

*Journal of Chromatography*, 164 (1979) 139—154

*Biomedical Applications*

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 378

## IDENTIFICATION DE LA 4-O-MÉTHYL DOPAMINE DANS LES TISSUS DE RAT PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE

JEAN-NOËL BIDARD et LUCIEN CRONENBERGER

*Service de chimie biologique, Bâtiment 406, Institut National des Sciences Appliquées, F-69621 Villeurbanne Cedex (France)*

(Reçu le 12 mars 1979)

---

### SUMMARY

*Identification of 4-O-methyldopamine in rat tissues by reversed-phase liquid chromatography*

4-O-Methyldopamine was identified and assayed in tissues from L-dopa treated rats by reversed-phase high-performance liquid chromatography. The initial steps in the separation of catecholamines were performed by alumine, a weak cation-exchange resin, and thin-layer chromatographic techniques.

After L-[<sup>3</sup>H]dopa administration, the radiochromatogram was superimposed on the fluorochromatogram obtained with authentic marker 4-O-methyldopamine. This metabolite was detected in kidney but not in brain.

The 4-O-methyldopamine:3-O-methyldopamine ratio was 0.032 in kidney. The influence of various treatments on this ratio was investigated. A 160% increase was found after L-dopa administration. This effect was potentiated by nialamide pretreatment (550% increase).

---

### INTRODUCTION

Dans le traitement de la maladie de Parkinson par la L-dopa, il apparaît parfois un phénomène de dyskinésie. Dans ce cas, il y a une corrélation entre ce symptôme pathologique et la concentration plasmatique de la O-méthyl-dopa [1]. D'autre part, l'activité dopaminergique périphérique se reflète au niveau urinaire par la présence de 3-O-méthyldopamine (3 MD) [2]. Cependant, aucune étude sur les métabolites de la L-dopa ou de la dopamine ne signale l'existence dans les tissus de la 4-O-méthyldopamine (4 MD). Théoriquement, cette molécule peut se former dans l'organisme puisque l'on retrouve parmi les produits d'excrétion urinaire un métabolite méthylé en position 4, l'acide isohomovanillique [3]. Dans l'urine des parkinsoniens, le rapport acide isohomovanillique/acide homovanillique est le même que chez les sujets normaux [4, 5]. Toutefois, le traitement par la L-dopa peut modifier ce rapport [6, 7]. Chez le rat, il est plus élevé dans les corps striés que dans l'urine [3].

L'intérêt pour la 4 MD provient du fait que cette substance, injectée à l'animal, possède une action hypokinésique différente de celle de son isomère, la 3 MD [8]. Cette akinésie présente une analogie avec celle observée au cours du syndrome parkinsonien [9].

En ce qui nous concerne, nous avons publié l'action de la S-adénosylméthionine sur le métabolisme de la dopamine et de la L-dopa [10, 11]. Nous avons aussi retrouvé dans l'urine de rat traité par la L-dopa de la 4 MD que nous avons purifiée par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions et dosée par fluorimétrie après dérivation [12]. La méthode utilisée était néanmoins difficile à mettre en oeuvre et peu efficace. Une séparation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) des catécholamines formées dans des cultures de tissus de mammifères a été proposée par Stout et al. [13]. Ces auteurs décrivent, entre autres, l'analyse de la MD par chromatographie en phase inverse. Récemment, l'analyse des métabolites de la L-dopa a été réalisée par une méthode impliquant la séparation des catéchols sur une colonne d'alumine puis analyse HPLC [14].

Notre objectif dans le présent travail est de rechercher, "in vivo" chez le rat, la possibilité de formation de la 4 MD. Cette recherche sera faite dans les reins et le cerveau dans une optique physiologique avec surcharge très faible de L-dopa [ $^3\text{H}$ ] et, également sous l'angle pharmacologique par traitement de l'animal avec une dose relativement élevée de L-dopa. Afin d'identifier la 4 MD tissulaire, nous utiliserons la méthode HPLC avec appariement d'ions après séparation des catécholamines par chromatographie échangeuse d'ions et chromatographie couche mince.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Produits chimiques*

Ils sont achetés aux sociétés suivantes: L-dopa, sérotonine créatinine sulfate (Fluka, Buchs, Suisse); dopamine-HCl (Serlabo, Paris, France) noradrénaline-HCl, normétanéphrine-HCl, octopamine-HCl, 3-méthoxytyramine-HCl, diméthoxy-3,4-phényléthylamine-HCl, acide dihydroxy-3,4-phénylacétique (Sigma, St. Louis, Mo., É.U.); tyramine-HCl (Prolabo, Paris, France), 4-O-méthyl dopamine-HCl; épinine-HCl (Regis, Morton Grove, Ill., É.U.). Tous les produits ont une pureté "pour analyse". L'eau est bidistillée. Le nialamide a été généreusement offert par Pfizer-Clin (Paris, France). La S-adénosylméthionine (SAM) a été préparée au laboratoire selon la technique de Schlenk et al. [15] pour sa synthèse et celle de Haid et Nelboeck-Hochstetter [16] pour sa purification.

Nous avons utilisé l'alumine Woelm N-super I neutre W 200-400 mesh, et l'Amberlite CG 50, activée sous forme  $\text{H}^+$  et équilibrée dans un tampon phosphate  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1 M de pH 6.1 (1:1 en volume). La résine Dowex 50 W-X4, 200-400 mesh (Fluka), activée sous forme  $\text{H}^+$ , est équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0.2 M pH 6.5 (1:1 en volume).

La dopa [ $^3\text{H}$ ] ou L-3,4-dihydroxyphényl 2,3- [ $^3\text{H}$ ] alanine (2.5 Ci/mmoles) est fournie par Radiochemical Centre (Amersham, Angleterre). Elle est employée dans les 15 jours après sa réception (conservation à 4° et à l'obscurité). La 3 MD [ $^3\text{H}$ ] ou 3-méthoxy-4-hydroxy- $\beta$ -phényléthylamine 5- [ $^3\text{H}$ ] 9.957 Ci/

mmole (NET 321) provient de New England Nuclear (Boston, Mass., É.U.). Le liquide scintillateur pour le comptage est le Picofluor 15 "Packard".

#### *Traitement des animaux*

Les expériences sont conduites sur des rats mâles Wistar, souche CF Gif, poids 200 à 250 g. La température de la salle est contrôlée ( $21^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ); l'alternance jour (7 h–19 h)/nuit (19 h–7 h) est réglée. La nourriture et l'eau sont ad libitum.

Les substances sont administrées par voie intrapéritonéale, en général sous un volume de 1 ml en milieu isotonique ( $\text{NaCl } 9^0/_{00}$ ). Pour réaliser de fortes concentrations de L-dopa injectable (50–100 mg/kg), celle-ci (200 mg) est solubilisée dans HCl 0.03 N (30 ml) par agitation à  $50^{\circ}$  et à l'obscurité. Après dissolution, le pH est amené à 5.1 par 3 ml de  $\text{CH}_3\text{COONa } 1 M$ . Les animaux témoins reçoivent une quantité équivalente du milieu de dissolution.

#### *Extraits tissulaires*

Les reins et le cerveau d'un rat sont prélevés rapidement après décapitation. Toutes les opérations sont réalisées à  $4^{\circ}$ . Les tissus sont homogénéisés dans 10 ml d'acide perchlorique 0.4 N. Les standards internes sont introduits avant cette homogénéisation. Après centrifugation (17,000 g, 5 min) le surnageant (fraction I) est conservé à  $4^{\circ}$ . L'anion perchlorique est alors éliminé par neutralisation à pH 8.3 avec  $\text{K}_2\text{CO}_3$  6% puis centrifugation (2,000 g, 5 min).

#### *Fractionnement sur alumine et amberlite*

Le principe de la méthode de fractionnement est celui de Karazawa et al. [17]. On prépare deux colonnes (diamètre 0.6 cm); l'une contient 500 mg d'alumine, la deuxième 0.6 ml de résine amberlite. Elles sont lavées par 20 ml d'eau distillée, puis la colonne d'amberlite est placée au-dessous de la colonne d'alumine. La fraction I précédemment neutralisée à pH 8.3 est alors versée sur la colonne d'alumine. Après écoulement à travers les deux colonnes, on verse 10 ml d'eau. Les colonnes sont séparées, et lavées individuellement par 10 ml d'eau. L'alumine retient les catéchols. Ils sont élués par 3 ml d'HCl 0.2 N. La dopamine est ensuite purifiée sur Dowex 50 W X-4 et dosée selon un protocole précédemment décrit [11]. Il est également possible d'analyser cet éluat d'alumine par HPLC selon la technique utilisée ci-après pour la 3 MD et la 4 MD. L'amberlite est traité par 1 ml d'HCl 0.5 N; puis une deuxième élution par 2 ml d'HCl 0.5 N permet de recueillir la 3 MD et la 4 MD (fraction II).

#### *Concentration*

La fraction II est lyophilisée, le résidu repris par 1 ml de méthanol puis 2 ml d'acétate d'éthyle avec agitation à l'aide d'un cyclomixer à température ambiante. Après centrifugation (5,000 g, 5 min) le surnageant est débarrassé des sels minéraux. On verse 30  $\mu\text{l}$  d'HCl 0.1 N dans la solution méthanol–acétate d'éthyle. L'extrait est évaporé sous pression réduite, à température du laboratoire puis le résidu sec est repris par 200  $\mu\text{l}$  de méthanol–HCl 0.01 N (4:1) (fraction III). Cette dernière fraction est suffisamment concentrée et

purifiée pour l'analyse HPLC ou pour l'analyse par chromatographie en couche mince suivie de la HPLC.

#### *Chromatographie liquide à haute performance*

La séparation de la 3 MD et de la 4 MD est réalisée sur un appareil Waters Associates Modèle 204 U avec pompe 6000A, injecteur à septum, détecteur UVM 440 avec filtre à 280 nm et enregistreur Omniscrite. La phase stationnaire est une silice greffée  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (diamètre 0.39 cm, longueur 30 cm).

La phase mobile est préparée de la manière suivante: l'eau bidistillée et le méthanol contenant chacun  $5 \cdot 10^{-3}$  M d'acide heptane sulfonique dissout dans l'acide acétique (PIC B 7) sont filtrés sur leurs filtres Millipore respectifs (HAWP 04700 et FHUP 04700). Les deux solutions sont ensuite mélangées afin d'obtenir la proportion méthanol-eau (35:65 en volume). Le pH final est de 3.3. L'élution est de type isocratique avec un débit de 1 ml/min. L'analyse est faite par enregistrement continu d'1 cm/min de la densité optique à 280 nm. La détermination quantitative s'obtient par mesure de la surface des pics par rapport à des standards. Cette analyse est parfois complétée par une détection fluorimétrique et radiochimique. Dans ce cas, à la sortie de l'appareil on collecte des fractions de 0.33 ml (20 sec) qui après addition d'1 ml d'eau sont analysées fluorimétriquement et comptées. Après injection de 5 à 25  $\mu$ l de la fraction III les pics correspondants à la 3 MD et à la 4 MD sont respectivement appelés fraction IV<sub>3</sub> MD et IV<sub>4</sub> MD.

#### *Chromatographie en couche mince puis HPLC*

Les plaques de silicagel 60 F 254, sur support plastique 20  $\times$  20 cm (Merck, Darmstadt, R.F.A.) sont développées avec le mélange *n*-butanol-acétate d'éthyle-ammoniac 32% (60:20:20). Après 4 h de développement, les plaques sont séchées et les spots de 3 MD et 4 MD sont visualisés avec la lumière UV à 254 nm ( $R_F = 0.39$  pour 4 MD et 0.53 pour 3 MD). Les zones correspondantes sont découpées et placées dans 2.5 ml d'HCl 0.01 N. Après une nuit à 4°, centrifugation et filtration sur millipore AA WP 02500 0.80  $\mu$ m, on lyophilise. Les résidus (fraction V<sub>A</sub> pour la 4 MD et V<sub>B</sub> pour la 3 MD) sont repris par 100  $\mu$ l d'HCl 0.01 N. L'analyse par HPLC est faite sur 25  $\mu$ l de V<sub>A</sub>. Pour les mesures de fluorescence et de radioactivité, on collecte des volumes de 0.33 ml. Le pic correspondant à la 4 MD est la fraction VI<sub>4</sub> MD.

Il est possible de détecter qualitativement la 3 MD et la 4 MD sur couche mince, par vaporisation d'une solution aqueuse de *p*-nitrobenzène diazonium tétrafluoroborate à 0.1% puis une solution aqueuse de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% (sensibilité: 1 nmole pour la 4 MD, coloration violette).

#### *Analyse fluorimétrique*

Le spectrofluorimètre est un appareil Farrand MK 1. La relation entre la quantité de produit en fonction de l'intensité de fluorescence est toujours calculée en tenant compte d'un blanc et d'un standard interne. Les diverses fractions sont dosées directement aux longueurs d'ondes:  $\lambda_e = 270$  nm,  $\lambda_f = 315$  nm. Cette analyse est non destructive, les fractions sont récupérées pour une purification ultérieure.

Certaines analyses fluorimétriques sont réalisées, après dérivation, selon un dosage spécifique de la 3 MD ou de la 4 MD [12].

### *Analyse radiochimique*

La mesure radiochimique est faite après addition de 10 ml de Picofluor 15 (Packard, Downers Grove, Ill., É.U.) sur un spectromètre à scintillation liquide Packard. L'efficacité du comptage est pour la L-dopa[<sup>3</sup>H] ou la 3 MD[<sup>3</sup>H] de 37 à 43% selon les fractions considérées. Les résultats sont corrigés par rapport à un standard interne de L-dopa[<sup>3</sup>H] pour les fractions I et l'éluat d'alumine, et de 3 MD[<sup>3</sup>H] pour les autres fractions.

### *Étude du rendement des standards internes*

Les standards internes sont introduits au niveau de l'homogénéisation des tissus. Dans les cas d'échantillon radioactif (L-dopa[<sup>3</sup>H]) on additionne aux homogénats 400 nmoles de 4 MD inerte. Lorsque l'étude est réalisée avec injection de L-dopa inerte, on ajoute des surcharges de 4 et 40 nmoles soit de 3 MD, soit de 4 MD à des échantillons provenant de rats témoins.

La comparaison de ces standards internes aux essais correspondants nous permet d'apprécier le rendement de chaque étape de fractionnement. Les analyses sont faites par dosage fluorimétrique ou spectrophotométrique direct par HPLC.

## RÉSULTATS

### *Chromatographie liquide à haute performance*

Un chromatogramme caractéristique de plusieurs catécholamines obtenu par HPLC en phase inverse est représenté Fig. 1. Il est à noter la bonne séparation de la 4 MD des autres amines, notamment de la 3 MD, de la tyramine, de la dopamine ou de la normétanéphrine. Afin de ne pas surcharger la figure, nous avons limité le nombre des catécholamines dans le mélange injecté. Les facteurs de capacité obtenus sont donnés dans le Tableau I. Il est évident que les métabolites aminés de la L-dopa sont tous bien séparés de la 4 MD.

Les temps de rétention ( $t_R$ ) par analyse HPLC ne dépendent pratiquement pas de la surcharge ni de la nature de l'extrait de départ: pour la 4 MD  $t_R = 10.2 \pm 0.2$  min et pour la 3 MD  $t_R = 8.8 \pm 0.1$  min. Cependant, la résolution entre la 3 MD et la 4 MD est d'autant meilleure que le volume de la fraction III injecté est plus faible.

### *Sensibilité de la méthode*

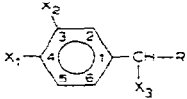
*Détection spectrophotométrique.* On estime qu'une hauteur de 1 cm, pour la sensibilité maximum de l'appareil, correspond au seuil de détection. En ce cas, l'analyse HPLC étant effectuée sur 1/8ième de la fraction III, la sensibilité de la détection est de 2.9 nmoles de 4 MD ou de 2.2 nmoles de 3 MD dans l'extrait rénal. Pour les blancs (reins de rats contrôles non surchargés en amines), dans la zone de rétention de la 3 MD, la hauteur du pic chromatographique est inférieure au seuil de détection tandis que dans la zone de rétention de la 4 MD l'enregistrement se confond avec la ligne de base.

*Détection radiochimique.* On estime significative toute radioactivité supérieure à dix fois la racine carrée du mouvement propre. En tenant compte

## TABLEAU I

## STRUCTURE ET FACTEUR DE CAPACITÉ DES MÉTABOLITES DE LA DOPA

Le facteur de capacité  $k'$  est calculé par la relation  $k' = (t_R - t_M)/t_M$ .  $t_R$  = temps de rétention du soluté,  $t_M$  = temps de rétention d'un produit non retenu (eau). La formule générale n'est pas applicable à la sérotonine.

Symbole	Nom					Facteur de capacité ( $k'$ )
		$X_1$	$X_2$	$X_3$	R	
DOPA	Dihydroxyphénylalanine	OH	OH	H	$\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	1
DOPAC	Ac dihydroxyphénylacétique	OH	OH	H	$\text{COOH}$	1.14
NE	Noradrénaline	OH	OH	OH	$\text{CH}_2\text{NH}_2$	1.73
OCT	Octopamine	OH	H	OH	$\text{CH}_2\text{NH}_2$	2.05
NM	Normétanéphrine	OH	$\text{OCH}_3$	OH	$\text{CH}_2\text{NH}_2$	2.09
DA	Dopamine	OH	OH	H	$\text{CH}_2\text{NH}_2$	2.23
EP	Epinine	OH	OH	H	$\text{CH}_2\text{NHCH}_3$	2.36
TYR	Tyramine	OH	H	H	$\text{CH}_2\text{NH}_2$	2.86
3 MD	3-O-Méthildopamine	OH	$\text{OCH}_3$	H	$\text{CH}_2\text{NH}_2$	3.09
MET	Métanéphrine	OH	$\text{OCH}_3$	OH	$\text{CH}_2\text{NHCH}_3$	3.14
5 HT	Sérotonine	—	—	—	—	3.27
4 MD	4-O-Méthildopamine	$\text{OCH}_3$	OH	H	$\text{CH}_2\text{NH}_2$	3.77
DMPEA	Diméthoxy-3,4 phényl-éthylamine	$\text{OCH}_3$	$\text{OCH}_3$	H	$\text{CH}_2\text{NH}_2$	5.50

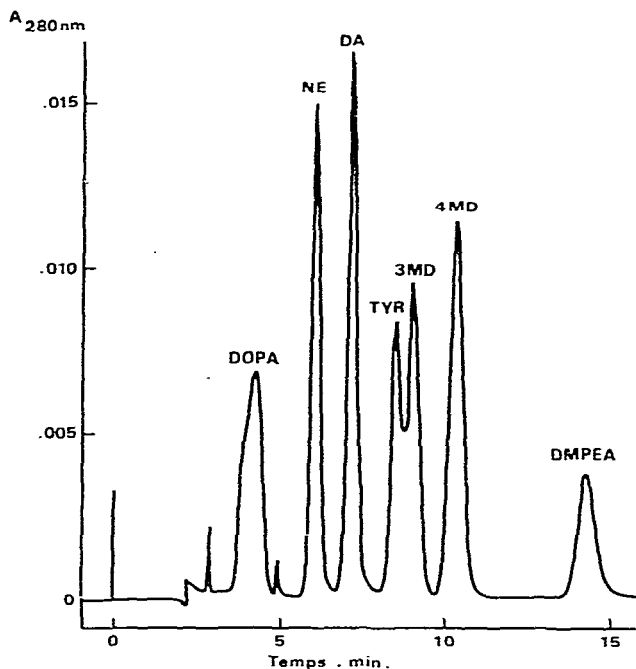


Fig. 1. Représentation d'un chromatogramme HPLC de catécholamines. Colonne:  $\mu$ Bondapak  $\text{C}_{18}$ ,  $30 \times 0.39$  cm. Phase mobile: méthanol-eau (35:65 en volume), pic B<sub>7</sub>, pH: 3.3, débit: 1 ml/min, pression: 2000 p.s.i. Température ambiante. Échantillon: 25  $\mu$ l d'un mélange de catécholamines solubilisées dans HCl 0.01 N. Les quantités injectées sont les suivantes (en nmoles): dopa: 1.8; NE: 2.11; DA: 2.33; TYR: 2.6; 3 MD: 1.43; 4 MD: 2.14; DMPEA: 1.97. Détection UV à 280 nm; sensibilité DO = 0.02 (pleine échelle).

TABLEAU II

## RENDEMENTS (%) DES DIVERSES ÉTAPES DE PURIFICATION DE LA 4 MD

Les rendements en % représentent la moyenne  $\pm$  SEM de quatre déterminations ( $n = 4$ ), une détermination par rat. Une surcharge de 400 nmoles de 4 MD est ajoutée à chaque homogénat tissulaire. Les déterminations sont fluorimétriques. Signification des fractions: I = homogénat; II = éluat amberlite; III = lyophilisat; IV<sub>4 MD</sub> = HPLC (4 MD); V<sub>A</sub> = éluat chromatographie sur couche mince (4 MD); VI<sub>4 MD</sub> = chromatographie sur couche mince-HPLC (4 MD).

Tissus	Fractions					
	I	II	III	IV <sub>4 MD</sub>	V <sub>A</sub>	VI <sub>4 MD</sub>
Cerveau	100	95 $\pm$ 0.9	80.3 $\pm$ 1.7	73 $\pm$ 2	50.4 $\pm$ 2.9	39.8 $\pm$ 2.5
Reins	100	87.5 $\pm$ 1.8	73.5 $\pm$ 3.5	69.5 $\pm$ 3.3	49.3 $\pm$ 2.0	40.2 $\pm$ 2.2

des rendements et de l'efficacité du comptage de la fraction VI<sub>4 MD</sub>, la radioactivité initiale de la 4 MD[<sup>3</sup>H] dans la fraction I devra être au minimum de 819 dpm/g pour les reins ou de 935 dpm/g pour le cerveau. Ces valeurs correspondent à des pourcentages minima de 4 MD[<sup>3</sup>H]:3 MD[<sup>3</sup>H] détectables de 0.31% dans les reins témoins, 30% dans le cerveau témoin, 0.16% et 0.93% respectivement dans les reins et le cerveau de rats traités au nialamide.

*Rendements de la purification de la 4 MD*

À titre d'exemple, le Tableau II montre l'évolution du rendement à chaque étape de la purification de la 4 MD. Précisons que l'étape de chromatographie en couche mince a été réalisée avec les 3/4 de la fraction III. Le rendement de la fraction V<sub>A</sub> par rapport à III est voisin de 70%. Tous les autres rendements sont supérieurs et se situent entre 80 et 95%. Les différences liées aux tissus, reins ou cerveau, sont négligeables; cependant, le rendement de l'étape I  $\rightarrow$  II est meilleur dans le cas du cerveau. La reproductibilité du rendement (SEM/moyenne) obtenue pour 4 déterminations de 4 MD, respectivement à partir des reins et du cerveau, est de 4.7% et 2.8% avec la fraction IV, et de 5.4% et 6.5% avec la fraction VI.

En ce qui concerne les standards internes (4 ou 40 nmoles de 3 MD ou de 4 MD) introduits au niveau de l'homogénat de reins de rats témoins, les rendements pour la fraction IV sont de 79  $\pm$  2 pour la 3 MD et de 75  $\pm$  2 pour la 4 MD. Ils sont légèrement supérieurs à ceux obtenus pour les échantillons radioactifs étant donné les prélèvements effectués en vue des mesures, dans ce dernier cas. La détection sur chromatographie sur couche mince avec des surcharges initiales de 4 ou 40 nmoles de 3 ou de 4 MD est à la limite de l'appréciation visuelle. La détermination quantitative n'est plus possible sur les fractions V et VI.

*Formation de 4 MD[<sup>3</sup>H] après administration de L-dopa[<sup>3</sup>H] (Tableau IV)*

Après administration de L-dopa[<sup>3</sup>H] à des rats, prétraités ou non par un inhibiteur de la monoamine oxydase, la formation possible de 4 MD[<sup>3</sup>H] et de 3 MD[<sup>3</sup>H] est étudiée dans les reins et dans le cerveau.

TABLEAU III  
 RADIOACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DES DIVERSES ÉTAPES DE PURIFICATION CONDUISANT À LA 4 MD [ $^3\text{H}$ ] À PARTIR DU REIN ET DU CERVEAU DE RAT TRAITÉ PAR LA L-DOPA [ $^3\text{H}$ ]

Chaque activité spécifique est la moyenne de deux déterminations ( $n = 2$ ), une détermination par rat. Une surcharge de 400 nmoles de 4 MD est ajoutée à chaque homogénat tissulaire. Les déterminations sont radiochimiques et fluorimétriques. Signification des fractions: I = homogénat; II = éluat amberlite; III = lyophilisat; IV<sub>4</sub>MD = HPLC (4 MD); V<sub>A</sub> = éluat chromatographique sur couche mince (4 MD); VI<sub>4</sub>MD = chromatographie sur couche mince-HPLC (4 MD). Le prétraitement est effectué 5 h avant l'injection de L-dopa [ $^3\text{H}$ ]. Les rats sont sacrifiés 30 min après l'injection de L-dopa [ $^3\text{H}$ ].

Tissus	Traitement	L-dopa [ $^3\text{H}$ ]	Activité spécifique (dpm/nmoles de 4 MD)					
			I	II	III	IV <sub>4</sub> MD	V <sub>A</sub>	VI <sub>4</sub> MD
Cerveau	NaCl 9 $^{\circ}/_{\infty}$	1.6 mCi/0.126 mg/kg	1997	13.2	15.3	0	0	0
	Nialamide 100 mg/kg	1.6 mCi/0.126 mg/kg	2520	329	331	4.7	12.2	0
Reins	NaCl 9 $^{\circ}/_{\infty}$	1.6 mCi/0.126 mg/kg	25,184	1061	1101	35.2	44.7	33.4
	Nialamide 100 mg/kg	1.6 mCi/0.126 mg/kg	22,751	2012	2042	65.1	90.6	62.7



Les mesures de radioactivité et de quantité de 4 MD (standard interne) permettent de déterminer la radioactivité spécifique "As" dans chaque étape du fractionnement (Tableau III). La radioactivité spécifique diminue au cours du fractionnement jusqu'à la fraction IV<sub>4</sub>MD. On remarque l'égalité de la radioactivité entre les fractions IV<sub>4</sub>MD et VI<sub>4</sub>MD. Cette observation est un argument en faveur de la pureté radiochimique de la 4 MD[<sup>3</sup>H] dans ces deux fractions. À partir de ces résultats on déduit:

le pourcentage de métabolite 3 MD[<sup>3</sup>H] + 4 MD[<sup>3</sup>H] par rapport à la totalité des métabolites tritiés tissulaires R [<sup>3</sup>H],

le pourcentage de 4 MD[<sup>3</sup>H] par rapport à la 3 MD[<sup>3</sup>H].

Ces résultats sont consignés dans le Tableau IV. À titre indicatif figurent également la radioactivité totale R [<sup>3</sup>H] et celle de la DA[<sup>3</sup>H] en % de R [<sup>3</sup>H].

*Dans les reins.* La formation du dérivé 4-O-méthylé de la dopamine: 4 MD[<sup>3</sup>H] est identifiée après administration de la L-dopa[<sup>3</sup>H]. Le rapport 4 MD [<sup>3</sup>H]:3 MD[<sup>3</sup>H] est faible 3.2% mais cette valeur est acceptable par rapport au seuil de sensibilité 0.3%. Ce rapport subit une augmentation significative ( $p < 0.001$ ) de 66% lorsque la quantité de L-dopa administrée est 80 fois plus importante. Dans ces conditions l'O-méthylation de la dopamine augmente légèrement tandis que l'accumulation de dopamine dans les reins est très forte ( $\times 12$ ).

L'administration de SAM est sans effet sur la 3 et la 4-O-méthylation de la dopamine dans les reins.

Le nialamide, inhibiteur de la MAO, élève la radioactivité de la 3 MD[<sup>3</sup>H] (+ 110%). Mais surtout il augmente la 4 MD[<sup>3</sup>H] de façon parallèle à la 3 MD[<sup>3</sup>H]. En conséquence le rapport 4 MD[<sup>3</sup>H]:3 MD[<sup>3</sup>H] reste sensiblement le même: 3.1%. L'inhibition de la désamination oxydative de la 4 MD[<sup>3</sup>H] et de la 3 MD[<sup>3</sup>H] est identique in vivo. Les concentrations de ces amines étant très faibles, l'activité de la monoamine oxydase périphérique est sans effet.

*Dans le cerveau.* La 4 MD[<sup>3</sup>H] n'est pas retrouvée dans le cerveau, et cela aussi bien pour les rats témoins ou traités au nialamide. Dans ce dernier cas, nous pouvons affirmer que le rapport 4 MD[<sup>3</sup>H]:3 MD[<sup>3</sup>H] est inférieur à 0.9%, pourcentage bien inférieur à celui déterminé dans les reins.

La 3 MD[<sup>3</sup>H] existe en quantité très faible chez les animaux témoins. Le nialamide modifie beaucoup la concentration de ce métabolite: la radioactivité est multipliée 17 fois.

*Mise en évidence de la 4 MD[<sup>3</sup>H].* L'étude par HPLC de la fraction III ne montre qu'un seul pic de radioactivité dont le volume de rétention correspond à la 3 MD[<sup>3</sup>H]. Cette analyse démontre l'absence de 3 DA[<sup>3</sup>H] et la présence exclusive de 3 MD[<sup>3</sup>H] dans les fractions II et III. Par contre, le pic de 4 MD[<sup>3</sup>H] est masqué par celui de 3 MD[<sup>3</sup>H] et par une analyse radiochimique sur des fractions collectées trop importantes. La chromatographie sur couche mince permet d'isoler un spot de 4 MD (fraction V<sub>A</sub>). L'analyse par HPLC de cette fraction montre une superposition entre le diagramme de fluorescence (standard interne de 4 MD) et celui de radioactivité 4 MD[<sup>3</sup>H] en fonction du temps de rétention (Fig. 2): ce type de chromatogramme est un bon argument en faveur de l'identité entre les deux substances. D'autres expériences réalisées avec la L-dopa inerte viendront corroborer ce premier résultat.

TABLEAU IV

DISTRIBUTION DE LA 4 MDI<sup>3</sup>H, 3 MDI<sup>3</sup>H, DA<sup>3</sup>H ET DE LA RADIOACTIVITÉ TOTALE DANS LE REIN ET LE CERVEAU DE RAT TRAITÉ PAR LA L-DOPA<sup>3</sup>H

Les abréviations sont les suivantes: R<sup>3</sup>H = radioactivité totale en millier de dpm par g de tissu; DA<sup>3</sup>H = dopamine tritiée analysée après séparation sur Dowex de l'éluat alumine; MDI<sup>3</sup>H = 3- et 4-O-méthylidopamine<sup>3</sup>H (fraction II); 3 MDI<sup>3</sup>H = 3-O-méthylidopamine<sup>3</sup>H; 4 MDI<sup>3</sup>H = 4-O-méthylidopamine<sup>3</sup>H (fraction VI, MD). Voir le texte pour les détails. Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne  $\pm$  SEM de *n* déterminations. *n* correspond au nombre de rats. Le prétraitement est effectué 5 h avant l'administration de L-dopa<sup>3</sup>H. Les rats sont sacrifiés 30 min après l'injection de L-dopa<sup>3</sup>H. Pour le lot L-dopa + S-adénosylméthionine (SAM) ces deux produits sont administrés simultanément. Comparaison des moyennes, pour un même tissu, à celles du lot: L-dopa<sup>3</sup>H 1.6 mCi/0.126 mg/kg.

Tissus	Traitement		<i>n</i>	Radioactivité totale R <sup>3</sup> H (dpm 10 <sup>-3</sup> g <sup>-1</sup> )	DA <sup>3</sup> H:R <sup>3</sup> H (%)	MDI <sup>3</sup> H:R <sup>3</sup> H (%)	4 MDI <sup>3</sup> H:3 MDI <sup>3</sup> H (%)
	Prétraitement	L-dopa <sup>3</sup> H					
Cerveau	NaCl 9‰	1.6 mCi/0.126 mg/kg	2	570 $\pm$ 42	7.5 $\pm$ 0.9	0.7 $\pm$ 0.1	0
	Nialamide 100 mg/kg	1.6 mCi/0.126 mg/kg	2	784 $\pm$ 125	4.9 $\pm$ 0.8	13.0 $\pm$ 0.5**	0
Reins	NaCl 9‰	1.6 mCi/0.126 mg/kg	2	6152 $\pm$ 203	2.8 $\pm$ 0.6	4.2 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.1
	Nialamide 100 mg/kg	1.6 mCi/0.126 mg/kg	2	5823 $\pm$ 140	4.5 $\pm$ 0.3	8.9 $\pm$ 0.4*	3.1 $\pm$ 0.2
	non	0.8 mCi/10 mg/kg	6	2278 $\pm$ 130	33.2 $\pm$ 3.1***	5.4 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.2***
	non	0.8 mCi/10 mg/kg + SAM 1 mg/kg	6	2337 $\pm$ 85	33.7 $\pm$ 2.9	5.0 $\pm$ 0.3	5.8 $\pm$ 0.3

\*  $p < 0.05$ .\*\*  $p < 0.01$ .\*\*\*  $p < 0.001$  (test *t* de signification).

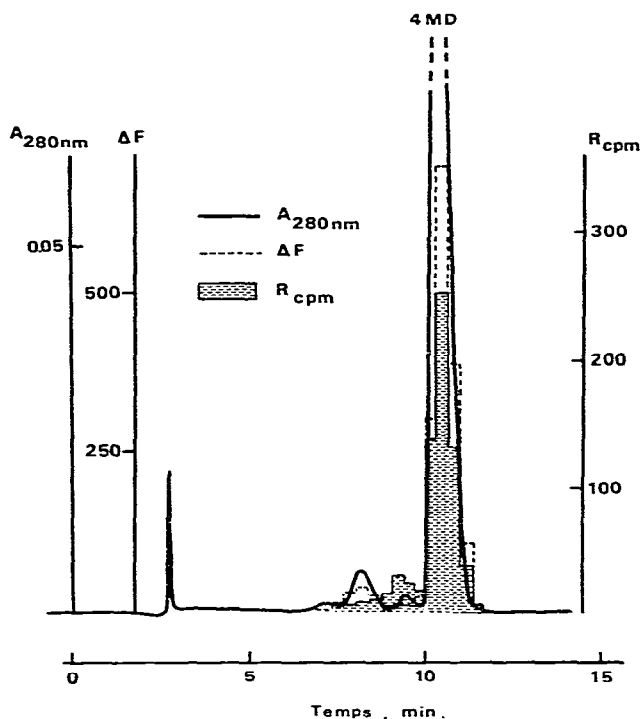


Fig. 2. Chromatogramme HPLC de la fraction  $V_4 MD$ . Les conditions chromatographiques sont décrites dans la légende de la Fig. 1. Échantillon:  $25 \mu\text{l}$  de la fraction  $V_4 MD$  (chromatographie sur couche mince, spot 4 MD). Le volume de cette fraction  $V_4 MD$  est de  $100 \mu\text{l}$ . Elle provient de reins de rats traités par la L-dopa [ $^3\text{H}$ ] 1.6 mCi/0.126 mg/kg. Le sacrifice des rats est fait 30 min plus tard. 400 nmoles de 4 MD sont ajoutés à l'homogénat de reins.  $A_{280\text{nm}}$ : Détection UV à 280 nm; sensibilité DO = 0.1 (pleine échelle).  $\Delta F$ : Mesure fluorimétrique à  $\lambda_e = 270 \text{ nm}$ ;  $\lambda_f = 315 \text{ nm}$  des fractions collectées (20 sec).  $R_{\text{cpm}}$ : Mesure radiochimique des fractions collectées (20 sec).

#### *Influence de la L-dopa et du nialamide sur le taux de 3 MD et de 4 MD dans les reins (Tableau V)*

Sans administration de L-dopa, le taux endogène de 3 MD et de 4 MD dans les reins de rats n'est pas mesurable. Le traitement des rats par une dose de L-dopa voisine de celle en usage dans la maladie de Parkinson est donc doublement justifiée: d'abord, en tant que méthode de mise en évidence de cette 4-O-méthylation de la dopamine, et, ensuite comme modèle pharmacologique. Cette deuxième motivation reste valable lorsque les rats sont prétraités par le nialamide. En effet, Birkmayer et al. [18] estiment que la propriété akinésique de la L-dopa est potentialisée par certains inhibiteurs de la monoamine oxydase du type B spécifique de la dopamine.

La preuve de la formation de 4 MD *in vivo*, dans les reins, après administration de L-dopa, seule ou en présence de nialamide, est apportée dans ce travail pour la première fois. Ainsi, l'analyse HPLC de la fraction III met en évidence 2 pics (Fig. 3). Comparés à des standards, ils présentent toutes les caractéristi-

ques des deux catécholamines O-méthylés recherchées 3 MD et 4 MD:

Temps de rétention

Maximum d'absorption à 280 nm

Maximum de leur spectre de fluorescence directe à  $\lambda_e = 270$  nm et  $\lambda_f = 315$  nm

Spectre de fluorescence et maximum à  $\lambda_e = 327.5$  nm et  $\lambda_f = 375$  nm après dérivation selon une méthode décrite dans des travaux antérieurs [12]

Le recyclage des fractions composant ces pics pour une nouvelle analyse HPLC permet d'affiner l'identification de ces deux métabolites

De plus, après chromatographie sur couche mince, l'analyse HPLC de la fraction V<sub>A</sub> nous permet de retrouver un pic correspondant aux caractéristiques spectrales et de rétention de la 4 MD.

La possibilité d'artefact dans l'identification de la 4 MD a été soigneusement éliminée. Ce métabolite provient bien du traitement à la L-dopa car on ne le retrouve pas chez les témoins. Il ne se forme pas à partir de la 3 MD au cours de la purification comme le démontre un standard interne de 3 MD introduit dans l'homogénat. L'alumine ne le retient pas: ce n'est pas un catéchol. Il est cationique puisqu'il reste fixé sur l'amberlite. Les caractéristiques obtenues

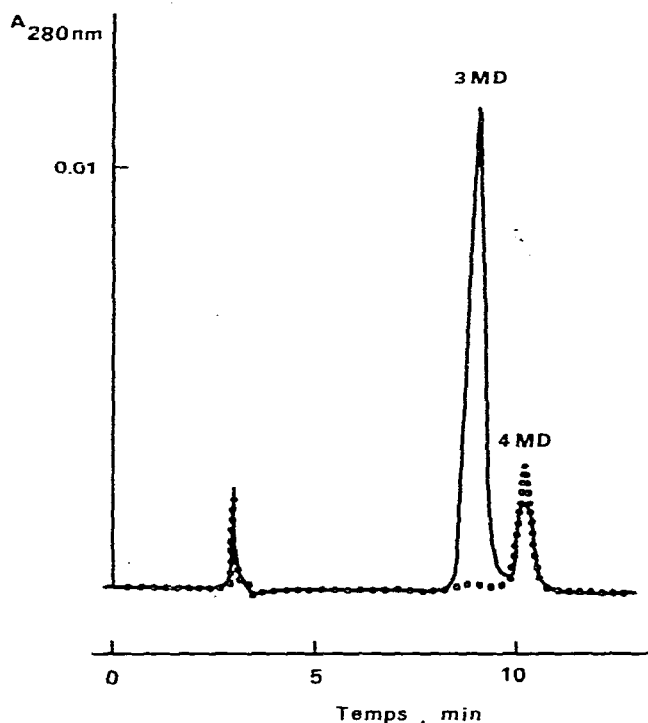


Fig. 3. Chromatogramme HPLC de reins de rats traités par la L-dopa inerte. Les conditions chromatographiques sont décrites dans la légende de la Fig. 1. Sensibilité de la détection UV à 280 nm: 0.02 (pleine échelle). Volume d'échantillon injecté: 5  $\mu$ l; soit 1/40ième de la fraction III (lyophilisat). —: Reins de rat prétraité au nialamide 100 mg/kg, puis cinq heures après par la L-dopa 100 mg/kg. Les animaux sont sacrifiés 30 min après cette dernière injection. •••: Reins de rat témoin en présence d'un standard interne de rendement de 40 nmoles de 4 MD au niveau de l'homogénat.

TABLEAU V

## EFFET DE L'ADMINISTRATION DE L-DOPA ET DE NIALAMIDE SUR LE TAUX DE DA, 3 MD ET 4 MD DANS LE REIN DE RAT

Les rats sont traités par le nialamide 100 mg/kg intrapéritonéal, 5 h avant l'injection de L-dopa. Le sacrifice est effectué 30 min après administration de L-dopa. Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne  $\pm$  SEM de quatre déterminations, une détermination par animal. Les dosages sont réalisés par analyse HPLC. Pour 3 MD et 4 MD on utilise l'éluat amberlite lyophilisé (fraction III) et pour DA l'éluat alumine. Comparaison des moyennes avec le lot: L-dopa 100 mg/kg.

Traitement		DA (nmoles/g)	3 MD (nmoles/g)	4 MD (nmoles/g)	4 MD:3 MD (%)
Prétraitement	L-dopa				
non	50 mg/kg	123.4 $\pm$ 11.3*	5.0 $\pm$ 0.6	N.D.**	N.D.**
non	100 mg/kg	299.4 $\pm$ 24.3	6.5 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.1	8.3 $\pm$ 1.0
Nialamide					
100 mg/kg	100 mg/kg	1044 $\pm$ 39*	56.9 $\pm$ 2.9 *	12.0 $\pm$ 1.2*	21.0 $\pm$ 1.2*

\* $p < 0.001$  (test  $t$  de signification).

\*\*N.D. = non détectable.

par chromatographie sur couche mince et par HPLC, de même que les analyses spectrales, l'identifient à la 4 MD.

Dans le Tableau V, l'effet de la L-dopa et du nialamide est étudié sur le taux de 3 MD et de 4 MD dans les reins de rat. L'administration de L-dopa provoque la formation de 3 MD. Le taux de 4 MD dans les reins est très faible, même par traitement avec 100 mg/kg de L-dopa. Dans ce cas, le rapport 4 MD:3 MD est de 8.3%. Lorsque les animaux sont prétraités avec le nialamide, le taux de 3 MD est multiplié par 9. Cette augmentation était moins forte ( $\times 2$ ) par traitement des rats avec de petites quantités de L-dopa [ $^3\text{H}$ ] (0.126 mg/kg) (cf. Tableau IV). Mais le phénomène remarquable est la modification du rapport 4 MD:3 MD qui atteint 21%.

## DISCUSSION

La séparation de deux phényléthylamines substituées 3 MD et 4 MD par chromatographie liquide en phase inverse, avec une élution par un solvant hydrométhanolique contenant un contre-ion, dépend de la lipophilie du complexe amine-acide heptane sulfonique. Cependant ces deux amines ont un caractère lipophile identique puisque la substitution d'un hydroxyle par un groupement méthoxyle en *mé*ta ou en *para* ne modifie pas la constante fragmentale hydrophobe [19]. Par contre, la constante  $\sigma$  de Hammett du substituant hydroxylé est plus faible que celle du substituant méthoxylé en position *para*, tandis qu'elle est la même pour ces deux substituants en position *mé*ta sur le noyau aromatique des phényléthylamines [20]. La constante  $\sigma_X$  de Hammett correspond à la variation de  $pK$  provoquée par le remplacement, sur le noyau, d'un H par le substituant X. le  $pK$  de la 4 MD sera supérieur à celui de la 3 MD, la dissociation du complexe 4 MD-contre-ion sera plus faible; en conséquence le temps de rétention de la 4 MD est plus important que celui de la 3 MD.

La résolution entre ces deux amines peut être améliorée en réduisant la concentration de méthanol dans la phase mobile (méthanol-eau, 20:80). Toutefois les volumes de rétention augmentent, et la sensibilité de la détection diminue.

Une détection fluorimétrique en continu après dérivation selon la technique précédemment décrite [12], à la sortie de la colonne de  $\mu$ Bondapak améliorerait la sensibilité de la détection.

La présence de 4 MD [ $^3\text{H}$ ] in vivo dans les reins et son absence dans le cerveau permet de penser à un métabolisme différent dans ces deux organes. Les hypothèses suivantes peuvent être formulées:

(1) L'activité catéchol-O-méthyltransférase n'est pas la même du point de vue de la spécificité de l'O-méthylation en position 3 ou 4 de la dopamine, in situ, dans le cerveau ou dans les reins. Cette différenciation n'est pas surprenante si l'on compare nos résultats avec l'étude de ce type d'activité, réalisée par Bade et al. [21], sur le cerveau, les érythrocytes et le foie de rat. Utilisant comme substrat le dihydroxy-3,4 benzaldéhyde, ces auteurs ont montré que le rapport *méta:para* d'O-méthylation et la constante de Michaelis étaient différentes entre d'une part l'enzyme du cerveau et d'autre part l'enzyme du foie.

(2) Le métabolisme de la 4 MD dans le cerveau ou les reins n'est pas le même. Cette différence ne provient pas de la désamination oxydative puisque le traitement par un inhibiteur de la monoamine oxydase ne provoque pas l'apparition de 4 MD dans le cerveau. Dans cet organe, l'absence de 4 MD pourrait résulter d'une élimination rapide de ce métabolite neurotoxique par une voie différente de celle de la 3 MD.

Le traitement des rats par des quantités importantes de L-dopa, après administration de nialamide, provoque une augmentation considérable de la 4-O-méthylation et du rapport 4 MD sur 3 MD dans les reins. Deux hypothèses peuvent être émises sur cette élévation:

(1) L'inhibition de l'activité monoamine oxydase par le nialamide est plus forte vis-à-vis de la 4 MD que pour la 3 MD. Dans la littérature, des différences d'affinité ont été relevées entre les substrats de la monoamine oxydase: à titre d'exemple, la 4 MD est un meilleur substrat que la diméthoxy-3,4 phényléthylamine pour l'enzyme du cerveau de rat [22]. Dans notre expérimentation, le nialamide agirait plus efficacement sur la désamination de l'isomère 4 et conduirait ainsi à un rapport 4 MD:3 MD plus élevé. Cependant, lorsque la L-dopa est administrée à faible dose, la présence de nialamide n'influe pas sur le rapport 4 MD [ $^3\text{H}$ ]:3 MD [ $^3\text{H}$ ] (cf. Tableau IV). Ce résultat rend assez fragile cette première hypothèse.

(2) L'inhibiteur de la monoamine oxydase provoque une accumulation de dopamine ( $\times 3.5$ ) dans les reins. La catéchol-O-méthyltransférase, probablement saturée par ce substrat, accélère alors le mécanisme de 4-O-méthylation. Les résultats obtenus par administration de L-dopa [ $^3\text{H}$ ] sont en faveur de cette hypothèse.

En définitive, il apparaît que la voie de 3-O-méthylation de la dopamine est prépondérante. D'autre part, le rapport 4 MD:3 MD est relativement constant (environ 3.2%) dans des conditions physiologiques. Enfin, par traitement par la L-dopa, ce rapport est modifié au profit de la 4-O-méthylation. Ce phénomène est à rapprocher des travaux de Mathieu et al. [6] qui observent une augmentation du rapport acide isohomovanillique:acide homovanillique dans l'urine de rat. Un hyperfonctionnement de la voie dopaminergique n'est donc pas sans conséquence quant à l'orientation de la méthylation.

La 4 MD ne semble pas provenir de la 4-O-méthyl-dopa car cette dernière

substance n'est pas détectée dans l'urine humaine ou de rat après traitement par la L-dopa [23]. La dopamine pourrait être son précurseur direct. Quelles que soient les conditions pharmacologiques étudiées, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence, la diméthoxy-3,4 phényléthylamine qui serait formée *in vitro* sous l'influence de la gaïacol-O-méthyltransférase [24].

Le rapport acide isohomovanillique:acide homovanillique trouvé dans les tissus est beaucoup plus élevé que celui de 4 MD:3 MD déterminé dans le présent travail. Ceci suggère l'hypothèse de la formation d'acide isohomovanillique par méthylation en 4 de l'acide dihydroxy-3,4 phénylacétique et non pas à partir de la 4 MD par désamination oxydative. Les travaux de Creveling et al. [25] confortent cette hypothèse: *in vitro* à pH physiologique, l'O-méthylation *para/méta* de l'acide dihydroxy-3,4 phénylacétique est supérieure à celle de la dopamine.

L'étude de la formation de 4 MD dans le cerveau, après administration de L-dopa inerte, n'a pas été envisagée par suite du manque de sensibilité de la détection spectrophotométrique. Par contre, notre méthodologie devrait permettre d'étudier la formation de 4 MD[<sup>3</sup>H] dans le cerveau, si toutefois elle existe, en administrant à l'animal de la L-dopa avec une dose traceuse de L-dopa[<sup>3</sup>H].

Le problème de l'existence de ce métabolite 4-O-méthylé chez l'homme n'est pas encore résolu. Néanmoins, une partie de ce travail pourra être adaptée au dépistage de la 4 MD, en particulier, chez les parkinsoniens traités par la L-dopa.

#### REMERCIEMENTS

Cette recherche a été réalisée avec l'aide du CNRS (ERA 560) et de la formation associée de l'INSERM (FRA 5).

#### RÉSUMÉ

La 4-O-méthyl dopamine est identifiée et dosée dans les tissus de rats traités par la L-dopa en utilisant la chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Préalablement, les catécholamines sont séparées sur alumine et résine échangeuse de cation, puis chromatographie sur couche mince.

Après administration de L-dopa[<sup>3</sup>H], le radiochromatogramme est superposé au chromatogramme obtenu par détection fluorimétrique d'un standard interne de 4-O-méthyl dopamine. Ce métabolite est présent dans les reins mais indétectable dans le cerveau.

Le rapport 4-O-méthyl dopamine:3-O-méthyl dopamine est égal à 0.032 dans les reins. L'effet de différents traitements sur ce rapport est étudié. Une augmentation de 160% est déterminée après administration de L-dopa. Cet effet est potentialisé par un prétraitement au nialamide (550% d'augmentation).

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 Cl. Feuerstein, Thèse de Médecine. France Grenoble, 1977.
- 2 L. Peyrin et Y. Dalmaz, *J. Physiol. Paris*, 70 (1975) 353.
- 3 P. Mathieu, J.C. Charvet, G. Chazot et P. Trouillas, *Clin. Chim. Acta*, 41 (1972) 5.
- 4 S. Takahashi, M. Yoshioka, S. Yohiue et Z. Tamura, *J. Chromatogr.*, 145 (1978) 1.
- 5 M. Sandler, dans H. Blaschko et E. Muscholl (Editeur), *Catecholamines*, Vol. XXXIII, *Handbook of Experimental Pharmacology*, 1972, ch. 19, p. 845.
- 6 P. Mathieu, J.C. Charvet et J. Greffe, *Biochem. Pharmacol.*, 24 (1975) 43.
- 7 G. Ebinger et K. Adriaenssens, *Clin. Chim. Acta*, 48 (1973) 427.
- 8 A.M. Ernst, *Psychopharmacol.*, 7 (1965) 383.
- 9 M.F. Spoerlein et C. Vanderwende, *Life Sci.*, 6 (1967) 2029.
- 10 J.N. Bidard, P. Darmenton, L. Cronenberger et H. Pachéco, *J. Pharmacol.*, 8 (1977) 83.
- 11 J.N. Bidard, P. Fonlupt, L. Cronenberger et H. Pachéco, *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 4 (1978) 715.
- 12 J.N. Bidard et L. Cronenberger, *C.R. Acad. Sci., Ser. D*, 284 (1977) 389.
- 13 R.W. Stout, R.J. Michelot, I. Molnar, Cs. Horváth et J.K. Coward, *Anal. Biochem.*, 76 (1976) 330.
- 14 J. Mitchell et C.J. Coscia, *J. Chromatogr.*, 145 (1978) 295.
- 15 F. Schlenk, R. Zydek, D. Ehninger et J.L. Dainko, *Enzymologia*, 29 (1965) 283.
- 16 E. Haid et M. Nelboeck-Hochstetter, *Ger. Offen.* 1,803,978 (C1.C07 d), 27 May 1970, *Appl.* 18 Oct. 1968; *C.A.*, 73 (1970) 63142a.
- 17 T. Karasawa, K. Furukawa, K. Yoshida et M. Shimizu, *Jap. J. Pharmacol.*, 25 (1975) 727.
- 18 W. Birkmayer, P. Riederer, M.B.H. Youdim et W. Linauer, *J. Neur. Transm.*, 36 (1975) 303.
- 19 R.F. Rekker, *The Hydrophobic Fragmental Constant*, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- 20 D.H. McDaniel et H.C. Brown, *J. Org. Chem.*, 23 (1958) 420.
- 21 P. Bade, W. Christ, D. Rakow et H. Coper, *Life Sci.*, 19 (1976) 1833.
- 22 R. Ashkenazi et B. Haber, *Experientia*, 31 (1975) 335.
- 23 P. Mathieu, J. Greffe, D. Deruaz, R. Guilluy et L. Gjessing, *Biochem. Pharmacol.*, 25 (1976) 497.
- 24 A.J. Friedhoff, *Biol. Psychiat.*, 6 (1973) 187.
- 25 C.R. Creveling, N. Morris, H. Shimizu, H.H. Ong et J. Daly, *Mol. Pharmacol.*, 8 (1972) 398.