrénaline,² l'octopamine,⁴ le métaraminol.¹⁰ Ces dernières substances, qui possèdent à la fois un (ou deux) hydroxyle phénolique et un hydroxyle alcoolique en β , paraissent être incorporées à l'intérieur des terminaisons nerveuses sympathiques par un système de transport actif localisé dans la membrane neuronale.⁴

En revanche, l'amphétamine, qui est dépourvue de groupement hydroxyle, s'accumule selon Thoenen et coll⁶ d'une manière passive dépendant, en partie, de la lipophilie de la molécule. L'éphédrine, bien que possédant une fonction alcoolique secondaire, semble suivre un processus comparable à celui de l'amphétamine, mais avec une intensité moindre, puisque le rapport des concentrations dans le coeur et dans le liquide de perfusion est de 2.8 pour l'éphédrine et de 5.5 environ pour l'amphétamine.

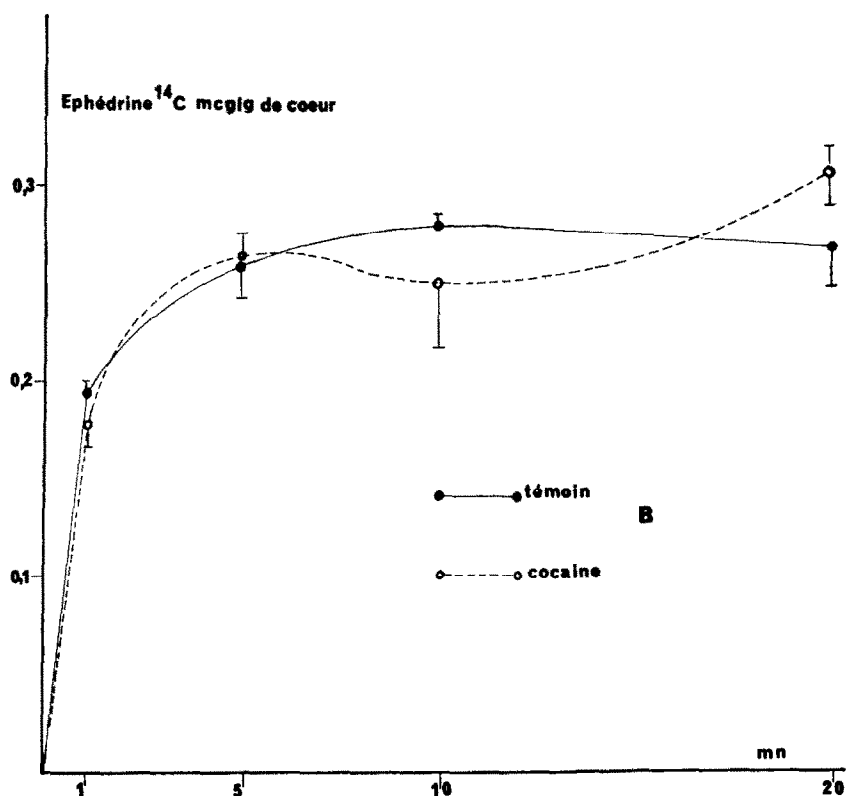


FIG. 5 B

—Courbe B: fixation par le coeur de l'éphédrine ^{14}C en présence de cocaïne.

Cette accumulation passive pourrait expliquer le fait que ni la noradrénaline, ni la cocaïne, ni la guanéthidine n'inhibent la fixation de l'éphédrine dans nos conditions expérimentales, alors que l'éphédrine est un puissant inhibiteur de la fixation de la noradrénaline par le coeur, aussi bien *in vitro*¹ qu'*in vivo*.¹¹ Il y a donc inhibition unilatérale de l'alkaloïde sur le transport de la catécholamine.

La cocaïne inhibe la fixation de la noradrénaline,⁸ du métaraminol,³ de la tyramine,¹² de l'octopamine,⁴ de la dopamine,¹² de l' α méthyltyramine,¹³ mais n'affecte pas celle de l'amphétamine par le coeur isolé perfusé⁶ ou par des coupes de coeur,⁵ ni celle enfin de la noréphédrine.⁴ Nos expériences apportent une confirmation des faits précédents, puisque nous n'observons pas pour l'éphédrine d'inhibition de son

accumulation par la cocaïne. La théorie qui cherche à relier à la structure chimique des amines présentant des groupements phénoliques et alcoolique,⁴ l'effet inhibiteur de la cocaïne sur la fixation de ces composés, doit comporter l'exception que présente le cas de l'isoprénaline dont la fixation n'est pas empêchée par la cocaïne.^{14, 15}

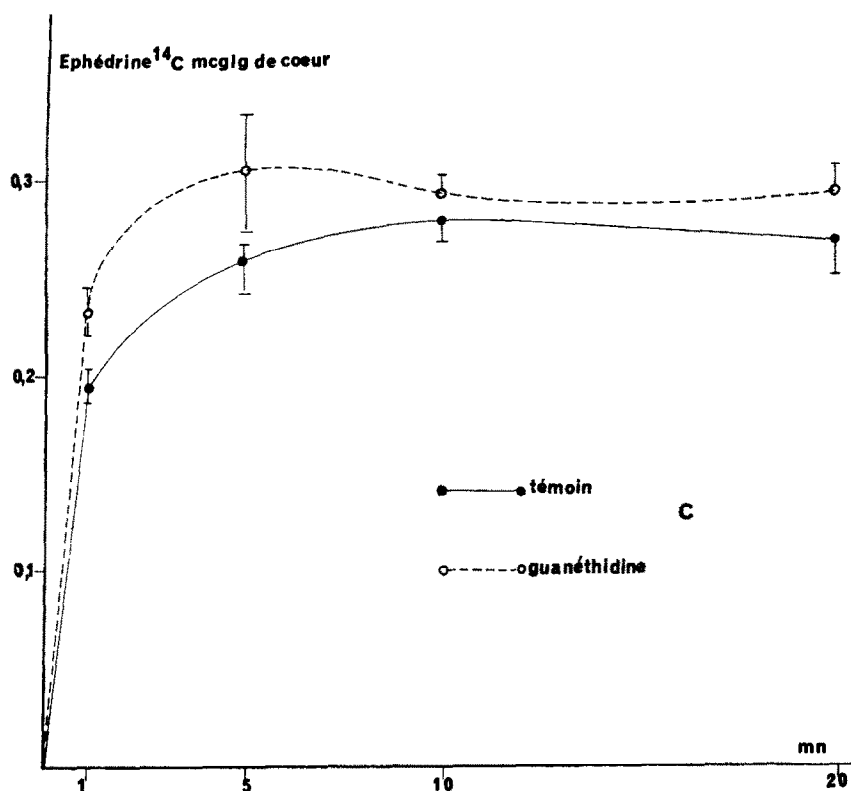


FIG. 5 C

—Courbe C: fixation par le cœur de l'éphédrine ^{14}C en présence de guanéthidine.

Il pourrait sembler que la guanéthidine, considérée comme "faux médiateur," entrant en compétition avec la noradrénaline dans les terminaisons nerveuses et dont les effets pharmacologiques sont antagonisés par l'éphédrine et réciproquement *in vivo*,¹⁶ puisse s'opposer à l'accumulation de l'éphédrine par le cœur *in vitro*; or, nos expériences vont à l'encontre de cette hypothèse, puisque nous n'avons pas observé de diminution de fixation de l'éphédrine en présence de guanéthidine, alors que Brodie et Coll¹⁶ avaient constaté une forte diminution de la captation de la guanéthidine ^3H par l'éphédrine sur le cœur de rat *in vivo*. Cette dualité d'action laisse penser que les sites de fixation de la guanéthidine et de l'éphédrine sont différents et que la compétition entre éphédrine et guanéthidine se situe avant le mécanisme de transport actif de cette dernière.

La déplétion en catécholamines endogènes du cœur par administration de réserpine à l'animal a pour effet de vider les granules des terminaisons nerveuses sympathiques¹⁷

sans que les catécholamines exogènes puissent recharger le compartiment granulaire. De ce fait, on pourrait supposer que le coeur retiré d'un animal réserpiné montrerait une affinité accrue à l'égard de l'éphédrine, puisque celle-ci n'est pas considérée classiquement comme un substrat de la monoamine oxydase. Cependant, nos expériences ont infirmé cette supposition, puisque la fixation et l'accumulation de l'éphédrine ne sont pas affectées par le traitement réserpinique.

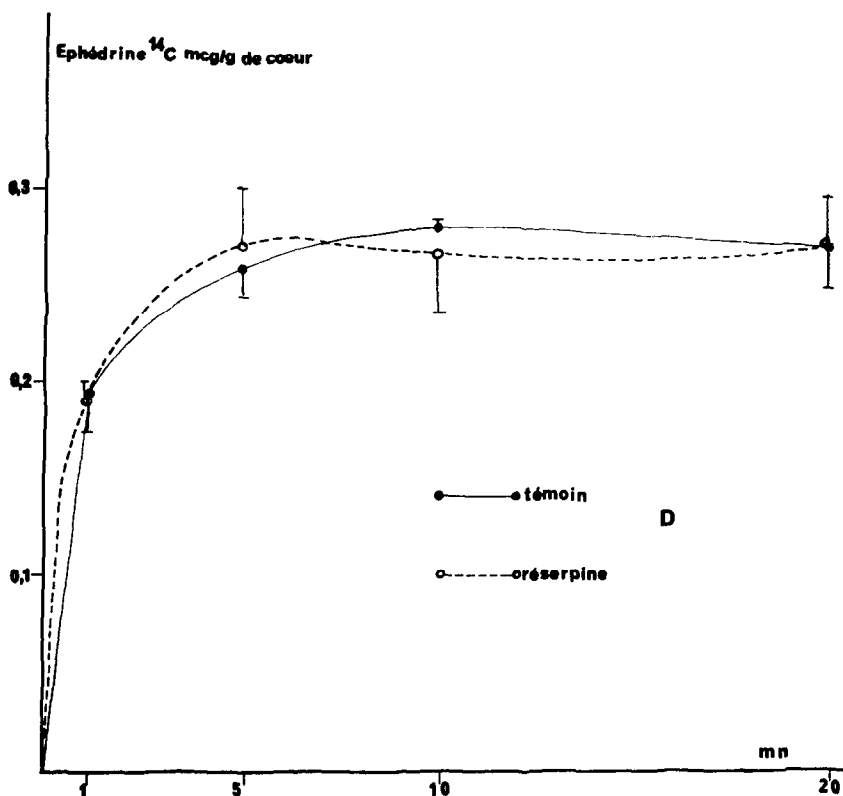


FIG. 5 D.

—Courbe D: fixation par le coeur de l'éphédrine ^{14}C par des coeurs de rats réserpinés.

Ce faisceau de preuves laisse penser que les sites de fixation de l'éphédrine sur le coeur isolé de rat sont, en majorité, différents de ceux des catécholamines endogènes et que cette fixation de l'éphédrine sur l'organe ne se fait pas par un mécanisme de transport actif.

RESUME

La fixation de la *dl* éphédrine par le coeur isolé perfusé de rat et l'influence de la *l* noradrénaline, de la cocaïne, de la guanéthidine et de la réserpine sur cette accumulation ont été envisagées.

L'éphédrine s'accumule proportionnellement à la concentration du milieu de perfusion, le rapport de concentration de l'éphédrine fixée dans le coeur à la concentration de l'amine dans le milieu de perfusion est de 2.8 après 10 min, et n'est pas affecté par l'augmentation du temps de perfusion.

L'élimination de l'éphédrine fixée par le coeur est moins rapide que son accumulation.

La noradrénaline, la cocaïne, la guanéthidine, additionnées au milieu de perfusion ou le prétraitement à la réserpine ne modifient pas la fixation de l'éphédrine par le coeur.

Il semble que le processus de fixation de l'éphédrine par le coeur soit entièrement passif.

BIBLIOGRAPHIE

1. A. S. V. BURGEN et L. L. IVERSEN, *Br. J. Pharmac. Chemother.* **25**, 34 (1965).
2. A. CARLSSON, P. LUNDBORG, R. STITZEL et B. WALDECK, *J. Pharmac. exp. Ther.* **158**, 175 (1967).
3. S. B. ROSS et A. L. RENYI, *Life Sci.* **5**, 639 (1966).
4. S. B. ROSS, A. L. RENYI et B. BRUNEFELTER, *J. Pharm. Pharmac.* **20**, 283 (1968).
5. S. B. ROSS et A. L. RENYI, *J. Pharm. Pharmac.* **18**, 756 (1966).
6. H. THOENEN, A. HURLIMANN et W. HAEFELY, *J. Pharm. Pharmac.* **20**, 1 (1967).
7. J. BRALET, Y. COHEN et G. VALETTE, *Biochem. Pharmac.* **17**, 2319 (1968).
8. L. L. IVERSEN, *Br. J. Pharmac. Chemother.* **21**, 523 (1963).
9. L. L. IVERSEN, *Br. J. Pharmac. Chemother.* **25**, 18 (1965).
10. P. A. SHORE, D. BUSFIELD et H. S. ALPERS, *J. Pharmac. exp. Ther.* **146**, 194 (1964).
11. J. BRALET, Y. COHEN et G. VALETTE, *Biochem. Pharmac.* **15**, 793 (1964).
12. S. B. ROSS et A. L. RENYI, *Acta Pharm. Toxic.* **24**, 297 (1966).
13. L. L. IVERSEN, *J. Pharm. Pharmac.* **18**, 481 (1966).
14. B. A. CALLINGHAM et A. S. V. BURGEN, *Mol. Pharmac.* **2**, 37 (1966).
15. L. L. IVERSEN, *Uptake and storage of noradrenaline by sympathetic nerves*. Cambridge University Press, Cambridge (1967).
16. B. B. BRODIE, C. C. CHANG et E. COSTA, *Br. J. Pharmac. Chemother.* **25**, 171 (1965).
17. G. SEDWALL, *Acta physiol. scand.* **62**, 101 (1964).