

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 16, 1978, pp. 355-358

3-O-Méthyl-dopa Plasmatique Endogène chez l'Homme: Taux Normaux et Effet d'Un Inhibiteur des Décarboxylases des Acides Aminés Aromatiques (Bensérazide)

Par F. Geissbühler, Y. Raffin, C. Combépine, U. Streiff et T. Hovaguimian

Laboratoire de Biochimie de la Clinique Psychiatrique Universitaire de Genève (Directeur: Professeur R. Tissot)
Bel-Air, CH-1225 Chêne-Bourg

(Received September 26, 1977/January 27, 1978)

Résumé: Chez l'homme normal à jeun, le taux plasmatique de 3-O-méthyl-dopa se situe vers 120 ± 18 nmol/l. Quatre heures après une dose unique (425 μ mol) de bensérazide, cette valeur atteint 313 ± 69 nmol/l.

Endogenous 3-O-methyl-dopa in man: normal level and effect of an inhibitor of aromatic amino-acid decarboxylase (Benserazid)

The fasting level of 3-O-methyl-dopa in human plasma is 120 ± 18 nmol/l. Four hours after a single dose of 425 μ mol benserazid, the level increased to 313 ± 69 nmol/l.

Introduction

La 3-O-méthyl-dopa est un dérivé biologique important de la 3,4-dihydroxy-phénylalanine dont le métabolisme plasmatique endogène est mal connu (1, 2). Il semble, par ailleurs, que ces deux acides aminés fassent partie d'un équilibre biochimique plasmatique tel que la concentration de 3-O-méthyl-dopa prédomine largement (3). Il s'ensuit, en particulier, que la mise en évidence de 3-O-méthyl-dopa endogène est un argument en faveur de l'existence de 3,4-dihydroxy-phénylalanine endogène. De plus, la connaissance du taux plasmatique de 3-O-méthyl-dopa devrait permettre d'estimer celui de 3,4-dihydroxy-phénylalanine, dont le dosage demeure difficile (4), et d'en situer l'importance biologique. En conséquence, nous avons développé une méthode fluorométrique pour doser la 3-O-méthyl-dopa, ainsi qu'une méthode chromatographique pour la caractériser. Nous avons étudié, en outre, l'effet d'un inhibiteur des décarboxylases des acides aminés aromatiques (bensérazide) sur le taux plasmatique de 3-O-méthyl-dopa endogène, dans l'idée qu'une telle donnée, comparée aux résultats acquis sur la 3-O-méthyl-dopa exogène, pouvait confirmer l'existence de 3-O-méthyl-dopa circulante endogène.

Méthode

Quatorze sujets normaux, s'abstenant de toute médication pendant au moins une semaine et ne suivant aucun régime particulier, ont fait office de témoins. Leur sang a été prélevé à 09H00, alors qu'ils étaient à jeun, moyennant une ponction veineuse opérée avec une seringue de plastique contenant de l'héparinate de Na (50 U.UIP/ml de sang). Six autres sujets normaux à jeun ont reçu à 08H00 une dose per os de 0,425 mmol de bensérazide (3); chacun d'eux a subi une prise de sang, comme il est décrit ci-dessus, à 08H00, 10H00, 12H00 et 16H00. Enfin, trois sujets ont subi la même prise de sang, mais sans avoir été prétraités au bensérazide.

Le sang prélevé a été immédiatement centrifugé (2.600 g pendant 20 min), le plasma congelé sans délai et stocké à une température de -20°C , au plus une semaine avant d'être analysé. En vue du dosage fluorométrique de la 3-O-méthyl-dopa, le pH du plasma (6 ml) a été porté à 12,0 avec KOH 6 mol/l, pour détruire les catéchols interférents; après 10 min, 1 ml de tampon citrate de potassium pH 3,0, 0,1 mol/l a été rajouté au plasma dont le pH a alors été ajusté à 3,0 au moyen d'acide citrique 2 mol/l. Les protéines ainsi précipitées ont été centrifugées (10.000 g pendant 10 min à 0°C). Le surnageant a été passé sur une colonne de DOWEX 50 W à pH 3,0 (5) de 45 mm de long et 5 mm de diamètre, rincée préalablement avec 20 ml de tampon citrate de K pH 3,0 et 0,1 mol/l. Après le passage de l'échantillon, la résine a été lavée avec 5 ml du même tampon et 15 ml d'eau. Pendant toutes ces opérations, le débit a été maintenu à 0,2-0,3 ml/min. La formation du fluorophore a été réalisée comme suit:

	Blanc	Analyse	Etalon
Eluat	0,8 ml	0,8 ml	0,8 ml
Etalon (18,9 μ mol/l 3-O-méthyl-dopa dans HCl 0,01 mol/l)	—	—	0,01 ml
NaIO ₄ (23,4 mmol/l dans H ₂ O)	—	0,03 ml	0,03 ml
	Attendre 7 min		
Acide ascorbique (dissoudre 0,57 mmol d'acide ascorbique dans 10 ml H ₂ O; ajouter 3 ml d'acide 3-mercaptopropionique, et compléter à 100 ml avec NaOH 10 mol/l)	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
NaIO ₄ (23,4 mmol/l dans H ₂ O)	0,03	—	—
	Attendre 10 min		

Pour la fluorométrie, les longueurs d'onde suivantes ont été utilisées: activation 375 nm et fluorescence 480 nm (valeurs non corrigées de l'appareil utilisé: Aminco-Bowman). La linéarité de la méthode a été vérifiée dans une plage de concentration de 3-O-méthyl-dopa s'étendant de 40 à 2.100 pmol par ml de mélange où se formait la fluorescence (voir fig. 1). Le rendement global de la méthode, étudié à l'aide d'un étalon interne de 1,89 nmol de 3-O-méthyl-dopa ajouté à des quantités variables de plasma (0,5 ml, 2 ml, 6 ml, 10 ml et 20 ml), a pour

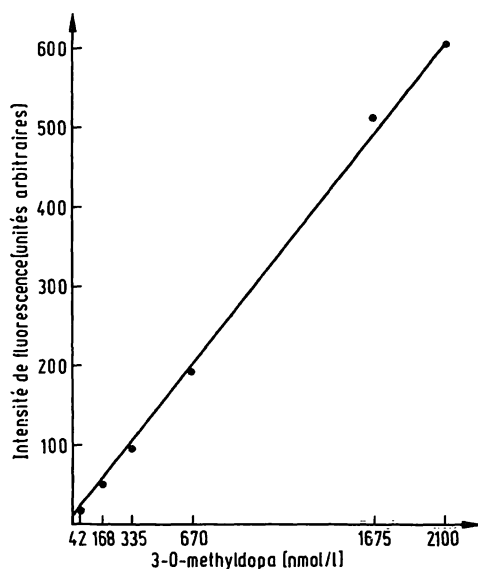


Fig. 1. Courbe d'étalonnage concentration/intensité de fluorescence pour la 3-O-méthyl-dopa.

Cette courbe a été établie à l'aide de solutions de 3-O-méthyl-dopa pure. La concentration s'entend en nmol de 3-O-méthyl-dopa par l de réactif où se forme le fluorophore.

Chaque point est la moyenne de 6 mesures. Les paramètres de la droite sont: $y = 8,6$ unités arbitraires de fluorescence + $0,293x$. $r = 0,9987$ pour $p < 0,001$.

Le coefficient de variation ($s/\bar{x} \cdot 100$) valait: 5,7% pour 42 nmol/l; 1,6% pour 168 nmol/l; 1,1% pour 335 nmol/l; 1,7% pour 670 nmol/l; 1,0% pour 1675 nmol/l et 0,94% pour 2100 nmol/l. Ces valeurs ont été calculées une fois le blanc soustrait, soit $8,7 \pm 0,5$ unités arbitraires de fluorescence ($N = 6$).

valeur $98 \pm 4\%$ ($N = 20$). La limite de sensibilité de la méthode (définie comme la quantité de 3-O-méthyl-dopa nécessaire à une lecture fluorométrique égale à celle du blanc) était de 51 ± 10 nmol/l ($N = 12$) du mélange où se formait le fluorophore, ce qui correspond à une prise de 288 ± 56 pmol pour un volume de plasma égal à 6 ml. Cette limite n'a été que peu influencée par le volume de plasma utilisé; elle atteint 34 pmol pour 6,5 ml, 45 pmol pour 10 ml, et 50 pmol pour 20 ml de plasma, lors d'une série d'analyses effectuées le même jour. La méthode exposée ci-dessus présente une interférence inférieure à 1% avec les substances suivantes, qui sont susceptibles de s'accumuler dans le plasma au cours de l'expérimentation décrite ici: L-3,4-dihydroxy-phénylalanine, tyrosine, dopamine, 3-O-méthyl-dopamine, acide homovanillique et bensérazide.

L'étude par chromatographie en couche mince a été conduite comme suit: 20 ml de plasma ont été soumis à une ultrafiltration (filtres MILLIPORE No PSACO 2510) qui s'est révélée indispensable à l'obtention d'un chromatogramme dont la résolution permette une visualisation correcte du spot de la 3-O-méthyl-dopa. L'ultrafiltrat a été mis à pH 12,0 avec KOH 6 mol/l. Après 10 min, le léger précipité qui s'est formé a été centrifugé (10.000 g pendant 10 min à 0°C), et le pH du surnageant a été ajusté à 3,0 avec de l'acide citrique 2 mol/l. Cette préparation a été chromatographiée sur DOWEX 50 W comme ci-dessus, et l'éluat (5 ml) a été lyophilisé sous vide (10^{-2} Torr), en présence de P₂O₅. Le résidu sec a été repris par 5 ml de n-butanol; le précipité formé par adjonction de 0,02 ml de HCl 12 mol/l a été éliminé par centrifugation (3.500 g pendant 15 min, à température ordinaire). Le surnageant a été réduit à environ 0,1 ml sous courant d'air chaud (environ 40°C), et déposé sur une plaque à chromatographie en couche mince de 20 x 20 cm (rouleau plastique CCM; gel de silice F₂₅₄ MERCK No 5749). Après chromatographie ascendante en une dimension (mélange de migration: n-butanol/acide acétique/H₂O, 80 ml + 25 ml + 15 ml), le chromatogramme a été révélé par exposition aux vapeurs d'aldéhyde formique à 100°C pendant 60 min, et examiné sous une lampe à mercure où prédominait la ligne Hg₃₆₅ nm. La 3-O-méthyl-dopa se caractérisait par un spot jaune-vert clair, dont le r_f valait $0,39 \pm 0,02$ ($N = 6$).

Résultats

Les spectres fluorométriques reproduit sur la figure 2 ne montrent pas de différence entre les substances pures et les extraits plasmatiques.

Selon notre méthode, le taux plasmatique, chez des sujets à jeun, de 3-O-méthyl-dopa se situe à 120 ± 18 nmol/l de plasma ($N = 14$). Quant à l'évolution au cours du temps du taux plasmatique de 3-O-méthyl-dopa après bensérazide, elle est représentée sur la figure 3. Les valeurs mesurées à 10H00 sont significativement plus élevées que celles de 08H00 ($p < 0,001$; $F = 1,86$). Les valeurs à 12H00 et 16H00 ne se différencient pas entre elles ($p > 0,8$; $F = 1,02$), mais sont plus élevées que celles qui ont été relevées à 10H00 ($p < 0,001$; les variances étant cependant significativement différentes: $F = 9,61$).

La même étude, faite sans bensérazide, n'a pas montré de fluctuation significative du taux plasmatique de 3-O-méthyl-dopa aux moments de la journée indiqués ici.

Les résultats chromatographiques ont été estimés visuellement. Le spot correspondant à la 3-O-méthyl-dopa a commencé à être perceptible quand la prise de plasma a dépassé 10 ml; pour une prise de plasma de 20 ml (ce qui correspond à 2,4 nmol environ de 3-O-

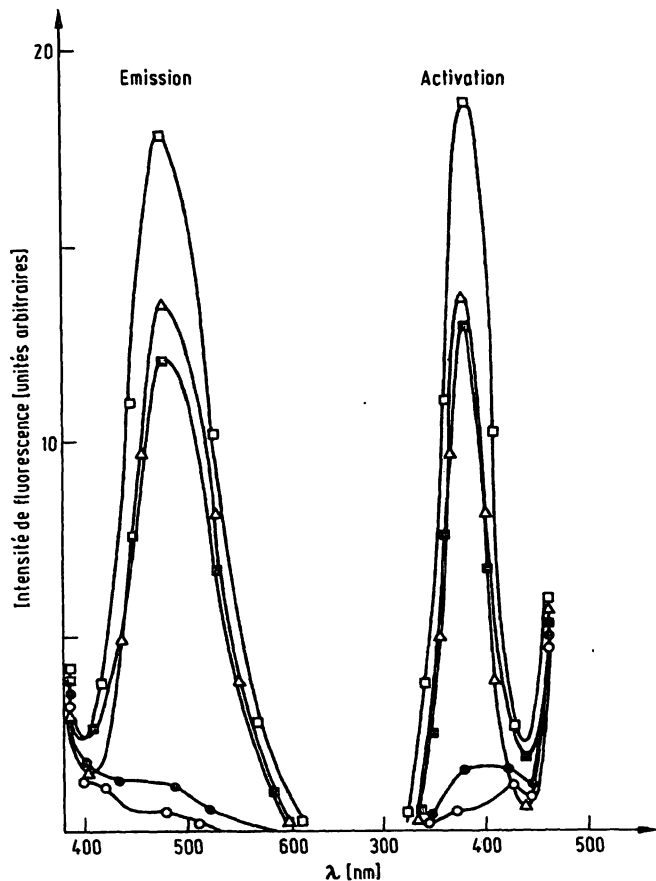


Fig. 2. Spectres fluorométriques pour la 3-O-méthyl-dopa.

- blanc des réactifs.
- △ étalon (préparé en remplaçant l'extrait plasmatique par 0,8 ml de tampon acétate de potassium 0,05 mol/l, pH 6,5, et contenant 166 nmol de 3-O-méthyl-dopa par l de mélange final de formation du fluorophore).
- blanc de l'extrait plasmatique.
- extrait plasmatique (volume de la prise de plasma: 6 ml).
- extrait plasmatique + étalon (l'étalon a été additionné au plasma en début d'analyse, et choisi de façon que la concentration rajoutée de 3-O-méthyl-dopa atteigne 84 nmol par l de mélange final de formation du fluorophore).

méthyl-dopa), l'intensité lumineuse et la couleur du spot ont été tout à fait comparables à celles d'un spot étalon de 2,5 nmol. D'autre part, le même chromatogramme ne comportait pas d'autre spot dans la zone attribuable à la 3-O-méthyl-dopa.

Discussion

Les interrelations biochimiques entre la 3-O-méthyl-dopa et la 3,4-dihydroxy-phénylalanine exogènes sont bien connues (6). Cependant, les renseignements sur la 3-O-méthyl-dopa plasmatique endogène sont fragmentaires (1, 2).

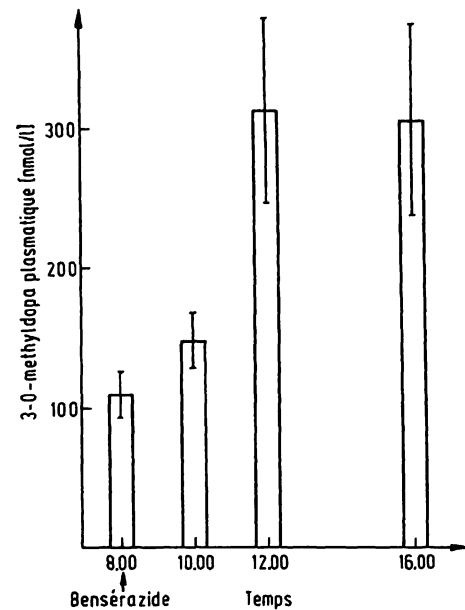


Fig. 3. Evolution, au cours du temps, du taux plasmatique de 3-O-méthyl-dopa chez l'homme, après une prise unique de 425 μ mol de bensérazide.

Deux heures après bensérazide, l'élévation du taux plasmatique de 3-O-méthyl-dopa est significative relativement aux taux avant bensérazide ($p < 0,001$). Les valeurs relevées 4 et 8 heures après bensérazide – qui sont significativement plus élevées que celles de 08H00 et 10H00 ($p < 0,001$) – ne se différencient pas entre elles ($p > 0,8$).

Les données fluorométriques et chromatographiques qui sont décrites ici confirment la présence de 3-O-méthyl-dopa plasmatique endogène chez l'homme. Elles permettent aussi de préciser que cet acide aminé n'est probablement pas fixé en proportions importantes sur les protéines plasmatiques, puisque les résultats chromatographiques, obtenus sur un ultrafiltrat plasmatique, sont du même ordre que ceux de la fluorométrie qui, elle, a été réalisée sur du plasma non filtré. D'autre part, la substance dosée par notre méthode dans du plasma de sujets ayant reçu une dose de bensérazide suit une cinétique caractérisée par une stagnation dans le plasma; cette particularité peut être attribuée à la 3-O-méthyl-dopa dont la demi-durée de vie biologique est de l'ordre de 15 heures (6). C'est donc un argument de plus en faveur de la présence de 3-O-méthyl-dopa endogène dans le plasma humain.

D'autre part, il a été montré qu'après bensérazide le taux plasmatique de 3-O-méthyl-dopa exogène surpasse d'au moins 30 fois celui de la 3,4-dihydroxy-phénylalanine exogène chez l'homme à jeun (3). Si l'on applique cette donnée à nos résultats, on peut déduire que s'il existe de la 3,4-dihydroxy-phénylalanine endogène circulante, sa concentration doit être inférieure à 4 nmol/l (5). Dans ces conditions, il est en particulier peu probable que la 3,4-dihydroxy-phénylalanine circulante endogène joue un rôle important dans le métabolisme catécholaminergique cérébral.

Bibliographie

1. Muentner, M. D., Sharpless, N. S. & Tyce, G. M. (1972), *Mayo Clin. Proc.* **47**, 389-395.
2. Sharpless, N. S., Muentner, M. D., Tyce, G. M. & Owen, C. A. (1972), *Clin. Chim. Acta* **37**, 359-369.
3. Geissbühler, F., Gaillard, J.-M., Eisenring, J.-J., Krassoievitch, M., Yanniotis, G. & Tissot, R. (1972), *Rev. Eur. Etud. Clin. Biol.* **17**, 38-44.
4. Geissbühler, F., Constantinidis, J., Gaillard, J.-M., Jacot des Combes, N. & Tissot, R. (1974), *Biomedicine* **21**, 297-298.
5. Geissbühler, F. (1973), *Clin. Chim. Acta* **45**, 423-427.
6. Kuruma, I., Batholini, G., Tissot, R. & Pletscher, A. (1971), *Clin. Pharmacol. Ther.* **12**, 678-682.

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