

# EFFET DE LA STIMULATION DE LA CHAINE SYMPATHIQUE SUR LA LIBERATION PLASMATIQUE DE L'EPHEDRINE $^{14}\text{C}$ ET DE LA PARAHYDROXYEPHEDRINE $^{14}\text{C}$ . MISE EN EVIDENCE D'UN FAUX MEDIATEUR, LA PARAHYDROXYEPHEDRINE $^{14}\text{C}$ , CHEZ LE RAT

J. BRALET, C. JACQUOT, Y. COHEN et G. VALETTE

Faculté de Pharmacie de Paris, C.N.R.S. et I.N.S.E.R.M., Paris (VI<sup>e</sup>)

(Received 9 April 1970; accepted 24 June 1970)

**Abstract**—Following administration to rats of ephedrine  $^{14}\text{C}$  sympathetic stimulation produced an output of ephedrine and parahydroxyephedrine and decreased the blood pH. On the other hand, pH variations, induced by carbogen inhalation, increased ephedrine but not parahydroxyephedrine concentrations. This result suggested that ephedrine was not bound to neuronal sites.

Following nerves stimulation, parahydroxyephedrine concentration increased in plasma of the rat. Guanethidine injection decreased parahydroxyephedrine but not ephedrine output. Phenoxylbenzamine had the same effects on the liberation of both of these amines. These findings indicate that parahydroxyephedrine behaves as a false neurotransmitter.

LA NORADRÉNALINE est, chez les mammifères, le principal médiateur à la terminaison post-ganglionnaire des nerfs sympathiques mais d'autres amines sympathomimétiques de structure chimique voisine de celle de la noradrénaline peuvent remplacer partiellement cette dernière dans ses sites de fixation. Elles ont été désignées pour cette raison du nom de "faux médiateurs".<sup>1</sup>

La mise en évidence de ces faux médiateurs est résultée de l'utilisation de deux méthodes différentes.<sup>2</sup> La première consiste dans la séparation de fractions cellulaires par centrifugation en gradient de densité, et d'une analyse de la fraction riche en catécholamines. La constatation d'une distribution similaire pour la noradrénaline et l'amine exogène est un argument en faveur de la localisation de cette dernière au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques. La seconde méthode, plus physiologique, consiste à mettre en évidence la libération de l'amine sous l'effet de la stimulation nerveuse sympathique. Les principales études faites dans ce domaine ont été réalisées sur des organes isolés, prélevés chez un animal prétraité par l'amine à étudier et perfusé par un liquide physiologique.

La libération de l'amine ou de l'un de ses métabolites dans le liquide de perfusion durant la stimulation nerveuse sympathique permet d'attribuer la qualité de faux médiateur au composé libéré dans ces conditions.

L'utilisation de ces deux techniques a permis de dresser une liste déjà longue, des amines sympathomimétiques qui peuvent jouer un tel rôle.<sup>2</sup> Par exemple, l' $\alpha$ -méthyltyramine<sup>3</sup> et l'amphétamine<sup>4</sup> administrées à l'animal, donnent naissance à un faux

médiateur identique, qui est l'améthylloctopamine ou parahydroxynoréphédrine. Or, l'éphédrine s'apparente structuralement à la noradrénaline et à l'amphétamine et nous avons montré, dans un précédent travail<sup>5</sup> que l'éphédrine et l'amphétamine s'accumulent passivement, *in vitro*, dans le cœur perfusé ou dans des coupes de rate, suivant des modalités régies par le pH du liquide dans lequel baigne l'organe.

On sait, d'autre part, que la principale voie métabolique de l'éphédrine chez le rat<sup>6</sup> consiste en une hydroxylation du cycle benzénique, qui conduit à la parahydroxyéphédrine et l'on trouve effectivement ce composé phénolique en quantité appréciable dans les différents organes du rat, son apparition exigeant toutefois un certain temps en raison de la lenteur du métabolisme de l'amine injectée.

Dans le présent travail, nous avons examiné la possibilité pour ce principal métabolite de l'éphédrine, la parahydroxyéphédrine, de jouer le rôle de faux médiateur sympathique et nous avons utilisé pour cela la stimulation électrique de la chaîne sympathique du rat, appliquée au moyen d'une électrode introduite dans toute la longueur du canal rachidien.

Dans un précédent article,<sup>7</sup> nous avons montré, en effet, qu'une telle stimulation provoquait une libération de noradrénaline dans la circulation de l'animal: nous avons donc étudié l'effet de cette stimulation sur la libération plasmatique de la parahydroxyéphédrine <sup>14</sup>C chez le rat traité auparavant par l'éphédrine <sup>14</sup>C. Nous avons également étudié l'influence, sur cette libération, du traitement par la guanéthidine et la phénoxybenzamine.

## METHODE

La méthode de stimulation électrique de la moelle de rat a été décrite en détail du point de vue physiologique par Gillespie et Muir<sup>8</sup> et par nous-mêmes du point de vue biochimique, en ce qui concerne la libération de noradrénaline <sup>3</sup>H.<sup>7</sup>

### (a) *Préparation des animaux*

Des rats mâles Charles River (220-240 g) sont anesthésiés par injection intraperitoneale de 50 mg/kg de pentobarbital (Nembutal) sodique. Les deux veines jugulaires et une artère carotide sont liées, la seconde carotide étant cathétérisée, pour permettre des prélèvements de sang. Les deux troncs vagaux sont sectionnés. Après injection intraveineuse de triiodoéthylique de Gallamine (Flaxedil Roche) (10 mg/kg) une hyperventilation pulmonaire est installée au moyen d'une pompe respiratoire (Palmer) (rythme 100/min, vol. 6 ml). Cette hyperventilation est nécessaire pour éviter la mort des animaux par oedème pulmonaire, comme le conseillent les auteurs.<sup>8</sup>

Dans certaines expériences, l'air ambiant a été remplacé dans la pompe par du carbogène (O<sub>2</sub>, 95%; CO<sub>2</sub>, 5%).

L'animal est démédullé au moyen d'une aiguille en acier inoxydable introduite dans l'orbite et poussée dans le canal rachidien. Cette aiguille, reliée aux bornes d'un stimulateur, constitue une électrode de stimulation, une seconde électrode est insérée dans la patte postérieure de l'animal.

Avant le début de l'expérience, l'animal a reçu 1 mg/kg d'atropine par voie intraperitoneale et 500 U.I. d'héparine par voie intraveineuse.

(b) *Paramètres de stimulation et substances utilisées*

La stimulation électrique de la moelle a été pratiquée sous une différence de potentiel de 50 V pour une fréquence de 6 cycles/sec. La durée du signal rectangulaire était de 1 msec, le temps de stimulation de 8 min.

La *dl* éphédrine  $^{14}\text{C}$  (C.E.N. Saclay, 16,9 mc/mM) a été administrée à la dose de 1 mg/kg (100  $\mu\text{c}/\text{kg}$ ) à deux temps différents (30 min et 5 hr) avant le début de l'expérience.

La guanéthidine (Ismeline CIBA) à la dose de 10 mg/kg et la phén oxybenzamine (Dibenzyline SKF) à la dose de 5 mg/kg ont été injectées par voie intraveineuse 10 min avant le début de l'expérience à des animaux qui ont reçu de la *dl* éphédrine  $^{14}\text{C}$  (1 mg/kg, i.p.) 5 hr auparavant.

(c) *Traitements des échantillons sanguins*

Un échantillon de sang (environ 1 ml) est recueilli à la carotide 1 min avant l'installation des chocs électriques durant lesquels un autre prélèvement est effectué à la sixième minute et pendant 2 autres min. Le pH de ces deux échantillons est aussitôt mesuré à la température de 20°.

Dans certaines expériences témoins, le sang est recueilli selon les mêmes intervalles de temps sur des animaux non soumis à la stimulation électrique.

Le plasma, recueilli après centrifugation, est additionné de 4 volumes d'acide perchlorique 0,4 N. Après une nouvelle centrifugation, le liquide surnageant est utilisé pour le dosage de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  et de ses métabolites phénoliques. L'éphédrine est dosée par extraction au benzène en milieu alcalin, les dérivés phénoliques sont ensuite extraits par l'alcool isoamylque à pH 9,5, selon les conditions précédemment décrites par nous.<sup>6</sup>

(d) *Différenciation des métabolites phénoliques*

La différenciation entre les deux métabolites phénoliques possibles de l'éphédrine, parahydroxyéphédrine et parahydroxynoréphédrine, a été effectuée en utilisant une méthode originale de chromatographie sur couche mince de 300 microns d'épaisseur obtenue à partir du mélange: cellulose (Macherey-Nagel 300 HR) 7,5 g, méthanol 45 ml. Les plaques sont séchées pendant 10 min à 105°. Le solvant est constitué par de l'alcool isomaylique saturé d'acide chlorhydrique 3 N. Après dépôt des échantillons, les plaques sont placées dans la cuve pendant 30 min avant la mise en route de la chromatographie: Les  $R_f$  moyens sont de 0,46 pour la parahydroxynoréphédrine et de 0,55 pour la parahydroxyéphédrine.

Après chromatographie d'un échantillon de l'urine de 24 hr chez des rats qui ont reçu l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  (1 mg/kg i.p.), la radioactivité des phénols urinaires a été localisée au niveau de la seule parahydroxyéphédrine.

(e) *Comptage des échantillons et expressions des résultats*

Une partie aliquote des différents extraits est ajoutée dans une fiole pour scintillation liquide, à 15 ml de liquide scintillant (P.P.O., 4 g; diméthyl P.O.P.O.P. 0,1 g; Triton X 100, 500 ml; toluène, 1000 ml). La mesure de la radioactivité est effectuée au moyen d'un compteur à scintillation liquide PACKARD 3380; l'autoextinction des échantillons est appréciée à l'aide d'un étalon externe.

Les résultats obtenus sont exprimés en nanogrammes par millimètre cube de plasma pour l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  et la parahydroxyéphédrine  $^{14}\text{C}$ ; ils sont affectés de l'erreur moyenne, Sm. La signification statistique des résultats a été établie par le calcul de l'analyse de variance.

## RESULTATS

L'influence de la stimulation nerveuse sur la libération plasmatique de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  et de la parahydroxyéphédrine  $^{14}\text{C}$  a été étudiée chez des rats prétraités par l'éphédrine  $^{14}\text{C}$ . Dans un but de simplification, nous exposerons successivement les résultats relatifs à la libération de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$ , puis ceux qui ont trait à la libération de la parahydroxyéphédrine  $^{14}\text{C}$ , bien que ces deux données nous aient été fournies simultanément par les mêmes animaux.

### 1. *Effet de la stimulation nerveuse sympathique sur la libération plasmatique de l'éphédrine $^{14}\text{C}$ chez le rat prétréité par l'éphédrine $^{14}\text{C}$*

(a) *Effet de la stimulation électrique.* La dl éphédrine  $^{14}\text{C}$  a été administrée à la dose de 1 mg/kg chez deux groupes d'animaux: ceux de premier groupe ont reçu l'amine radioactive par voie i.v. 30 min avant le début de l'expérience et ceux du second groupe par voie i.p. 5 hr auparavant. Les animaux sont stimulés et les prélèvements de sang sont effectués suivant les modalités décrites au paragraphe précédent. Les teneurs plasmatiques en éphédrine  $^{14}\text{C}$  obtenues chez les deux groupes d'animaux sont rapportées dans le Tableau 1.

Chez les animaux du premier groupe, qui ont reçu l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  30 min avant le début de l'expérience, le taux circulant de cette amine avant stimulation est de 257 ng/ml: il passe à 480 ng/ml durant la stimulation, soit une augmentation de 223 ng/ml. Le taux de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  est presque doublé sous l'effet de la stimulation.

Cinq hr après l'administration de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  (animaux du second groupe) la concentration plasmatique de l'amine n'est plus que de 20 ng/ml avant la stimulation, et elle passe à 30,9 ng/ml au cours de cette dernière. La stimulation entraîne donc ici encore une sortie d'éphédrine  $^{14}\text{C}$ , mais l'intensité de la sortie (environ 50 pour cent) est proportionnellement plus faible que celle qui est observée chez les animaux du premier groupe.

Chez les deux groupes d'animaux, nous avons constaté que la stimulation électrique entraîne une chute importante du pH sanguin. Avant stimulation, il existe une alcalose imputable à l'hyperventilation imposée par la respiration artificielle, le pH des échantillons sanguins étant, en effet, égal à 8,0. Dans les prélèvements de sang effectués après 6 min de stimulation, le pH n'est plus égal en moyenne qu'à 7,4, soit une baisse de 0,6 unités pH. Cette observation montre que, dans nos conditions expérimentales, la stimulation de l'animal provoque cette baisse importante de pH sanguin et ce résultat nous a amenés à étudier le rôle éventuel de cette diminution du pH sur la libération plasmatique de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$ , indépendamment de toute stimulation électrique.

(b) *Influence de la diminution du pH sanguin sur la sortie plasmatique de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$ .* Une diminution du pH sanguin de même ampleur que celle qui est provoquée par la stimulation électrique a été réalisée en remplaçant l'air de la pompe respiratoire par du carbogène, le rythme et le volume de la pompe demeurent inchangés. Les prélèvements de sang sont effectués dans les mêmes conditions, à savoir un premier prélève-

TABLEAU 1. INFLUENCE DE LA STIMULATION NERVEUSE, DE L'INHALATION DE CARBOGÈNE ET DE LA SAIGNÉE SUR LE pH ET LA LIBÉRATION PLASMATIQUE DE L'ÉPHÉDRINE  $^{14}\text{C}$   
 CHEZ DES RATS PRÉTRAITÉS À L'ÉPHÉDRINE  $^{14}\text{C}$

Traitement des animaux	Taux plasmatique de l'éphédrine $^{14}\text{C}$ en ng/ml du prélevement no. 1	pH du sang du prélevement no. 1	Taux plasmatique de l'éphédrine $^{14}\text{C}$ en ng/ml du prélevement no. 2	pH du sang du prélevement no. 2	Différence no. 2-no. 1 en ng/ml
Ephédrine $^{14}\text{C}$ 30 min 1 mg/kg i.v.	stimulés*	257,1 ± 52,2	8,00 ± 0,05	480,3 ± 52,9	7,40 ± 0,03
	non stimulés	212,5 ± 22,0	8,00 ± 0,05	429,1 ± 70,0	7,40 ± 0,03
	carbogène†				216,6 ± 43,1
Ephédrine $^{14}\text{C}$ 5 hr mg/kg i.p.	stimulés*	20,0 ± 2,4	8,00 ± 0,05	30,9 ± 2,9	7,40 ± 0,03
	non stimulés	15,2 ± 2,4	8,00 ± 0,05	21,9 ± 1,7	7,40 ± 0,03
	carbogène†				6,7 ± 1,6
	non stimulés	18,9 ± 3,6	8,00 ± 0,05	20,8 ± 3,7	8,00 ± 0,05
	saignée‡				1,9 ± 1,1

\* Les animaux sont stimulés pendant 8 min (50 V, 6 cycles/sec). Le prélevement de sang no. 1 est effectué 1 min avant le début de la stimulation, le prélevement no. 2 après 6 min de stimulation pendant 2 min.

† Les animaux ne sont soumis à aucune stimulation électrique, mais inhalaient du carbogène. Le prélevement de sang no. 1 est réalisé 1 min avant le début de l'inhalation, le prélevement no. 2 après 6 min d'inhalation du gaz pendant 2 min.

‡ Les animaux ne reçoivent pas de stimulation, mais subissent les deux prélevements de sang qui sont séparés par un intervalle de 6 min.  
 Les résultats sont les moyennes de cinq expériences.

ment 1 min avant l'inhalation de carbogène (de pH moyen:  $8,00 \pm 0,05$ ) et un second prélèvement après 6 min d'inhalation de carbogène (pH moyen:  $7,40 \pm 0,03$  unités pH). Ce type d'expérience a été réalisé chez deux lots d'animaux qui ont reçu l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  (1 mg/kg) respectivement 30 min (voie intra-veineuse) et 5 hr (voie i.p.) auparavant. Les résultats figurent dans le Tableau 1.

Il ressorts de ces résultats que la seule diminution de pH sanguin provoque une libération d'éphédrine  $^{14}\text{C}$  dans la circulation. Ainsi chez les animaux prétraités par l'éphédrine  $^{14}\text{C}$ , 30 min avant le début de l'expérience, la seule inhalation de carbogène augmente le taux plasmatique de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  de 216 ng/ml; cette augmentation est tout-à-fait comparable à celle (223 ng/ml) qui est observée au cours de la stimulation électrique des animaux.

Après 5 hr de traitement par l'éphédrine  $^{14}\text{C}$ , l'inhalation du carbogène fait passer le taux circulant de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  de 15,2 à 21,9 ng/ml, soit une augmentation de 6,7 ng/ml. Cette valeur est plus faible que celle (10,9 ng/ml) qui a été obtenue au cours de la stimulation.

L'influence d'un autre facteur susceptible de provoquer une libération d'éphédrine  $^{14}\text{C}$  a été examinée: il s'agit de la saignée de l'animal.

(c) *Influence de la saignée sur la sortie plasmatique de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$ .* Nous sommes amenés, de par nos conditions expérimentales, à pratiquer un prélèvement de sang au début de l'expérience et à comparer sa teneur en éphédrine  $^{14}\text{C}$  à celle d'un second prélèvement effectué 6 min plus tard. Or, il est bien connu que la saignée constitue un stimulus sympathique important chez l'animal intact: l'influence de ce facteur a donc été étudiée.

Les animaux ont reçu l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  (1 mg/kg i.p.) 5 hr avant l'expérience.

Un premier échantillon de sang est recueilli, puis un second après 6 min de repos. Le pH des deux échantillons a été mesuré et il n'a pas été observé de différence appréciable de pH entre les deux prélèvements.

Le taux de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  (Tableau 1) est de 18,9 ng/ml dans le premier prélèvement et de 20,8 ng/ml dans le second. Cette augmentation du taux plasmatique de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  ( $1,9 \pm 1,1$  ng/ml) est négligeable par rapport à celles qui sont obtenues chez des animaux stimulés ( $10,9 \pm 0,9$  ng/ml) ou respirant du carbogène ( $6,7 \pm 1,6$  ng/ml).

## 2. Effet de la stimulation nerveuse sympathique sur la libération plasmatique de la parahydroxyéphédrine $^{14}\text{C}$ chez le rat prétraité par l'éphédrine $^{14}\text{C}$

Les déterminations de la parahydroxyéphédrine  $^{14}\text{C}$  n'ont été réalisées que chez les animaux prétraités par l'éphédrine  $^{14}\text{C}$ , 5 hr auparavant: en effet, les teneurs plasmatiques en parahydroxyéphédrine  $^{14}\text{C}$ , 30 min après l'injection d'éphédrine  $^{14}\text{C}$ , sont trop faibles par rapport à celles de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$ , pour pouvoir être estimées avec précision par notre méthode.

Comme dans le cas de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$ , nous envisageons successivement l'influence de la stimulation électrique, de la diminution de pH sanguin et de la saignée de l'animal sur la libération plasmatique de la parahydroxyéphédrine  $^{14}\text{C}$  (Tableau 2).

(a) *Effet de la stimulation électrique.* La stimulation électrique, les prélèvements de sang et les mesures de pH sanguin sont effectués comme précédemment, dans le cas de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$ .

TABLEAU 2. INFLUENCE DE LA STIMULATION NERVEUSE, DE L'INHALATION DE CARBOGÈNE ET DE LA SAIGNÉE SUR LA LIBÉRATION PLASMATIQUE DE LA PARAHYDROXY-ÉPHÉDRINE  $^{14}\text{C}$  CHEZ DES RATS PRÉTRAITÉS PAR L'ÉPHÉDRINE  $^{14}\text{C}$  (1 mg/kg i.p. 5 hr avant l'expérience)

Traitement des animaux	Taux plasmatique de la parahydroxyéphédrine $^{14}\text{C}$ (ng/ml)		Différence no. 2-no. 1
	Prélèvement no. 1	Prélèvement no. 2	
Stimulés* (a)	4,4 ± 0,7	7,5 ± 0,8	3,1 ± 0,4 (a)
Non stimulés† (b)	3,3 ± 0,3	3,5 ± 0,4	0,2 ± 0,2 (b)
Non stimulés + carbogène‡ (c)	3,8 ± 0,7	4,9 ± 0,5	1,1 ± 0,3 (C) P c/a < 0,05

\* Les animaux sont stimulés pendant 8 min (50 V, 6 cycles/sec). Le prélèvement de sang no. 1 est effectué 1 min avant le début de la stimulation, le prélèvement de sang no. 2 après 6 min de stimulation, pendant 2 min.

† Les animaux ne reçoivent pas de stimulation, mais subissent les deux prélèvements de sang qui sont séparés par un intervalle de 6 min.

‡ Les animaux ne reçoivent pas de stimulation, mais inhalaient du carbogène. Le prélèvement de sang no. 1 est effectué 1 min avant le début de l'inhalation, le prélèvement no. 2 après 6 min d'inhalation pendant 2 min.

Les résultats sont les moyennes de cinq expériences.

Le taux circulant de parahydroxyéphédrine  $^{14}\text{C}$  est, avant stimulation, de  $4,4 \pm 0,7 \text{ ng/ml}$ . Au cours de la stimulation électrique, ce taux passe à  $7,5 \pm 0,8 \text{ ng/ml}$ , soit une augmentation de  $3,1 \pm 0,4 \text{ ng/ml}$ . Cette augmentation est associée à une baisse du pH sanguin de 0,60 unité.

(b) *Influence de la saignée sur la libération plasmatique de la parahydroxyéphédrine  $^{14}\text{C}$ .* Les deux prélèvements de sang sont séparés par un intervalle de 6 min. Le taux plasmatique de la parahydroxyéphédrine  $^{14}\text{C}$  est de  $3,3 \pm 0,3 \text{ ng/ml}$  dans le premier échantillon sanguin et de  $3,5 \pm 0,4 \text{ ng/ml}$  dans le second. La différence de taux entre ces deux prélèvements ( $0,2 \pm 0,2 \text{ ng/ml}$  est négligeable par rapport à celle ( $3,1 \pm 0,4 \text{ ng/ml}$ ) qui est obtenue chez les animaux stimulés.

(c) *Influence de la diminution du pH sanguin sur la libération plasmatique de la parahydroxyéphédrine  $^{14}\text{C}$ .* L'inhalation de carbogène à la place de l'air ambiant provoque, nous l'avons vu, une chute du pH sanguin de 0,60 unité. Le taux circulant de la parahydroxyéphédrine  $^{14}\text{C}$  avant ce traitement est de  $3,8 \pm 0,7 \text{ ng/ml}$ . Après carbogène, il passe à  $4,9 \pm 0,5 \text{ ng/ml}$ , soit une augmentation de  $1,1 \pm 0,3 \text{ ng/ml}$ .

Cette augmentation est environ trois fois plus faible que celle ( $3,1 \pm 0,4 \text{ ng/ml}$ ) qui est observée au cours de la stimulation électrique. La différence entre ces deux augmentations de taux circulant est statistiquement significative ( $P < 0,05$ ). Ceci indique que la stimulation nerveuse a un effet libérateur de parahydroxyéphédrine  $^{14}\text{C}$  qui n'est pas imputable à la seule variation de pH consécutive à la stimulation électrique.

### *3. Influence du traitement des animaux par la guanéthidine et par la phénoxybenzamine sur la libération plasmatique de l'éphédrine $^{14}\text{C}$ et de la parahydroxyéphédrine $^{14}\text{C}$ pendant la stimulation nerveuse*

Nous avons montré, dans un précédent travail, que dans certaines conditions, la guanéthidine et la phénoxybenzamine, diminuent le taux de libération de la noradrénaline  $^3\text{H}$ .<sup>7</sup>

Dans les expériences décrites ci-après, nous avons cherché à caractériser un effet comparable de ces deux substances sur la libération plasmatique de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  et de son métabolite.

Dix min avant l'expérience, les animaux qui, 5 hr auparavant, ont été traités par l'éphédrine  $^{14}\text{C}$  (1 mg/kg i.p.) reçoivent, soit 10 mg/kg de guanéthidine, soit 5 mg/kg de phénoxybenzamine. La stimulation médullaire, les prélèvements de sang, la mesure du pH sont effectuées selon les indications données au paragraphe "méthode". Nous exposerons successivement les résultats qui sont obtenus pour l'éphédrine, et pour la parahydroxyéphédrine (Tableau 3).

(a) *Libération plasmatique de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$ .* Le traitement par la guanéthidine ou par la phénoxybenzamine ne modifie pas le taux circulant d'éphédrine  $^{14}\text{C}$  par rapport aux animaux qui n'ont pas reçu ces substances. Ce taux est, en effet, de  $20,0 \pm 2,4 \text{ ng/ml}$  chez les animaux témoins; il est respectivement de  $17,3 \pm 3,8 \text{ ng/ml}$  et de  $19,5 \pm 3,7 \text{ ng/ml}$  pour les animaux soumis à la guanéthidine ou à la phénoxybenzamine.

Pendant la stimulation électrique, le taux plasmatique de l'éphédrine augmente de  $11,9 \pm 2,9 \text{ ng/ml}$  et de  $12,6 \pm 2,7 \text{ ng/ml}$  dans les deux séries d'animaux traités. Ces augmentations ne diffèrent pas de celles qui sont mesurées pour les animaux témoins ( $11,0 \pm 0,9 \text{ ng/ml}$ ). De même, les variations du pH sanguin entre les échantillons de sang avant et pendant la stimulation accusent une baisse de pH égale en moyenne à 0,60 unités pH, celle-ci est comparable à celle des animaux témoins.

TABLEAU 3. INFLUENCE DU TRAITEMENT PAR LA GUANETHIDINE ET PAR LA PHENOXYBENZAMINE SUR LA LIBÉRATION PLASMATIQUE DE L'ÉPHÉDRINE  $^{14}\text{C}$  ET DE LA PARAHYDROXYÉPHÉDRINE  $^{14}\text{C}$  DURANT LA STIMULATION ÉLECTRIQUE DE LA MOELLE CHEZ DES RATS PRÉTRAITÉS PAR L'ÉPHÉDRINE  $^{14}\text{C}$  (1 mg/kg i.p. 5 hr avant l'expérience)

Traitement des animaux	Taux plasmatique de l'éphédrine $^{14}\text{C}$ (ng/ml)		Taux plasmatique de la parahydroxy-éphédrine $^{14}\text{C}$ (ng/ml)		Différence no. 2-no. 1 (ng/ml)
	Prélèvement no. 1	Prélèvement no. 2	Prélèvement no. 1	Prélèvement no. 2	
Témoins	20,0 $\pm$ 2,4	31,0 $\pm$ 2,9	11,0 $\pm$ 0,9	4,4 $\pm$ 0,7	7,5 $\pm$ 0,8
Guanethidine 10 mg/kg i.v.	17,3 $\pm$ 3,8	29,2 $\pm$ 0,4	11,9 $\pm$ 2,9	5,6 $\pm$ 0,7	6,9 $\pm$ 0,1
Phenoxybenzamine 5 mg/kg i.v.	19,5 $\pm$ 3,7	32,1 $\pm$ 6,5	12,6 $\pm$ 2,7	4,0 $\pm$ 0,6	5,9 $\pm$ 0,4

Tous les animaux sont stimulés pendant 8 min (50 V, 6 cycles/sec). Le prélèvement de sang no. 1 est effectué 1 min avant le début de l'expérience, le prélèvement no. 2 après 6 min de stimulation et pendant 2 min.  
Les résultats sont les moyennes de cinq expériences.

(b) *Libération plasmatique de la parahydroxyéphédrine <sup>14</sup>C.* Le taux circulant de la parahydroxyéphédrine <sup>14</sup>C chez les animaux témoins est de  $4,4 \pm 0,7$  ng/ml. Cette valeur ne diffère pas de celles qui sont obtenues après traitement des animaux par la guanéthidine ou par la phénoxybenzamine ( $5,6 \pm 0,7$  ng/ml et  $4,0 \pm 0,6$  ng/ml).

L'augmentation du taux de parahydroxyéphédrine <sup>14</sup>C libérée pendant la stimulation nerveuse est de  $3,1 \pm 0,4$  ng/ml chez les témoins, elle est de  $1,3 \pm 0,2$  ng/ml chez les animaux soumis à la guanéthidine et de  $1,9 \pm 0,4$  ng/ml chez les traités par la phénoxybenzamine. L'administration de ces deux substances diminue donc la sortie de parahydroxyéphédrine <sup>14</sup>C de manière significative ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSION

La méthode de stimulation électrique de la moelle de rat que nous avons utilisée dans ce travail, produit une libération de noradrénaline dans le plasma et cette stimulation libère de même, dans la circulation, de l'éphédrine <sup>14</sup>C et de la parahydroxyéphédrine <sup>14</sup>C chez des animaux prétraités par l'éphédrine <sup>14</sup>C. La variation de pH consécutive à la stimulation de l'animal entier, et reproduite par inhalation de carbogène, favorise la sortie d'éphédrine dans le plasma, mais n'affecte pas celle de la parahydroxyéphédrine.

(a) *Libération de l'éphédrine.* L'augmentation du taux plasmatique de l'éphédrine par stimulation nerveuse ou par variation de pH sous l'influence du carbogène est la même chez les animaux qui ont reçu l'éphédrine 30 min avant l'expérience. L'excitation nerveuse ne libère pas l'amino acide d'une manière spécifique; il semble, au contraire, que cette sortie d'éphédrine soit attribuable à la seule modification de l'équilibre acido-basique du sang circulant durant la stimulation électrique de la moelle. Nous avons montré, dans un précédent travail<sup>5,9</sup> qu'*in vitro*, la fixation de cette amine est passive et dépend principalement du pH du milieu où elle est dissoute; l'intensité de sa fixation, par rapport à celle de l'amphétamine, est en rapport avec le pourcentage respectif des formes ionisée et non ionisée de la molécule et donc du pK de ces deux substances. Une variation du pH dans l'un ou l'autre sens retentit sur le rapport  $K = \text{éphédrine ionisée}/\text{éphédrine non ionisée}$ . Dans nos expériences de stimulation, la sortie d'éphédrine dans le plasma peut être attribuée à la variation de pH, puisque l'inhalation par l'animal du seul carbogène produit une sortie identique d'éphédrine. Cet ensemble de faits constitue une présomption en faveur d'une localisation extra-neuronale de l'éphédrine dans nos conditions expérimentales.

Cinq heures après l'administration d'éphédrine <sup>14</sup>C, la stimulation sympathique libère dans le plasma une quantité d'éphédrine (10,9 ng/ml) supérieure à celle (6,7 ng/ml) qui est mobilisée par la seule variation du pH obtenue par inhalation de carbogène. Dans ces conditions, l'excitation nerveuse a un effet positif sur la libération de l'amino acide. Ce résultat permet de penser qu'une petite quantité d'éphédrine a la possibilité de pénétrer dans des structures où elle serait retenue plus solidement que précédemment. Cette pénétration, dans un compartiment intra-neuronale, serait peut-être en relation avec la déplétion en catécholamines que certains auteurs ont mentionnée.<sup>10</sup> Ainsi, l'éphédrine se fixerait dans les tissus suivant deux modalités: l'une extra-neuronale, et l'autre intra-neuronale. Cette dernière fixation, lente à se réaliser, laisserait, dans nos conditions expérimentales, l'éphédrine en grande partie sous forme extra-neuronale. Cette hypothèse a été vérifiée pour l'amphétamine par Obianwu *et al.*<sup>11</sup>

par fractionnement cellulaire en gradient de densité. Ces auteurs ont, en effet, montré qu'une très petite quantité de celle-ci était retrouvée dans la fraction microsomiale riche en noradrénaline.

(b) *Libération de la parahydroxyéphédrine.* La parahydroxyéphédrine, métabolite phénolique de l'éphédrine, se fixe dans les tissus; de là, elle est libérée dans le plasma par stimulation nerveuse sympathique.

La modification du pH sanguin ne provoque pas une libération aussi importante dans le plasma; la différence entre les taux de libération plasmatique chez les animaux stimulés et ceux qui ont été soumis au seul carbogène, sans stimulation, est statistiquement significative. L'hydroxylation phénolique de l'éphédrine permet une fixation durable dans les tissus. Néanmoins, l'hydroxylation phénolique des phényléthylamines ne crée pas un faux médiateur, comme l'ont montré Goldstein et Anagnosse<sup>12</sup> et Thoenen, pour l'amphétamine.

Pour acquérir le caractère de faux médiateur, il est indispensable qu'une molécule appartenant à cette série possède à la fois un hydroxyle phénolique sur le noyau et un hydroxyle alcoolique sur la chaîne latérale en position  $\beta$ . Ces deux conditions sont réunies dans la parahydroxynoréphédrine, métabolite terminal de l'amphétamine ou de l' $\alpha$ -méthyl tyramine et pour son dérivé méthylé sur l'azote représenté par la parahydroxyéphédrine, métabolite de l'éphédrine. Le fait de se comporter comme un faux médiateur doit impliquer pour la parahydroxyéphédrine une localisation dans les terminaisons nerveuses analogue à celle de la noradrénaline, et une fixation active compétitive pour le système de transport de la noradrénaline. Ces deux conditions, qui résultent de la présence d'un faux médiateur dans les nerfs sympathiques, sont remplies par le métaraminol, qui est considéré comme faux médiateur adrénnergique par un certain nombre d'auteurs.<sup>13-15</sup>

(c) *Effets de la guanéthidine et de la phénoxybenzamine.* La guanéthidine inhibe la sortie dans le plasma de la noradrénaline pendant la stimulation de la chaîne sympathique chez le rat démodéullé.<sup>7</sup> Dans nos expériences, nous avons montré que cette substance ne modifie pas significativement la libération de l'éphédrine dans la circulation, alors qu'elle diminue significativement celle de la parahydroxyéphédrine dont la sortie, en présence de guanéthidine est en tout point comparable à celle qui est observée chez des animaux non stimulés. Ces résultats semblent confirmer notre hypothèse relative à la localisation essentiellement extra-neuronale de l'éphédrine et intraneuronale de la parahydroxyéphédrine.

Le traitement des animaux par la phénoxybenzamine augmente considérablement, *in vitro*, la sortie de noradrénaline pendant la stimulation nerveuse de la rate<sup>16</sup> ou du côlon isolé.<sup>17</sup>

De plus, nous avons constaté en présence de phénoxybenzamine une diminution de la sortie de parahydroxyéphédrine durant l'excitation nerveuse. La sortie d'éphédrine dans le plasma, pendant la stimulation sympathique, en présence de phénoxybenzamine n'est pas modifiée en valeur absolue par rapport à celle qui est mesurée chez les animaux témoins. Déjà le traitement par la phénoxybenzamine dans des conditions similaires<sup>7</sup> ne nous avait pas permis de noter, pour la noradrénaline  $^3\text{H}$ , une augmentation du taux plasmatique comparable à celle qui a été décrite sur des préparations isolées. Néanmoins, l'ensemble de nos résultats indique que la parahydroxyéphédrine, libérée par stimulation nerveuse sympathique, présente bien toutes les caractéristiques d'un faux médiateur adrénnergique.

*Remerciements*—Nous remercions Mademoiselle Bernadette Chezlemas, pour sa collaboration dévouée. Nos remerciements vont également à Monsieur Pichat, Chef du Service des molécules marquées au Centre d'études nucléaires de Saclay, pour la fourniture de l'éphédrine  $^{14}\text{C}$ .

**Résumé**—La stimulation de la chaîne sympathique du rat par une électrode intramedullaire produit, chez des animaux traités par l'éphédrine  $^{14}\text{C}$ , une chute du pH sanguin accompagnée d'une libération d'éphédrine et de parahydroxyéphédrine dans la circulation. La chute de pH sanguin peut être reproduite sur des animaux par inhalation de carbogène, on observe alors une augmentation de l'éphédrine dans le plasma équivalente en valeur absolue à celle que l'on mesure chez des animaux stimulés électriquement. Ce résultat atteste que la stimulation électrique de la moelle ne produit pas de sortie spécifique de l'éphédrine; il suggère que cette amine doit être localisée principalement dans un compartiment extra-neuronal.

En revanche, la variation de pH que l'on obtient à la suite de l'inhalation de carbogène chez des animaux non stimulés libère une plus faible quantité de parahydroxyéphédrine que celle que l'on mesure chez des animaux soumis à la stimulation sympathique. La stimulation semble donc exercer un effet spécifique sur la libération de parahydroxyéphédrine le résultat indique que la parahydroxyéphédrine offre les caractères d'un faux médiateur adrénergique.

La guanéthidine diminue la sortie plasmatique de la parahydroxyéphédrine, sous l'influence de la stimulation nerveuse; ce même traitement ne modifie pas la sortie de l'éphédrine.

La phén oxybenzamine diminue la sortie de parahydroxyéphédrine, par rapport à celle qui est évaluée chez les animaux témoins; la libération d'éphédrine n'est pas modifiée par ce traitement.

## BIBLIOGRAPHIE

1. I. J. KOPIN, *Pharmac. Rev.* **18**, 513 (1966).
2. H. THOENEN, *Bildung und funktionelle Bedeutung adrenerger Ersatztransmitter*, Springer-Verlag, Berlin (1969).
3. L. T. POTTER, *Pharmac. Rev.* **18**, 439 (1966).
4. H. THOENEN, A. HÜRLIMANN, K. F. GEY et W. HAEFELY, *Life Sci.* **5**, 1715 (1966).
5. C. JACQUOT, J. BRALET, Y. COHEN et G. VALETTE, *Biochem. Pharmac.* **18**, 903 (1969).
6. J. BRALET, Y. COHEN et G. VALETTE, *Biochem. Pharmac.* **17**, 2319 (1968).
7. C. JACQUOT, J. BRALET, Y. COHEN et G. VALETTE, *Arch. Int. Pharmac.* (1970).
8. J. S. GILLESPIE et T. C. MUIR, *Br. J. Pharmac. Chemother.* **30**, 78 (1967).
9. C. JACQUOT, J. BRALET, Y. COHEN et G. VALETTE, *Biochem. Pharmac.* **18**, 2415 (1969).
10. J. BRALET, Thèse Doctorat ès-Sciences: Réactivité du système cardiovasculaire à l'égard des amines sympathomimétiques tachyphylactogènes. Etude physiologique et biochimique. A.G.E.M.P. Paris (1967).
11. H. O. OBIANWU, R. STITZEL et P. LUNDBORG, *J. Pharm. Pharmac.* **20**, 585 (1968).
12. M. GOLDSTEIN et B. ANAGNOSTE, *Biochim. biophys. Acta* **107**, 166 (1965).
13. N. E. ANDEN, *Acta Pharmac. Tox.* **21**, 260 (1964).
14. J. R. GROUT, H. S. ALPERS, E. L. TATUM et P. A. SHORE, *Science* **145**, 828 (1964).
15. P. A. SHORE, D. BUSFIELD et H. S. ALPERS, *J. Pharmac. exp. Ther.* **146**, 194 (1964).
16. H. THOENEN, A. HÜRLIMANN et W. HAEFELY, *J. Pharmac. exp. Ther.* **151**, 189 (1965).
17. D. J. BOULIN, E. COSTA et B. B. BRODIE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **157**, 125 (1967).