

Communication

Recherche d'une toxicité du 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde (DOPAL) *in vitro* et *in vivo*

J.-J. Bonnet, H. Legros, Fr. Janin, N. Dourmap, J. Costentin

Résumé. Le but de ce travail était d'évaluer la toxicité du 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde (DOPAL) *in vitro* et *in vivo*. Cet aldéhyde résulte de l'action des monoamine-oxydases (MAO) sur la dopamine (DA) et il est généralement oxydé en acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC) par les aldéhyde déshydrogénases cérébrales (ALDH), ou éventuellement réduit par les aldéhyde/aldose réductases. *In vitro*, des cellules SH-SY5Y ont été incubées avec de la DA et du disulfiram (DSF), un inhibiteur irréversible d'ALDH. Le test MTT révèle qu'un traitement de 24 h avec la DA 10^{-4} M et/ou le DSF 10^{-6} M suivi d'une incubation de 24 h dans un milieu sans réactif se traduit par une potentialisation de l'effet toxique de chacun des réactifs par le second. Des mesures HPLC démontent que cette association induit une formation précoce de DOPAL qui pourrait se traduire par une toxicité cellulaire différée de quelques dizaines d'heures. Pour les essais *in vivo*, des rats mâles Sprague-Dawley ont été traités par la L-DOPA/bensérazide, qui accroît la production de DOPAL par les MAO, et le DSF. Une administration aigue de DSF (100 mg/kg i.p.) et de L-DOPA/bensérazide (100 mg/kg + 25 mg/kg, 24 h plus tard) augmente significativement le taux de DOPAL striatal. Cependant, un traitement de 30 jours par le DSF (100 mg/kg i.p., une fois tous les deux jours) et la L-DOPA/bensérazide (100 mg/kg + 25 mg/kg, deux fois par jour) n'affecte pas deux index de l'intégrité des terminaisons striatales des neurones dopaminergiques (le contenu striatal de DA et la liaison au transporteur vésiculaire présent dans ces terminaisons). Ces résultats ne confortent

Summary. This work was carried out in order to evaluate the *in vitro* and *in vivo* toxicity of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde (DOPAL). This aldehyde is formed from dopamine (DA) by monoamine oxidases (MAO) and is mainly oxidised to 3,4-dihydroxyphenylacetic acid by brain aldehyde dehydrogenases (ALDH), or eventually reduced to 3,4-dihydroxyphenylethanol by aldose/aldehyde reductases. *In vitro*, catecholaminergic SH-SY5Y cells were incubated with DA and disulfiram (DSF), an irreversible inhibitor of ALDH. As evidenced by MTT assays, a 24-h treatment with 10^{-4} M DA and/or 10^{-6} M DSF followed by a 24-h incubation in a drug-free medium evidenced that the toxicity of each of these drugs was potentiated by the second drug. HPLC measurements demonstrated that this drug association induced an early DOPAL production that could result in a delayed cell toxicity. For *in vivo* studies, male Sprague-Dawley rats were treated with L-DOPA-benserazide, which increases the production of DOPAL by MAO, and DSF. An acute injection of DSF (100mg/kg i.p.) and L-DOPA/benserazide (100mg/kg+25mg/kg, 24h later) significantly increased the DOPAL striatal level. However, a 30-day treatment with DSF (100mg/kg i.p., once every two days) and L-DOPA/benserazide (100mg/kg+25mg/kg, twice a day) did not affect both indexes used to assess the integrity of the nigro-striatal dopaminergic terminals (i.e. the striatal content in DA and the binding to the vesicular monoamine transporter on striatal membranes). These results do not support the hypothesis of a DOPAL toxicity and argue against the toxicity of L-DOPA therapy.

Unité de Neuropsychopharmacologie Expérimentale, FRE2735 CNRS, IFRMP N° 23, 22 Boulevard Gambetta, F76183 Rouen Cedex.
Présentation devant l'Académie nationale de pharmacie, séance du 17 mars 2004 délocalisée à Rouen.

Tirés à part : J.-J. Bonnet, à l'adresse ci-dessus.

E-mail : neuro.psyphar@univ-rouen.fr

pas l'hypothèse d'une toxicité du DOPAL et vont à l'encontre d'une toxicité de la L-DOPA.

Mots-clés : 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde, Aldéhyde déshydrogénases cérébrales, Toxicité, Cellules SH-SY5Y, Rats.

Key-words: 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde, Brain aldehyde dehydrogenases, Toxicity, SH-SY5Y cells, Rats.

Assessment of the in vitro and in vivo toxicity of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde (DOPAL). J.-J. Bonnet, H. Legros, Fr. Janin, N. Dourmap, J. Costentin. *Ann Pharm Fr* 2004, 62 : 323-331

Introduction

Quelques études *in vitro* suggèrent que le 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde (DOPAL) pourrait être toxique pour les neurones dopaminergiques [1-4]. Cet aldéhyde résulte de l'action des monoamines oxydases (MAO) sur la dopamine (DA) ; au niveau cérébral, il est rapidement oxydé en acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC) par des aldéhyde déshydrogénases (ALDH), mais il peut aussi, pour une faible part, être réduit en 3,4-dihydroxyphényléthanol (DOPET) par des aldose/aldéhyde réductases [2]. Le DOPAL pourrait être une neurotoxine endogène, puisque sa forte réactivité peut affecter l'intégrité cellulaire : il peut alkyler les thiols et fonctions amines des protéines et/ou acides nucléiques, et se condenser avec la DA elle-même pour former des dérivés dont certains sont toxiques [5]. De plus, le DOPAL peut former des radicaux OH⁻ à partir du H₂O₂ produit par les MAO [6] et il peut accroître la toxicité résultant d'une inhibition du métabolisme cellulaire de base [2].

Les neurones dopaminergiques seraient une cible privilégiée de cette toxicité puisque, dans le striatum de Rat (aire cérébrale correspondant au Caudé et au Putamen chez l'Homme), le métabolisme de la DA résulte, quasi exclusivement, de l'activité MAO A présente dans leurs terminaisons, y compris lorsque celles-ci se raréfient et à la suite d'un traitement par la L-DOPA, conditions qui sont celles que l'on rencontre chez le Parkinsonien [7, 8].

Le but de ce travail était donc d'évaluer la toxicité du DOPAL *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, nous avons utilisé une lignée de neuroblastome humain présentant des propriétés des neurones catécholaminergiques, les cellules SH-SY5Y, dont la sensibilité aux toxines affectant les neurones dopaminergiques a été décrite [9]. Après avoir

vérifié qu'elles étaient capables d'accumuler la DA contenue dans le milieu d'incubation, nous avons favorisé l'accumulation du DOPAL dans ces cellules en réduisant l'activité ALDH avec le disulfirame (DSF), un inhibiteur irréversible, efficace *in vitro* et *in vivo* [10]. *In vivo*, des rats ont été soumis à un traitement de 30 jours associant L-DOPA/bensérazide à un blocage de certaines ALDH cérébrales par le DSF. Cette association reproduit la situation dans laquelle le malade traité par la L-DOPA a une activité ALDH déprimée ; ainsi, un déficit génétique rend inopérante l'ALDH2 cérébrale chez environ 50 % des asiatiques [11], et une réduction de l'activité ALDH cérébrale est observée chez les patients traités, par exemple, par le DSF utilisé comme agent antidipsotrope (Antabuse®, Espéral®), par des anticancéreux de la famille des oxazaphosphorines, ou différents sulfamides hypoglycémisants. L'intégrité des terminaisons dopaminergiques striatales a été estimée *ex vivo*, en mesurant le contenu en DA et la liaison de dihydrotétrabénazine tritiée (TBZOH) sur le transporteur présent dans la membrane des vésicules synaptiques contenues dans ces terminaisons. Ces deux mesures sont connues pour être de bons index d'une destruction des terminaisons dopaminergiques striatales [12, 13].

Matériels et méthodes

Les cellules SH-SY5Y (numéro ECACC 9403304), fournies par A. Koulakoff du Collège de France, ont été cultivées dans un milieu de Eagle modifié par Dulbecco contenant de la L-glutamine et additionné de 10 % de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, 100 µg/ml de streptomycine et 100 UI/ml de pénicilline. Les cultures étaient

Toxicité du DOPAL *in vitro* et *in vivo*

maintenues à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂.

Essais de toxicité *in vitro*

Ces essais ont été menés sur des cellules en culture depuis deux jours. Les SH-SY5Y ont été incubées 24 h à 37 °C (en présence de 5 % CO₂) dans du milieu de culture frais contenant la DA ou le DSF dissout dans le même milieu. La viabilité cellulaire a été évaluée par le test du 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5 diphényltétrazolium (MTT) [14], soit immédiatement, soit après 24 h de remise en culture dans du milieu neuf. Les données sont exprimées en absorbance à 570 nm diminuée du bruit de fond à 630 nm.

Techniques d'HPLC appliquées aux cultures cellulaires

Les dosages ont été réalisés sur des cultures à 80 % de confluence dans des boîtes de 10 cm de diamètre. Les cellules étaient incubées à 37 °C dans 10 ml de milieu de culture contenant la DA et/ou le DSF. À la fin de cette incubation, le milieu a été aspiré, filtré (0,45 µm) et injecté (20 µl) dans le système HPLC. Les cellules ont été rapidement rincées deux fois avec 15 ml de milieu PBS stérile [NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 0,1 mM (pH 7,4)], puis décollées et centrifugées (3 000 rpm × 5 mn). Après élimination du surnageant, les cellules ont été remises en suspension dans une solution de 0,1 % de cystéine dans l'acide perchlorique 0,1 N. La suspension était lysée par sonication et centrifugée (10 000 g × 10 mn) afin de recueillir le surnageant qui était filtré puis injecté dans le système HPLC. Tous les échantillons étaient maintenus à 4 °C avant d'être analysés rapidement. La détermination des concentrations de DA et de ses métabolites reprend un protocole déjà décrit [15], à l'exception de la composition de la phase mobile qui était constituée dans la présente étude de KH₂PO₄ 88 mM, méthanol 1 %, EDTA 0,5 mM et de pic B7 2,1 % (Waters).

La concentration de protéine a été déterminée par la méthode de Lowry *et al.* [16]. Dans ce cas, la solution de 0,1 % de cystéine dans l'acide perchlorique 0,1 N était remplacée par un même volume de NaOH 0,1 N.

HPLC appliquée à la détermination du taux de DA *ex vivo*

Pour ces études, les striatas des rats ont été prélevés rapidement selon la méthode de Glowinski et Iversen [17], puis homogénéisés par sonication dans 5 volumes (pds/vol) d'une solution glacée de 0,1 % de cystéine dans l'acide perchlorique 0,1 N. Les homogénats ont été centrifugés (10 000 g × 10 mn) et le surnageant filtré avant d'être congelé à -80 °C jusqu'au moment du dosage. Le protocole de dosage décrit plus haut a été repris avec une phase mobile contenant KH₂PO₄ 88 mM, méthanol 1 %, EDTA 0,5 mM et de l'acide heptane sulfonique 6,4 mM.

Préparations du DOPAL et du DOPET

Ces produits ont été synthétisés pour servir de référence en HPLC. Le DOPAL a été préparé extemporanément, par désamination oxydative de la DA par la MAO, selon la méthode de Colzi *et al.* [18] modifiée [12]. Le spectre de masse du produit obtenu a confirmé la nature du DOPAL. Les concentrations de DOPAL ont été calculées selon Colzi *et al.* [18]. Le DOPET a été synthétisé et purifié selon la méthode de Baraldi *et al.* [19].

Liaison de TBZOH

Les striatas de rats ont été homogénéisés dans un homogénéisateur verre Téflon (Potter-Elvehjem, clairance 80-130 µm) contenant 10 volumes d'un milieu glacé contenant du saccharose 0,3 M et de l'HEPES 20 mM (pH 8 avec NaOH). L'homogénat était ensuite soniqué pour donner une préparation membranaire qui a été congelée à -80 °C jusqu'au moment de son utilisation. Le protocole de liaison reprend celui qui est décrit par ailleurs [15].

Animaux. Des rats mâles Sprague Dawley de 200-250 g ont été utilisés. Les conditions de stabulation et de traitement étaient en accord avec la directive 86/609/EEC du Conseil de la Communauté européenne.

Activité ALDH

Les striatas et les cortex cérébraux ont été homogénéisés dans un homogénéisateur verre Téflon contenant 10 volumes (pds/vol) d'un milieu glacé contenant du saccharose 0,25 M, EDTA 0,5 mM, Tris base 2 mM et Tris chlorhydrate

8 mM (pH 7,4). L'homogénat était ensuite centrifugé (13 000 g × 15 mn) et le culot remis en suspension dans le même milieu contenant du désoxycholate de sodium 0,25 %, immédiatement avant l'essai. L'activité ALDH a été déterminée dans un milieu pyrophosphate de sodium 10 mM (pH 9,6) contenant NAD⁺ 1 mM, pyrazole 1 mM (pour éviter la réduction du NAD⁺ par les alcool déshydrogénases), roténone 2 µM (pour prévenir l'oxydation du NADH, H⁺), et la préparation tissulaire. Après une incubation de 30 mn à 25 °C, la réaction est lancée par addition du substrat, le propionaldéhyde (concentration finale 50 µM). L'activité ALDH est mesurée par fluorimétrie grâce à la formation de NADH, H⁺ (spectrofluorimètre SFM-23 Kontron ; excitation 340 nm, émission 450 nm).

Résultats

Recherche d'une toxicité du DOPAL *in vitro*

La toxicité de la DA ou du DSF pour les cellules SH-SY5Y croît avec la durée de l'incubation : la concentration létale 50 % (CL₅₀) de la DA qui est supérieure à 1 mM après 1 h d'incubation est de l'ordre de 70 µM après 24 h. La toxicité du DSF est plus forte : sa CL₅₀ passe de 80 à 1 µM dans ces conditions.

Ces éléments connus, nous avons cherché des conditions expérimentales susceptibles d'engendrer une potentialisation des effets toxiques de chacun des deux réactifs. Une incubation des cellules durant 24 h en présence de DSF 10⁻⁶ M ou de DA 10⁻⁴ M baisse leur vitalité de l'ordre de 20 à 30 % (tableau I) ; la présence conjointe des deux réactifs ne se traduit pas par une potentialisation significative ; cependant, lorsque les cellules sont remises en culture à 37 °C pendant 24 h dans un milieu de culture dépourvu de réactifs, les effets toxiques de la DA et du DSF appliqués isolément sont significativement potentialisés par le second réactif (tableau I). Les mêmes essais réalisés avec le DSF 3.10⁻⁷ M ne produisent pas de potentialisation significative.

Une étude d'HPLC réalisée afin de savoir si une augmentation de la production de DOPAL pouvait expliquer cette potentialisation, montre que la DA et ses métabolites ne sont pas détectables

Tableau I. — Effets de l'association de la dopamine et du disulfirame sur la viabilité des cellules SH-SY5Y.

Deux jours après répartition dans les puits, les cellules sont débarrassées du milieu de culture qui est remplacé par 1 ml de milieu de culture neuf contenant la DA 10⁻⁴ M ou/et le DSF 10⁻⁶ M. Elles sont incubées 24 h à 37 °C en présence de 5 % CO₂ et des réactifs. Leur viabilité est appréciée soit à l'issue de cette incubation, soit après 24 h de remise en culture dans du milieu neuf (test MTT après deux rinçages avec du milieu PBS). Les résultats sont exprimés en absorbance (DO_{570 nm} - DO_{630 nm}) et correspondent à la moyenne ± S.E.M. de 3 à 6 essais réalisés en quatre exemplaires. L'inhibition de l'ALDH par le DSF ne modifie pas les résultats du test MTT. *Effect of a combined treatment with DA and DSF on SH-SY5Y viability. Two days after cell plating, the culture medium was replaced by 1 ml of fresh culture medium containing DA 10⁻⁴ M and/or DSF 10⁻⁶ M, and cells were incubated at 37 °C (5% CO₂) during 24 h. Their viability was assessed either at the end of this incubation or after culture in a drug-free culture medium for 24 h (MTT test after two rinses with PBS). Results are expressed as absorbances (OD_{570 nm} - OD_{630 nm}) and correspond to means ± S.E.M. of three-six experiments. The only inhibition of ALDH by DSF did not change results of the MTT test.*

Milieu d'incubation	Absorbance à l'issue d'une incubation de 24 h	Absorbance après 24 h de remise en culture
contrôle	287 ± 16	609 ± 42
Dopamine 10 ⁻⁴ M	199 ± 13	427 ± 36
Disulfirame 10 ⁻⁶ M	232 ± 14	475 ± 38
Dopamine + disulfirame	124 ± 14 ¹	231 ± 22 ²

¹ pas d'interaction significative entre les traitements DA et DSF (F (1,20) = 3,04 ; p = 0,10 ; ANOVA à deux facteurs).

² interaction significative entre les traitements DA et DSF (F (1,20) = 4,678 ; p < 0,05) ; un test post-hoc de Newman-Keuls indique que les effets significatifs de la DA (p < 0,01) et du DSF (p < 0,05) seuls sont significativement potentialisés par la présence du second réactif (p < 0,001 dans chacun des cas).

¹ no significant interaction between treatments (F (1,20) = 3.04 ; p = 0.10 ; two-way ANOVA).

² significant interaction between treatments (F (1,20) = 4.678, p < 0.05) ; a Newman-Keuls post-hoc test indicates that the significant effects of DA (p < 0.01) and DSF alone (p < 0.05) were potentiated by the presence of the second drug (p < 0.001 in both cases).

après une incubation des SH-SY5Y dans du milieu de culture seul ou le DSF 10⁻⁶ M. Le DOPAL, le DOPET et le DOPAC apparaissent à la suite d'une incubation de 3 h en présence de DA 10⁻⁴ M (fig. 1). Dans ces conditions, une inhibition des ALDH par le DSF induit une augmentation significative (P < 0,01) du rapport (DOPAL + DOPET)/DOPAC. Par contre, après 15 h d'incubation, la concentration de DA et la production de DOPAL sont réduites de 85-90 % (fig. 1).

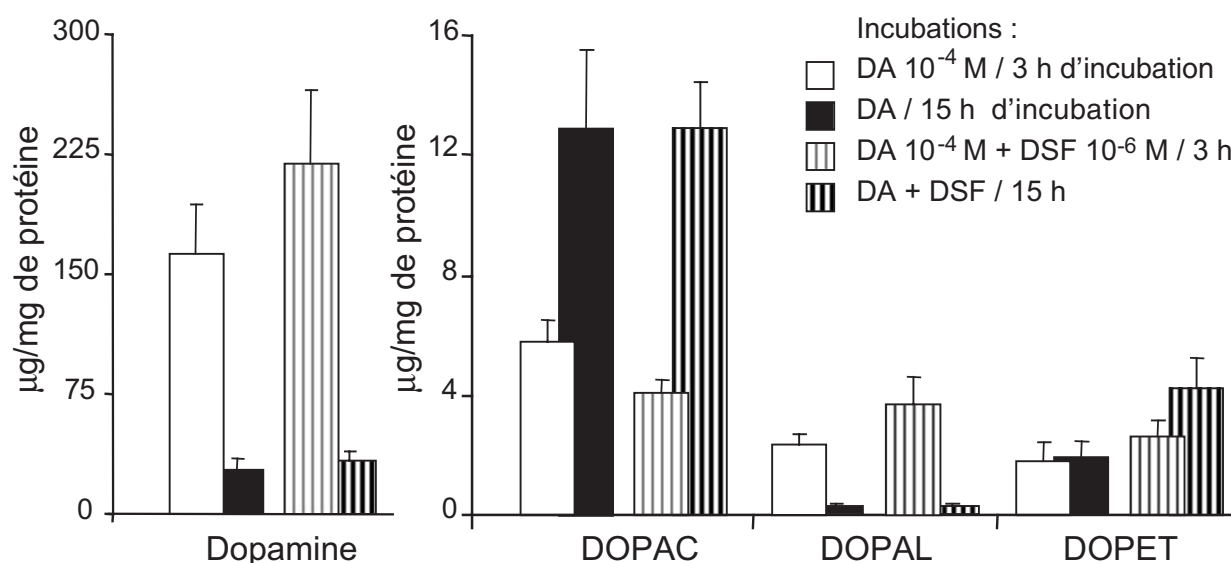


Figure 1. Effet d'une incubation des cellules SH-SY5Y en présence de dopamine 10^{-4} M et/ou disulfirame 10^{-6} M sur leur production de métabolites de la dopamine.

Les cellules cultivées dans des boîtes de 10 cm de diamètre ont été incubées à 37 °C pendant 3 h ou 15 h dans 10 ml de milieu de culture contenant la DA 10^{-4} M et parfois le DSF 10^{-6} M. Les valeurs correspondent à la quantité totale de DA et métabolites contenue dans les boîtes en fin d'incubation. Les données présentées sont des moyennes $\pm$ S.E.M. de trois à six essais.

Effect of a combined treatment with 10^{-4} M DA and 10^{-6} M DSF on the formation of DA metabolites by SH-SY5Y cells. Cell cultures (in 10cm dishes) were treated at 37°C for 3h or 15h in 10ml of culture medium containing 10^{-4} M DA and 10^{-6} M DSF when necessary. Values correspond to the total amounts of DA and metabolites contained in dishes at the end of the incubation. Data presented are means $\pm$ S.E.M. of three-six experiments.

Préliminaire à l'étude *in vivo*

Nous avons d'abord évalué la capacité du DSF à bloquer l'activité ALDH *in vivo*. L'administration intrapéritonéale (i.p.) de DSF 100 mg/kg provoque une inhibition biphasique de l'activité ALDH mesurée *ex vivo* (fig. 2) ; cette inhibition culmine 12 heures environ après l'injection et décroît ensuite lentement pour ne plus différer significativement de l'activité contrôle au troisième jour (fig. 2). Une dose de DSF supérieure (150 mg/kg) produisait des manifestations de toxicité à cours terme.

Nous avons ensuite mesuré le taux de DA et de ses métabolites dans le striatum de rat à l'issue d'un traitement aigu visant à augmenter la production de DOPAL dans le SNC (tableau II). Le traitement par le DSF seul (100 mg/kg, i.p., 24 h avant le sacrifice) ne modifie pas la concentration de ces composés relativement à un traitement par le solvant [solution aqueuse de carboxyméthylcellulose à 1 %, (CMC1 %)]. Par contre, une injection de L-DOPA/bensérazide (100 + 25 mg/kg, i.p., 1 h

avant le sacrifice) augmente sensiblement les taux de DA et de DOPAC ; le DOPET devient mesurable dans ces conditions, mais la concentration de DOPAL n'est pas affectée. Un traitement combiné par les deux réactifs produit quant à lui une augmentation significative de la concentration de DOPAL et de DOPET (fig. 2). La production de DOPAL augmente donc fortement à la suite d'un traitement par la L-DOPA/bensérazide, et l'augmentation de sa fraction libre, bien que difficile à obtenir, est accompagnée par un accroissement du taux de DOPET.

Recherche d'une toxicité du DOPAL *in vivo*

Cette recherche a été effectuée 10 jours après la fin d'un traitement au cours duquel les rats ont reçu deux injections quotidiennes de L-DOPA/bensérazide (100 + 25 mg/kg) pendant 30 jours ou/et une injection de DSF 100 mg/kg les deux premiers jours puis une injection tous les deux jours jusqu'au trentième jour. Des injections de solvant (CMC1 %) ont été pratiquées au même rythme chez les contrôles.

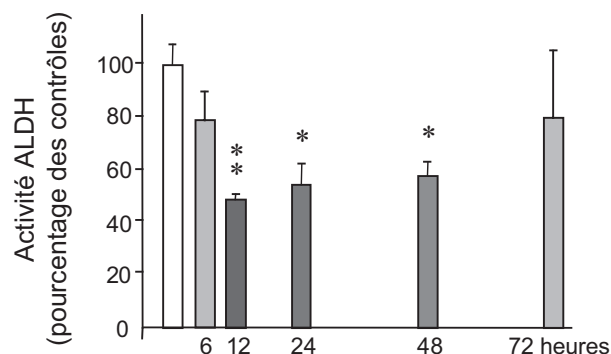


Figure 2. Cinétique de l'inhibition de l'activité ALDH cérébrale de forte affinité à la suite d'une injection de disulfirame chez le rat.

Les rats ont reçu une injection i.p. de DSF (100 mg/kg) et ont été sacrifiés 6, 12, 24, 48 ou 72 h plus tard. L'activité ALDH a été évaluée sur des préparations obtenues à partir des striates et des cortex cérébraux. L'histogramme de référence correspond à l'activité ALDH des contrôles qui s'élevait à $0,177 \pm 0,024$ nmoles de NADH /min/mg de protéine. Les données sont les moyennes de trois ou quatre essais réalisés en triples exemplaires. Les résultats ont été comparés par analyse de variance suivie d'un test de Tukey post-hoc : ** $p < 0,001$, et * $p < 0,01$ comparé aux contrôles.

Effect of a DSF treatment on the brain low-Km ALDH activity in rats.

*Rats were treated i.p. with DSF 100mg/kg and they were sacrificed 6, 12, 24, 48 or 72h later. ALDH activity was studied on preparations obtained from striatum and cerebral cortex. The control histogram corresponds to 0.177 ± 0.024 nmoles of NADH/min/mg of protein. Data are means $\pm$ SEM of 3-4 experiments performed in triplicate. Results were compared using a one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey's test. ** $p < 0.001$; * $p < 0.01$ when compared to controls.*

Aucune variation de la liaison de TBZOH tri-tiée au transporteur vésiculaire n'est observée à la suite des différents traitements. La liaison aux préparations de membranes striatales obtenues à partir des rats traités par la L-DOPA/bensérazide, le DSF ou les deux agents combinés représente $106 \pm 6 \%$, $100 \pm 8 \%$ et $101 \pm 9 \%$ de la liaison mesurée à partir des animaux contrôles. Une analyse de variance à deux facteurs ne révèle aucune interaction entre les traitements ($F(1,26) = 0,137$; $P > 0,05$). Des résultats du même ordre sont obtenus pour la DA striatale : sa concentration représente $101 \pm 7 \%$, $95 \pm 6 \%$ et $105 \pm 12 \%$ dans les lots L-DOPA/bensérazide, DSF et L-DOPA/bensérazide + DSF relativement à celle qui est mesurée chez les animaux contrôles. L'analyse de variance ne décèle aucune interaction entre les traitements ($F(1,26) = 0,203$; $P > 0,05$).

Discussion

La toxicité de la DA pour les cellules SH-SY5Y se manifeste pour des concentrations relativement élevées. Les résultats obtenus ici à l'issue d'une incubation de 24 heures sont cohérents avec ceux de Lai et Yu [20] ; ce type cellulaire est cependant assez sensible à la toxicité de la DA puisque sa CL_{50} sur d'autres lignées cellulaires est plus élevée (de l'ordre de 0,2 – 0,5 mM) dans les mêmes conditions expérimentales [9, 21, 22].

La DA exerce une toxicité au travers de cibles mal définies ; ses récepteurs ne semblent pas impliqués [23, 24] mais sa capacité à entrer dans les cellules serait un facteur aggravant [25-27]. Par contre, son métabolisme, dans ou hors des neurones, génère un grand nombre de composés toxiques ; radicaux oxygénés ($OH^\cdot$, H_2O_2), dérivés (6-OHDA, DOPAL) et produits de condensation (tétrahydropapavérolines, quinones) [1, 4, 5].

La toxicité du DSF provient de sa capacité, ou de celle de ses dérivés, à se lier de manière covalente aux groupements -SH des cystéines, inactivant ainsi une diversité considérable de protéines, y compris certaines de celles qui interviennent dans la détoxification des produits du métabolisme de la DA [12, 28]. Cette propriété est aussi à l'origine de son activité sur certaines des ALDH cérébrales.

Pour des cellules SH-SY5Y incubées en présence de DA, le blocage d'une partie de l'activité ALDH par le DSF produit une augmentation des concentrations de DOPAL et de DOPET (fig. 1). Ceci est valable pour autant que l'incubation soit relativement brève, puisque après 15 h d'incubation, le taux de DA a fortement chuté, vraisemblablement à la suite de son auto-oxydation. On peut admettre que la présence conjointe de DA et de DSF augmente précocement la production et l'accumulation de DOPAL, ce qui entraînera, plusieurs dizaines d'heures plus tard, une mort cellulaire. Différentes interactions entre les deux réactifs, ou leurs dérivés, peuvent expliquer la potentialisation de la mort cellulaire qu'ils provoquent conjointement. Ainsi, le DSF peut réduire, directement ou non, le stock de glutathion [12] qui participe grandement à la capacité des cellules à résister au stress oxydatif résultant de l'oxydation de la DA [23]. Par ailleurs, la réduction de la

Toxicité du DOPAL *in vitro* et *in vivo*

Tableau II. — Effets d'un traitement aigu par le disulfirame ou/et la L-DOPA/bensérazide sur le contenu striatal en dopamine et ses métabolites chez le rat.

Les animaux ont été traités par le DSF (100 mg/kg, i.p.) ou le solvant (CMC 1 %), et/ou, 24 heures plus tard, par L-DOPA/bensérazide (100 + 25 mg/kg, i.p.) ou le même solvant une heure avant d'être sacrifiés. La concentration striatale en DA, DOPAC, DOPAL et DOPET est mesurée immédiatement par H.P.L.C. Les données correspondent à des moyennes $\pm$ S.E.M. de 3 à 6 rats par lot.

Effect of an acute treatment with DSF and/or L-DOPA-benserazide on rat striatal content of DA and derivatives.

Rats were treated with DSF (100 mg/kg, i.p.) or vehicle. (1% CMC in water), and/or, 24 h later, by L-DOPA-benserazide (100 + 25 mg/kg, i.p.) or vehicle (1% CMC) 1 h before sacrifice. Striatal levels of DA, DOPAC, DOPAL and DOPET were immediately measured by HPLC. Data are means $\pm$ SEM of 3-6 rats per group.

Traitement	concentration striatale (ng/mg de protéine) de			
	dopamine	DOPAC	DOPAL	DOPET
Contrôle	94 $\pm$ 5	11,8 $\pm$ 1,4	0,54 $\pm$ 0,09	n.d.
Disulfirame 100 mg/kg	97 $\pm$ 2,5	11,1 $\pm$ 0,8	0,81 $\pm$ 0,12	n.d.
L-DOPA/bensérazide (100 + 25 mg/kg)	307 $\pm$ 22 ¹	216 $\pm$ 14 ¹	0,71 $\pm$ 0,08	0,25 $\pm$ 0,06
L-DOPA/bensérazide + disulfirame	322 $\pm$ 41	244 $\pm$ 39	1,89 $\pm$ 0,20 ²	1,78 $\pm$ 0,38 ³

¹ Le traitement par L-DOPA/bensérazide induit une augmentation significative du taux de DA ($P < 0,001$) et de DOPAC ($P < 0,001$) (après traitement ou non par le DSF : ANOVA à deux facteurs).

² interaction significative entre les traitements DSF et L-DOPA/bensérazide ($F(1,16) = 9,43$ $p < 0,01$; ANOVA à deux facteurs) ; un test post-hoc de Tukey indique que les effets non significatifs des traitements L-DOPA/bensérazide ($P = 0,43$) et DSF seuls ($P = 0,28$) sur le taux de DOPAL sont significativement potentialisés par le second traitement ($P < 0,001$ dans chacun des cas).

³ significativement différent du lot L-DOPA/bensérazide ($P < 0,01$). n.d. non détecté.

¹ *The treatment by L-DOPA/benserazide significantly increased DA ($P < 0.001$) and DOPAC contents ($P < 0.001$) (two-way ANOVA).*

² *significant interaction between DSF and L-DOPA/benserazide treatments ($F(1,16) = 9.43$ $p < 0.01$; two-way ANOVA); a Tukey post-hoc test indicates that the non significant effects of L-DOPA/benserazide ($P = 0.43$) and DSF treatments ($P = 0.28$) on the DOPAL level were potentiated by the presence of the second drug ($p < 0.001$ in both cases).*

³ *significantly different from L-DOPA/benserazide ($P < 0.01$). n.d. not detected.*

fonction mitochondriale par le DSF pourrait être potentialisée par le DOPAL [4-12] et la DA.

Il est difficile de savoir quelles sont les ALDH cérébrales qui oxydent effectivement le DOPAL. En fonction de leur spécificité, ce pourrait être les ALDH 1, 2 et 3 [29] mais seule l'ALDH2 serait présente dans le cerveau humain [30]. Cette ALDH est principalement mitochondriale, aussi bien chez le rat que chez l'homme [31], et elle constitue vraisemblablement une partie de l'activité ALDH centrale de forte affinité pour le DOPAL et sensible au DSF [10, 32]. Néanmoins, un blocage de cette activité de l'ordre de 50 % n'induit pas de réduction de la concentration de DOPAC, même s'il provoque une augmentation significative des taux de DOPAL et DOPET (tableau II). Il faut donc admettre que l'oxydation du DOPAL pourrait ne requérir qu'une petite fraction de l'activité ALDH sensible au DSF et/ou mettre en jeu une forme d'ALDH insensible au

DSF. Si les ALDH cérébrales humaines ont un comportement similaire, il est peu probable qu'un déficit génétique ou un traitement pharmacologique puisse bloquer efficacement l'oxydation du DOPAL.

In vivo, un traitement aigu par L-DOPA/bensérazide augmente le taux de DA et de DOPAC sans affecter la celui du DOPAL (tableau II). Ce résultat, comme l'absence d'effet du DSF sur le taux de DOPAL et DOPAC, va dans le sens d'une non saturation de l'activité ALDH cérébrale dans ces conditions. Cela veut dire aussi que différents processus réduisent la concentration de DOPAL produit par les MAO pour des concentrations physiologiques de DA. Le premier de ceux-ci pourrait être l'oxydation en DOPAC, et le deuxième, la formation de DOPET ; celui-ci devient détectable chez les animaux traités par L-DOPA/bensérazide et sa concentration croît à la suite d'un traitement combiné avec le DSF

(tableau II). Les aldéhyde/aldose réductases réduiraient donc le DOPAL quand sa concentration augmente ; de fait, les essais *in vitro* montrent que le DOPET augmente quand l'oxydation du DOPAL est réduite, et que la production de DOPET semble maximum en début d'incubation (fig. 1), quand la production de DOPAL est la plus forte (voir aussi [2]). Cette production de DOPET est importante puisqu'il pourrait être antioxydant [33]. Le troisième processus pourrait être la sortie du DOPAL hors des neurones dopaminergiques. La capacité du DOPET à diffuser rapidement au travers des membranes [33], sa similitude structurale avec le DOPAL et leur commune absence de radical polaire, font qu'il est vraisemblable que DOPAL et DOPET puissent rapidement diffuser hors des neurones dopaminergiques. De plus, le DOPAL peut également sortir de ces neurones par l'intermédiaire du transporteur plasmique de la DA [1].

La maladie de Parkinson qui serait associée à un stress oxydatif et une dysfonction mitochondriale [34, 35] pourrait magnifier la toxicité du DOPAL, d'autant plus que le traitement par la L-DOPA intensifie sa production par des neurones survivants plus actifs [36]. Nos résultats vont à l'encontre de cette hypothèse, et ils sont en cela cohérents avec l'ensemble des travaux précédents [37], certains d'entre eux suggérant même que la L-DOPA pourrait avoir un rôle trophique [13, 38].

En conclusion, si les résultats obtenus *in vitro* ne permettent pas d'écarter une relation entre une production précoce de DOPAL par les SH-SY5Y et une toxicité différée, il semble que, *in vivo*, différents mécanismes soient capables de réduire la concentration du DOPAL formé ; dans ces conditions, la formation accrue et répétée de DOPAL ne semble pas toxique pour les neurones dopaminergiques. Il est possible, comme pour la L-DOPA, que des facteurs neurotrophiques contrecarrent une possible toxicité du DOPAL [39]. Ces données montrent les limites des modèles *in vitro* et soulignent la pertinence de modèles plus intégrés.

Références

1. Mattamall MB, Haring JH, Chung HD *et al.* An endogenous dopaminergic neurotoxin: implication for Parkinson's disease. *Neurodegeneration* 1995; 4: 271-81.
2. Lamensdorf I, Eisenhofer G, Harvey-White J *et al.* 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde potentiates the toxic effects of metabolic stress in PC12 cells. *Brain Res* 2000; 868: 191-201.
3. Lamensdorf I, Eisenhofer G, Harvey-White J *et al.* Metabolic stress in PC12 cells induces the formation of the endogenous dopaminergic neurotoxin, 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde. *J Neurosci Res* 2000; 60: 552-8.
4. Kristal BS, Conway AD, Brown AM *et al.* Selective dopaminergic vulnerability: 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde targets mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 924-31.
5. Storch A, Ott S, Hwang Y-I *et al.* Selective dopaminergic neurotoxicity of isoquinoline derivatives related to Parkinson's disease: studies using heterologous expression systems of the dopamine transporter. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 909-20.
6. Li SW, Lin TS, Menteer S, Burke WJ. 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde and hydrogen peroxide generate a hydroxyl radical: possible role in Parkinson's disease pathogenesis. *Mol Brain Res* 2001; 93: 1-7.
7. Wachtel SR, Abercrombie ED. L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dopamine release in the striatum of intact and 6-hydroxydopamine treated rats; differential effects of monoamine oxidase A and B inhibitors. *J Neurochem* 1994; 63: 108-17.
8. Fornai F, Giorgi FS, Bassi L *et al.* Modulation of dihydroxyphenylacetaldehyde extracellular levels in vivo in the rat striatum after different kinds of pharmacological treatment. *Brain Res* 2000; 861: 126-34.
9. Stokes AH, Lewis DY, Lash LH *et al.* Dopamine toxicity in neuroblastoma cells: role of glutathione depletion by L-BSO and apoptosis. *Brain Res* 2000; 858: 1-8.
10. Hellström E, Tottmar O. Effects of aldehyde dehydrogenase inhibitors on enzymes involved in the metabolism of biogenic aldehydes in rat liver and brain. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 3899-905.
11. Nomura F, Itoga S, Tamura M *et al.* Biological markers of alcoholism with respect to genotypes of low-Km aldehyde dehydrogenase (ALDH2) in Japanese subjects. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 30S-33S.
12. Legros H, Janin F, Dourmap N *et al.* Semi-chronic increase in striatal level of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde does not result in alteration of nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* 2004; 75: 429-35.
13. Murer MG, Dziewczapolski G, Menalled LB *et al.* Chronic levodopa is not toxic for remaining dopamine neurons, but instead promotes their recovery, in rats with moderate nigrostriatal lesions. *Ann Neurol* 1998; 43: 561-75.

Toxicité du DOPAL *in vitro* et *in vivo*

14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65: 55-63.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
16. Cleren C, Vilpoux C, Dourmap N *et al.* Acute interactions between L-DOPA and the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenylpyridinium or 6-hydroxydopamine in mice. *Brain Res* 1999; 830: 314-9.
17. Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain-I. The disposition of 3H-norepinephrine, 3H-dopamine and 3H-DOPA in various regions of the brain. *J Neurochem* 1966; 13: 655-69.
18. Colzi A, Musolino A, Iuliano A *et al.* Identification and determination of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde, the dopamine metabolite in *in vivo* dialysate from rat striatum. *J Neurochem* 1996; 66: 1510-7.
19. Baraldi PG, Simoni D, Manfredini S, Menziani E. Preparation of 3,4-dihydroxy-1-benzeneethanol: a reinvestigation. *Liebigs Ann Chem* 1983; 684- 6.
20. Lai CT, Yu PH. Dopamine- and L-β-3, 4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (L-Dopa)- induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 363-72.
21. Masserano JM, Gong L, Kulaga H *et al.* Dopamine induces apoptotic cell death of a catecholaminergic cell line derived from the central nervous system. *Molec Pharmacol* 1996; 50: 1309-15.
22. Offen D, Gorodin S, Melamed E *et al.* Dopamine-melanin is actively phagocytosed by PC12 cells and cerebellar granular cells: possible implications for the etiology of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1999; 260: 101-4.
23. Mc Laughlin BA, Nelson D, Erecinska M, Chesselet MF. Toxicity of dopamine to striatal neurons in vitro and potentiation of cell death by a mitochondrial inhibitor. *J Neurochem* 1998; 70: 2406-15.
24. Cantuti-Castelvetri I, Joseph JA. Differential effect of dopamine catabolism and uptake inhibition on dopamine-induced calcium dysregulation and viability loss. *Free Rad Biol Med* 1999; 27: 1393-404.
25. Simantov R, Blinder E, Ratovitski T *et al.* Dopamine-induced apoptosis in human neuronal cells: inhibition by nucleic acids antisense to the dopamine transporter. *Neurosci* 1996; 74: 39-50.
26. Jones DC, Gunasekar PG, Borowitz JL, Isom GE. Dopamine-induced apoptosis is mediated by oxidative stress and is enhanced by cyanide in differentiated PC 12 cells. *J Neurochem* 2000; 74: 2296-304.
27. Keller JN, Huang FF, Dimayuga ER, Maragos W. Dopamine induces proteasome inhibition in neural PC12 cell line. *Free Rad Biol Med* 2000; 10: 1037-42.
28. Brewer C. Recent developments in disulfiram treatment. *Alcohol Alcohol* 1993; 28: 383-95.
29. Yoshida A. Molecular genetics of human aldehyde dehydrogenase. *Pharmacogenetics* 1992; 2: 139-47.
30. Stewart MJ, Malek K, Crabb DW. Distribution of messenger RNAs for aldehyde dehydrogenase 1, aldehyde dehydrogenase 2, aldehyde dehydrogenase 5 in human tissues. *J Investig Med* 1996. 44: 42-6.
31. Vasilou V, Pappa A, Petersen DR. Role of aldehyde dehydrogenase in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem Biol Interact* 2000; 129: 1-19.
32. Minegishi A, Satoh T, Fukumori R *et al.* Susceptibility of brain aldehyde metabolizing enzymes to pargyline, disulfiram and diethylmaleate in vivo in rats. *Life Sci* 1979; 24: 1131-6.
33. Manna C, Galletti P, Maisto G *et al.* Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Letters* 2000; 470: 341-4.
34. Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F *et al.* Apoptosis and autophagy in nigral neurones of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 1997; 12: 25-31.
35. Adams JD Jr, Chang M-L, Klaidman L. Parkinson's disease-redox mechanisms. *Curr Med Chem* 2001; 8: 809-14.
36. Hornykiewicz O, Kish S. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. In: Yahr M D, Bergmann KJ, editors. *Advances in Neurology*, Vol. 45. New York: Raven Press; 1986, 19-34.
37. Agid Y. Levodopa: is toxicity a myth? *Neurology* 1998; 50: 858-63.
38. Datla KP, Blunt SB, Dexter DT. Chronic L-DOPA administration is not toxic to the remaining dopaminergic nigrostriatal neurons, but instead may promote their functional recovery, in rats with partial 6-OHDA or FeCl₃ nigrostriatal lesions. *Mov Disord* 2001; 16: 424-34.
39. Mena M, Casarejos M, Carazo A *et al.* Glia protect fetal midbrain dopamine neurons in culture from L-DOPA toxicity through multiple mechanisms. *J Neural Transm* 1997; 104: 317-28.