

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 14, 1976, pp. 543-547

Excretion Urinaire de 3,4-Dihydroxyphenyl-alanine, de 3-O-Méthyl-dopa, de Dopamine et d'Acide Homovanillique chez l'Homme. Effet d'un Inhibiteur de la Decarboxylase des Acides Amines Aromatiques (Benserazide)

Par F. Geissbühler et J. Widmer

Laboratoire de chimie de la clinique psychiatrique de Bel-Air (Directeur de la clinique: Prof. J. de Ajuriaguerra)
CH-1225 Chêne-Bourg

(Received April 14/September 23, 1976)

Résumé: Après une dose de 125 mg de benserazide, on constate la présence de 3,4-dihydroxyphényl-alanine et de 3-O-méthyl-dopa dans l'urine. L'excrétion d'acide homovanillique reste inchangée alors que celle de dopamine augmente. Ces perturbations durent au moins 48 heures.

Urinary excretion of 3,4-dihydroxyphenyl-alanine, 3-O-methyl-dopa, dopamine and homovanillic acid in man. Effects of an inhibitor of decarboxylase of aromatic amino acids (Benserazide)

Summary: After administration of a single small (125 mg) dose of benserazide, 3,4-dihydroxyphenyl-alanine and 3-O-methyl-dopa are excreted in urine. Urinary homovanillic acid remains unchanged, whereas dopamine raises. These disturbances last for at least 48 hours.

Ausscheidung von 3,4-Dihydroxyphenyl-alanin, 3-O-Methyl-dopa, Dopamine und Homovanillinsäure im Harn beim Menschen. Einfluß eines Decarboxylasehemmers (Benserazid)

Zusammenfassung: Nach Einnahme von 125 mg Benserazid wurden 3,4-Dihydroxyphenyl-alanin und 3-O-Methyl-dopa im Harn ausgeschieden. Die Ausscheidung von Homovanillinsäure war nicht verändert, während die von Dopamin erhöht war. Diese Änderungen dauerten mindestens 48 Stunden.

Introduction

On sait que la N¹-(DL-séryl)-N²-(2,3,4-trihydroxybenzyl)-hydrazine (benserazide, Ro-4-4602, IDC) est utilisée, en combinaison avec la L-dihydroxyphényl-alanine (L-DOPA), dans le traitement du syndrome de *Parkinson* (1, 2, 3). La valeur thérapeutique de cette substance est attribuée avant tout à sa propriété d'être un puissant inhibiteur de la décarboxylase extra-cérébrale (4).

La majorité des études biochimiques consacrées, *in vivo*, à la benserazide ont, en fait, porté sur son association avec la L-DOPA. Son action sur le métabolisme de la DOPA endogène chez l'homme est mal connue. Geissbühler et al. ont montré qu'une dose de 125 mg de benserazide, prise en une fois, faisait, après quelques heures, apparaître des taux mesurables de DOPA (5) et de 3-O-méthyl-dopa (6) dans le sang. D'autre part, une dose relativement élevée de benserazide (1200 mg répartis en deux doses égales administrées à 8 heures d'intervalle) semble stimuler l'excrétion urinaire, mesurée sur 24 heures,

de dopamine, de 3-méthoxy-tyramine et d'acide homovanillique (7).

Il nous a semblé intéressant d'approfondir quelques paramètres cinétiques de ce résultat paradoxal en mesurant, à plusieurs moments de la journée, l'excrétion urinaire de DOPA, de 3-O-méthyl-dopa, de dopamine et d'acide homovanillique après administration d'une dose unique de benserazide.

Méthode

Sept sujets normaux volontaires, (5 hommes et 2 femmes; âges extrêmes: 20 et 41 ans), menant une activité normale sans suivre de régime alimentaire particulier mais s'abstenant de toute médication depuis au moins 15 jours, ont participé à l'expérience suivante:

- le premier jour: récolte des urines en trois fractions, soit de 0800 à 1030, de 1030 à 1630 et de 1630 à 0800 le deuxième jour. Ces urines ont servi de référence.

- le deuxième jour: à 0800, administration p. o. de 125 mg de bensérazide et récolte des urines comme le premier jour.
- le troisième et dernier jour: même schéma que le premier jour.

Les raisons qui ont déterminé l'horaire de fractionnement des urines de 24 h sont les suivantes: la bensérazide est censée avoir son effet maximum environ 2 heures après son administration (1, 4), d'où le premier laps de temps de 2¹/₂ h. D'autre part, en pratique, chez les sujets normaux menant leur activité habituelle, il ne nous a pas été possible de raccourcir ce délai. En ce qui concerne les deux autres intervalles, ils ont semblé suffisants parce que des essais préliminaires (consistant en une succession de périodes de deux heures) ont montré qu'il ne se passait rien de saillant entre les moments proposés ici.

La dose de 125 mg a été choisie parce que c'est elle qui, en moyenne, permettrait d'obtenir les résultats les plus satisfaisants dans le traitement du syndrome de Parkinson (3).

Les urines ont été récoltées sur 5 ml HCl 5 mol/l, congelées sans délai et conservées à -20 °C au plus 3 semaines avant d'être analysées. Une fois décongelées, elles ont été centrifugées à 3500 g pendant 10 minutes et ultra-filtrées (filtres «Millipore» No PSACO 2510). Après chromatographie de l'ultra-filtrat sur «DOWEX» 50 W à pH 3,0, la DOPA a été dosée fluorométriquement après oxydation de l'éluat par K₃FeCN₆ à pH 6,5 en présence de Na₂B₄O₇ et réarrangement en milieu alcalin contenant de l'ascorbate de Na (8). Pour la 3-O-méthyl-dopa, l'ultra-filtrat 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 par NaIO₄ à pH 6,5 et réarrangement en milieu alcalin en présence d'ascorbate de Na et de 3-mercapto-propionate de Na (6). La dopamine a été dosée sur l'ultra-filtrat hydrolysé par HCl; l'hydrolysate a été chromatographié sur «AMBERLITE» CG-50; le fluorophore attribué à la dopamine a été formé par oxydation de l'éluat (HCOOH 1 mol/l) au moyen de K₃FeCN₆ à pH 6,5, réarrangement en milieu alcalin contenant du Na₂SO₃ et acidification par HCl (7). Après hydrolyse acide en présence d'EDTA de l'ultra-filtrat, l'acide homovanillique est extrait par un mélange de butanol-heptane 1:3 (volume/volume), repris dans du tampon TRIS (pH 8,5) et chromatographié sur résine DOWEX-1 à pH 4,5. L'éluat (NaCl 1,5 mol/l) est extrait par l'éther. Le dimère fluorescent est formé par oxydation de l'acide homovanillique dans du tampon TRIS (pH 8,5) au moyen de K₃FeCN₆ (10).

Ces méthodes présentent entre elles une interférence inférieure à 1% ainsi qu'à l'égard de la bensérazide et de diverses substances d'intérêt biologique (noradrénaline, adrénaline, 3-O-méthyladrénaline, 3-O-méthylnoradrénaline, 3-O-méthyl-dopamine, acide dihydroxyphénylacétique, tyrosine, phénylalanine).

Resultats

Afin de compenser les inégalités de durée des récoltes d'urine, les résultats ont été exprimés en mol/h. Pour la dopamine et l'acide homovanillique (fig. 3 et 4), en vue d'atténuer les différences interpersonnelles, ces valeurs ont été calculées en % de la fraction correspondante du jour témoin. Ce calcul n'a pas été possible pour la DOPA et la 3-O-méthyl-dopa (fig. 1 et 2), étant donné que les méthodes utilisées ici ne sont pas assez sensibles pour déceler la présence éventuelle de ces deux substances dans les urines du jour témoin. L'excrétion en 24 heures pour les trois jours d'expérience est reportée, pour les quatre substances dosées et leur somme, dans le tableau 1.

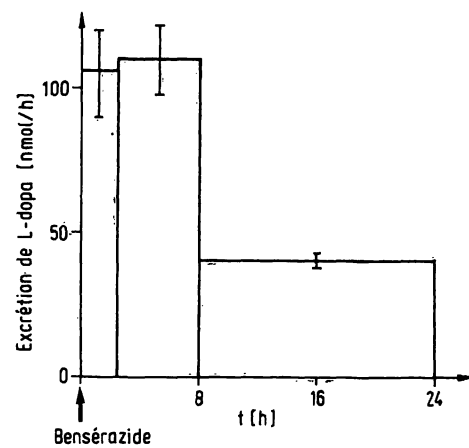


Fig. 1. Excrétion horaire moyenne de 3,4-dihydroxyphénylalanine (L-dopa) pendant trois périodes de la journée, chez 6 sujets volontaires.

Le jour témoin, il a été impossible de détecter de la 3,4-dihydroxyphénylalanine dans l'urine avec la méthode décrite dans le texte. Sur le graphique, les écarts-types sont représentés par un trait vertical dont l'unité est 1/5 de celle de l'ordonnée.

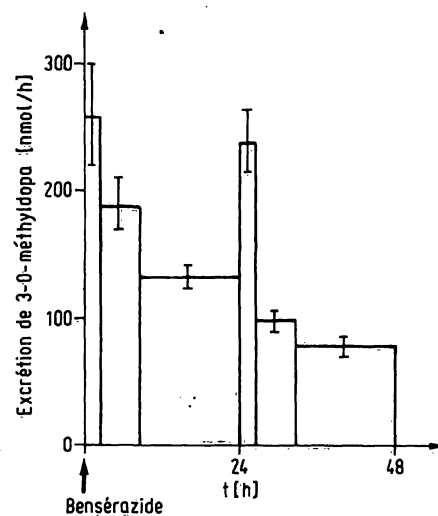


Fig. 2. Excrétion moyenne horaire de 3-O-méthyl-dopa pendant trois périodes de la journée chez 6 sujets volontaires.

Le jour témoin, il a été impossible de détecter de la 3-O-méthyl-dopa dans l'urine avec la méthode décrite dans le texte. Sur le graphique, les écarts-types sont représentés par un trait vertical dont l'unité est 1/10 de celle de l'ordonnée.

Les résultats n'ont pas été exprimés en concentrations parce que la diurèse, pendant les 2¹/₂ heures qui ont suivi l'administration de la bensérazide, a présenté une tendance à l'augmentation (le débit a passé de 65 ± 19 ml/h (N = 6) le jour témoin à 116 ± 49 ml/h (N = 6) après bensérazide; cette différence n'est statistiquement pas significative).

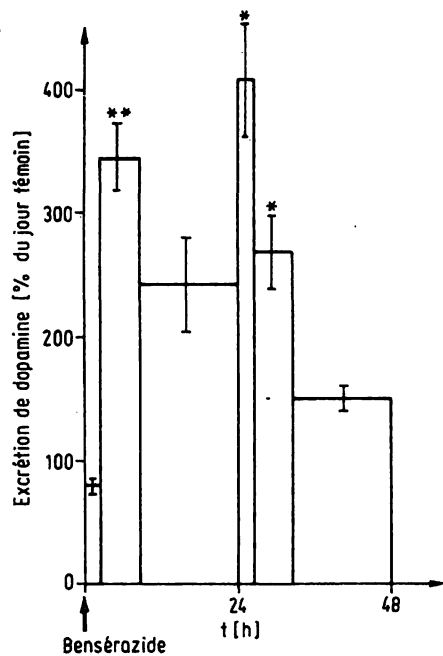


Fig. 3. Excrétion horaire moyenne de dopamine pendant trois périodes de la journée chez 6 sujets volontaires. Les résultats sont exprimés en % de la fraction correspondante du jour témoin, dont les valeurs ont été respectivement (en nmol/h): fraction I: 190 ± 110 ; fraction II: 150 ± 80 ; fraction III: 360 ± 370 . Sur le graphique, les écarts-types sont représentés par un trait vertical dont l'unité est 1/5 de celle de l'ordonnée. (*: $0,05 < P < 0,01$; **: $0,01 < P < 0,001$).

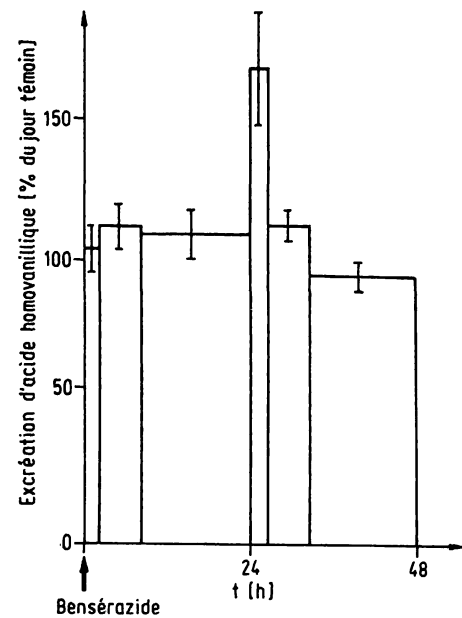


Fig. 4. Excrétion horaire d'acide homovanillique pendant trois périodes de la journée chez 6 sujets volontaires. Les résultats sont exprimés en % de la fraction correspondante du jour témoin, dont les valeurs ont été respectivement (en nmol/h): fraction I: 1.400 ± 870 ; fraction II: 1.000 ± 900 ; fraction III: 920 ± 380 . Sur le graphique, les écarts-types sont représentés par un trait vertical dont l'unité est 1/5 de celle de l'ordonnée.

	Jour témoin	1er jour après bensérazide	2ème jour après bensérazide
$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$			
DOPA	0	$2,2 \pm 4,0$	0
3-O-Méthyl-dopa	0	$2,0 \pm 1,3$	$1,2 \pm 1,1$
Dopamine	$6,9 \pm 6,3$	$11,6 \pm 5,6$	$9,1 \pm 4,5$
Acide homovanillique	$23,3 \pm 12,3$	$21,6 \pm 6,7$	$25,2 \pm 16,6$
Total en % du jour témoin	100	145 ± 57 (a)	124 ± 17 (b)

Tab. 1. Excrétions globales calculées sur 24 h.

Ces résultats ont été calculés (moyenne \pm écart-type) à partir des mesures faites sur les urines de 6 sujets. La seule différence statistiquement significative ($p < 0,01$) est celle qui existe entre l'excrétion totale du deuxième jour après bensérazide (b) et l'excrétion totale du jour témoin (a).

Discussion

La bensérazide est considérée comme l'un des inhibiteurs de la DOPA-décarboxylase les plus efficaces (4). C'est essentiellement cette caractéristique qui lui a valu d'être associé à la L-DOPA dans le traitement du syndrome de

Parkinson (1, 4). D'autres qualités lui ont été attribuées: cette substance, en particulier, inhiberait également les catéchol-O-méthyltransférases (11) et les monoamine-oxydases, sur lesquelles son action serait cependant modérée (4). Selon d'autres auteurs, la bensérazide agirait sur les catéchol-O-méthyltransférases (2, 12). Ces notions, qui ont été acquises sur des systèmes comprenant de la L-DOPA exogène, ne permettent pas d'interpréter entièrement les résultats présentés ici et qui ont été obtenus en l'absence de L-DOPA exogène.

Excrétion de DOPA

L'inhibition de la décarboxylase par la bensérazide semble permettre de rendre compte, de façon satisfaisante, de l'apparition de DOPA urinaire tôt après son administration et pour une durée relativement brève (voir fig. 1); il suffit d'admettre que la DOPA endogène — qui ne semble pas s'accumuler normalement dans l'organisme des animaux de laboratoire (13) et dont la demi-durée de vie biologique est courte: 30 minutes (14) — est protégée pour un laps de temps compatible avec la durée d'action que l'on reconnaît à la bensérazide, soit 2–4 heures (1, 4). Reste cependant ouverte la question de savoir si la bensérazide active l'anabolisme de la DOPA.

Excrétion de la 3-O-méthyl-dopa

L'horaire d'excrétion de la 3-O-méthyl-dopa par rapport à celui de la DOPA (voir fig. 2) est décalé. En fait, 3 sujets sur 6 seulement excrètent de la 3-O-méthyl-dopa dans les 2 1/2 heures qui suivent la bensérazide. Ce n'est que 8 1/2 heures après bensérazide que l'on retrouve de la 3-O-méthyl-dopa chez tous les sujets, alors que la DOPA a totalement disparu chez 5 sujets sur 6. L'excrétion de 3-O-méthyl-dopa se poursuit pendant encore au moins 24 heures chez 5 sujets sur 6. La latence d'apparition de la 3-O-méthyl-dopa peut tenir à au moins deux facteurs, à savoir: une élimination rénale lente ou/et une activation tardive des catéchol-O-méthyltransférases (par la bensérazide ou par l'accumulation de DOPA endogène elle-même). On sait d'autre part que la 3-O-méthyl-dopa, qui est un substrat médiocre pour la décarboxylase, a une demi-vie biologique relativement longue: 12–13 heures (14).

Excrétion de l'acide homovanillique

L'invariance de l'acide homovanillique (voir fig. 4) est compatible avec l'idée que si la bensérazide agit sur les monoamine-oxydases, cette action est modérée (4). Le fait, cependant, que l'acide homovanillique ne diminue en moyenne pas après bensérazide est inattendu, puisque, dans ces conditions, la synthèse de dopamine devrait être diminuée. Il faut toutefois souligner que 3 sujets ont accusé une diminution (de 33 à 76%) et les 4 autres une augmentation (de 126 à 233%) de l'excrétion d'acide homovanillique. Il est, en outre, intéressant de souligner que les sujets chez qui l'acide homovanillique a diminué présentaient des excrétions de base élevée (de 19,2 à 46,1 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$) alors que ceux qui ont accusé une augmentation après bensérazide avaient des taux normaux plus faibles (de 8,8 à 20,9 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$). Cette corrélation semble mettre en évidence des comportements différentiels analogues à ceux qui existeraient entre la réactivité des patients parkinsoniens à la L-DOPA et la teneur en acide homovanillique de leur liquide céphalo-rachidien (15, 16).

Excrétion de la dopamine

Immédiatement après bensérazide, la dopamine tend à diminuer discrètement. Cependant, c'est l'augmentation — statistiquement significative — de l'excrétion de dopamine 2 1/2 heures après bensérazide (augmenta-

tion qui dure près de 48 heures: voir fig' 3) qui est le fait le plus saillant de cette étude. Il semble ne pouvoir se rapporter à aucun effet immédiat connu de la bensérazide. Il évoque plutôt une réaction, relativement étendue, de l'organisme à la bensérazide (voir la conclusion).

Excrétions globales en 24 heures

Les valeurs normales trouvées pour la dopamine et l'acide homovanillique (voir tableau No. 1) se rapprochent de celles de la littérature (7, 10). L'évolution au cours du temps de la somme des excrétions mesurées dans cette étude montre une tendance à l'augmentation sous l'effet de la bensérazide (voir tableau No. 1). Cette augmentation est statistiquement significative après 48 heures; elle ne l'est pas après 24 heures parce que chez un seul sujet (celui qui, le jour témoin, avait l'excrétion globale la plus élevée) on notait une diminution de cette somme.

Conclusion

Les résultats concernant la dopamine et les excrétions globales des substances étudiées ici, suggèrent l'idée que la bensérazide peut activer le métabolisme de la DOPA. Cette activation peut être mise en relation avec la notion, développée par plusieurs auteurs (17, 18, 19, 20 et 21), que la synthèse de la dopamine est contrôlée par une contre-réaction négative au niveau des synapses dopaminergiques. Cette contre-réaction, déclenchée par la diminution de dopamine causée par la bensérazide, aurait pour effet d'activer la tyrosine hydroxylase, dont le rôle régulateur dans la synthèse de la DOPA est souvent invoqué (22, 23). D'autre part, l'activation de cet enzyme ne diminuant que lentement (17), on comprendrait pourquoi, alors que l'effet de la bensérazide s'est épuisé depuis longtemps, les taux d'excrétion globaux restent supérieurs à la norme au moins 48 heures après la prise de bensérazide.

Quoiqu'il en soit, cette étude a montré qu'une dose réputée faible d'une substance dont l'action est spécifique *in vitro* entraîne un large spectre de réactions chez l'individu, réactions assorties d'importantes variations interpersonnelles.

Bibliographie

- Gauthier, G., Ajuriaguerra, J. de, Simona, B., Constantinidis, J., Eisenring, J. J., Krassoievitch, M., Yannotis, G. & Tissot, R. (1970), *Rev. Neurol. (Paris)* 123, 297–319.
- Geissbühler, F., Constantinidis, J., Eisenring, J. J., Krassoievitch, M., Yannotis, G. & Tissot, R. (1971), *Clin. Chim. Acta* 33, 111–113.
- Geissbühler, F., Gaillard, J.-M., Eisenring, J. J., Krassoievitch, M., Yannotis, G. & Tissot, R. (1972), *Rev. Europ. Etudes Clin. Biol.* 17, 38–44.
- Bartholini, G. & Pletscher, A. (1975), *Pharmacol. Ther.* 1, 407–421.
- Geissbühler, F., Constantinidis, J., Gaillard, J.-M., Jacot des Combes, N. & Tissot, R. (1974), *Biomedicine* 21, 297–298.
- Geissbühler, F. & Hovaguimian, T. (en préparation).
- Geissbühler, F., Bartholini, G., Gaillard, J.-M. & Tissot, R. (1971), *Encéphale* 60, 189–209.
- Geissbühler, F. (1973), *Clin. Chim. Acta* 45, 423–427.
- Geissbühler, F. (1970), *Clin. Chim. Acta* 30, 143–148.

10. Geissbühler, F. (1969), *Clin. Chim. Acta* 26, 231–234.
11. Baldessarini, R. J. (1972), *J. Pharm. Pharmacol.* 24, 78–79.
12. Extein, I., Roth, R. H. & Bowers, M. B. (1974), *Biol. Psychiatry* 9, 161–170.
13. Lindqvist, M., Kehr, W. & Carlsson, A. (1975), *J. Neural. Transm.* 36, 161–176.
14. Kuruma, I., Bartholini, G., Tissot, R. & Pletscher, A. (1971), *Clin. Pharmacol. Ther.* 12, 678–682.
15. Jéquier, E. & Dufresne, J. J. (1972), *Neurology* 22, 15–21.
16. Gumpert, J., Sharpe, D. & Curzon, G. (1973), *J. Neurol. Sci.* 19, 1–12.
17. Guidotti, A., Zivkovic, B., Pfeiffer, R. & Costa, E. (1973), *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 278, 195–206.
18. Kehr, W., Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T. & Atack, C. (1972), *J. Pharm. Pharmacol.* 24, 744–747.
19. Rall, T. W. (1972), *Pharmacol. Rev.* 24, 399–409.
20. Mishra, R. K., Gardner, E. L., Katzman, R. & Makman, M. H. (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 71, 3883–3887.
21. Harris, J. E., Morgenroth, V. H., Roth, R. H. & Baldessarini, R. J. (1974), *Nature* 252, 158.
22. Kuczensky, R. (1975), *Neuropharmacol.* 14, 1–10.
23. Hendry, I. A., Iversen, L. L. & Black, I. B. (1973), *J. Neurochem.* 20, 1683–1689.

F. Geissbühler Dr. P. D.
Chef du laboratoire de chimie
de la clinique psychiatrique de Bel-Air.
CH-1225 Chêne-Bourg. Genève, Suisse.