

Facilitation de réactions nociceptives par la naloxone chez la souris et chez le rat

Joseph J. Jacob, Evelyne C. Tremblay et Marie-Claude Colombel

Service de Pharmacologie — Institut Pasteur F 75015 Paris

Reçu le 22 mars 1974

Enhancement of Nociceptive Reactions by Naloxone in Mice and Rats

Abstract. The effects of graded doses of naloxone on nociceptive reactions of mice and rats of different strains were studied using a hot plate technique.

Enhancements were observed provided the control reaction times were long enough, a condition which was fulfilled for the jumping reaction at different temperatures of the hot plate (50° C, 55° C, 65° C, 80° C in mice—55° C in rats) but for the licking reaction only at the lowest temperature (50° C in mice). Enhancement was dose-related up to a ceiling effect. Nalorphine had no such overt action. As low doses of naloxone (0.1–1 mg/kg s.c.) were effective, the enhancement is most simply accounted for by interactions at the level of the specific opioid receptors, some of which are suggested. The phenomenon might be relevant to the interpretation of the mechanisms of precipitated abstinence.

Key words: Rats — Mice — Nociceptive Reactions — Hot plate — Naloxone.

Il est bien connu que l'administration d'antagonistes de la morphine à des animaux préalablement morphinisés est capable de précipiter un syndrome d'abstinence dont les mécanismes sont encore mal connus. En particulier, la question se pose de savoir dans quelle mesure y participent des actions propres des antagonistes qui seraient alors, en général, de sens opposé à ceux de la morphine. Chez l'animal normal, de telles propriétés, lorsqu'elles existent, sont peu intenses (cft Martin, 1967) ce qui pourrait résulter du fait que la plupart des antagonistes ont aussi de notables propriétés morphinomimétiques susceptibles d'interférer. C'est cependant aussi le cas pour la naloxone qui est caractérisée par la médiocrité de ses actions morphinomimétiques (Blumberg *et al.*, 1961; Foldes *et al.*, 1963; Lasagna, 1965; Jasinsky *et al.*, 1967; McClane et Martin, 1967; Kosterlitz et Watt, 1968; Collier et Schneider, 1969); à notre connaissance les seuls effets inverses de cette substance: facilitation du réflexe fléchisseur chez le Chien spinal (McClane et Martin, 1967); contraction de l'intestin isolé de Cobaye (Villarreal, 1972) tachycardie et hyperthermie légères chez le Chien éveillé (Jacob et Michaud, 1974) ont été observées seulement avec des doses ou concentrations élevées ce qui ne permet pas de conclure à leur spécificité. Il est montré dans ce travail que de faibles doses de naloxone facilitent des réactions

nociceptives chez la Souris et chez le Rat en l'absence de tout autre traitement, observation qui, dans une certaine mesure, pourra contribuer à la caractérisation fonctionnelle des récepteurs des opiacés.

Méthodes

Les essais ont été réalisés avec a) des souris, d'un poids moyen de 20 g, et appartenant à diverses souches: Swiss en provenance du Centre d'élevage du

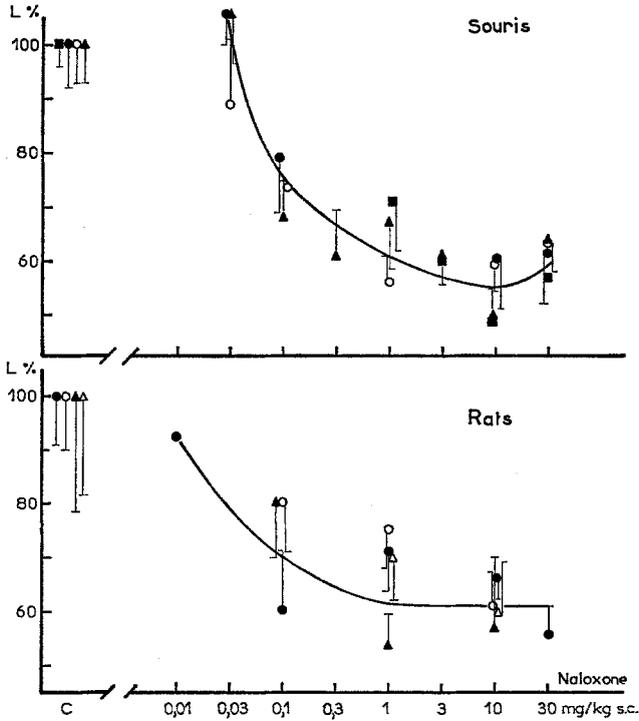


Fig. 1. Facilitation de la réaction nociceptive de bond chez des souris et des rats de diverses souches. En ordonnée: latence de la réaction (en pourcentages des témoins); en abscisse: doses de naloxone (en mg/kg s.c.); échelle logarithmique. La naloxone est injectée 10 min avant l'épreuve. Température de la plaque chauffante: 55° C. C contrôles. Les barres sont les erreurs standard des moyennes. En haut: Souris — Groupes de 20 animaux — Cut off: 2 min ■ Swiss C (♂); ● et ○: Swiss E (♂ et ♀); ▲ River Cobs (♂). Temps de bond témoins, respectivement: 84 ± 3,6 sec; 76 ± 5,7 sec; 87 ± 5,9 sec; 85 ± 6 sec. En bas: Rats — Groupes de 10 animaux — Cut off: 1 min ● et ○: Sprague Dawley (♂ et ♀); ▲ et △: Sherman (♂ et ♀). Temps de bond témoins, respectivement 31 ± 2,9 sec; 32 ± 3,1 sec; 24 ± 5 sec; 23 ± 4,3 sec. Par souci de clarté, les temps de lèchement n'ont pas été reportés; ils ne différaient en aucun cas de façon significative des moyennes des témoins qui étaient, respectivement, chez les souris: 5,3 ± 0,2 sec; 7,6 ± 0,5 sec; 7,7 ± 0,6 sec et 8,9 ± 0,7 sec et chez les rats: 6,9 ± 0,5 sec; 8,7 ± 0,5 sec; 7,9 ± 0,9 sec et 7,8 ± 0,9 sec

CNRS (Swiss G) ou d'un éleveur privé (Swiss E) et River COBS. b) Des rats, d'un poids moyen de 150 g, de souches Sprague-Dawley et Sherman provenant du Centre d'élevage du CRNS.

La méthode utilisée est celle de la plaque chauffante, l'appareil de contention était un cylindre de verre (souris: d: 13 cm, h: 17 cm — Rats: d: 23,5 cm, h: 25 cm). Chaque animal était exposé une seule fois. On mesurait les latences de deux réactions: le léchement et le bond. Les températures de la plaque ainsi que les «cut off time», seront précisés dans le texte ou les légendes. Sauf mention contraire, les groupes expérimentaux étaient de 20 animaux. La signification statistique a été déterminée avec le test «*t*» et avec la méthode de corrélation de rang de Wilcoxon (Wabeke et Van Eeden, 1955).

La naloxone (HCl), la nalorphine (HCl) et le NaCl 9⁰/₀₀ ont été injectés par voie sous-cutanée (volumes: souris 0,5 ml/20 g; rats 0,5 ml/100 g). Les doses sont exprimées par kilog de poids corporel et correspondent aux sels.

Résultats

Réaction de bond. Administrée 10 min avant l'épreuve, la naloxone a diminué de façon significative la latence de la réaction de bond de souris et de rats de diverses souches placés sur une plaque chauffée à 55° C (Fig. 1). Il n'a pas été observé de notable différence interspécifique, intraspécifique ou intersexuelle: une courbe effet/log dose commune s'adapte aux diverses valeurs obtenues chez les souris ou chez les rats; une diminution nette (significative chez les souris) est obtenue après 0,1 mg/kg s.c. de naloxone, un effet maximal similaire (significatif pour l'une et l'autre espèce) après 1 mg/kg s.c.; il ne progresse ni ne régresse de façon significative pour les doses plus élevées. Le phénomène a été reproduit, avec des souris mâles de souche Swiss (CNRS) pour d'autres températures de plaque chauffante: 50° C, 65° C (Fig. 2) et 80° C où les temps de bond représentaient, en pourcentage des valeurs témoins, respectivement $64 \pm 15\%$, $54 \pm 11\%$ et $50 \pm 9\%$ après 1, 3 et 10 mg/kg s.c. de naloxone.

Un essai comparatif a été conduit avec la nalorphine (Fig. 2B): après 0,1 mg/kg s.c. c'est non pas une diminution mais un accroissement — modéré certes mais significatif — qui a été observé; après des doses plus élevées, ce phénomène a progressivement régressé.

L'évolution chronologique de l'effet facilitateur de la naloxone a été déterminée avec cinq groupes de 20 souris (Swiss CNRS) recevant 1 mg/kg s.c. respectivement 5, 10, 15, 30 et 60 min avant l'exposition sur la plaque chauffante (65° C): les latences des bonds ont représenté respectivement $60 \pm 6\%$ — $52 \pm 6\%$ — $52 \pm 5\%$ — $74 \pm 6\%$ et $80 \pm 5\%$ de la valeur des témoins ($37 \pm 2,5$ sec): l'effet survient donc rapidement, atteint son maximum en 10 à 15 min, regresse ensuite de façon significative mais est encore présent après 60 min.

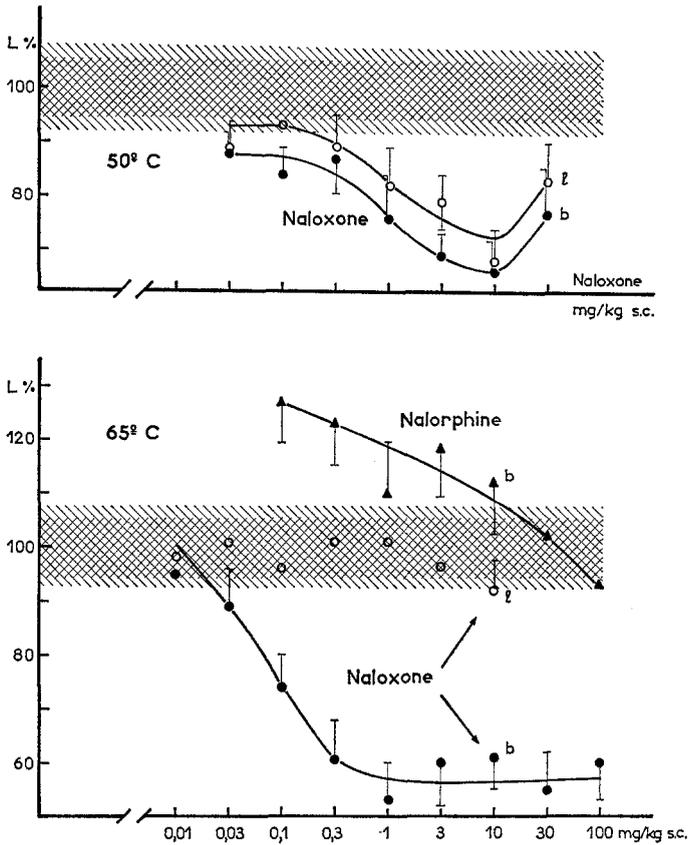


Fig. 2. Facilitations par la naloxone — Comparaison avec la nalorphine. En ordonnée: latence des réactions (en pourcentage des témoins); en abscisse: doses (en mg/kg s.c.). Le produit est injecté 10 min avant l'épreuve. Souris Swiss C — groupes de 20 animaux. Température de la plaque chauffante: en haut 50° C (cut off: 3 min) en bas 65° C (cut off: 1 min, l: temps de lèchement, b: temps de bond. ● et ○: naloxone (latences témoins bond: 50° C: 131 ± 10 sec; 65° C: $37 \pm 2,5$ sec — lèchement: 50° C: $15,4 \pm 1,3$ sec; 65° C: $5,4 \pm 0,3$ sec). ▲ Nalorphine: latences de bond (témoins $32,2 \pm 2,3$ sec). Par souci de clarté, les temps de lèchement après nalorphine, inchangés, n'ont pas été reportés. ▨ Temps de lèchement des contrôles \pm ES; ▩ Temps de bons des contrôles \pm ES.

Réaction de lèchement. Dans la très grande majorité des essais, la latence de la réaction de lèchement n'a pas été modifiée de façon significative; ont fait exception seulement ceux où la température de la plaque chauffante était peu élevée (50° C) une facilitation a alors été observée, progressant avec la dose de naloxone comme le faisait celle du temps de bond (Fig. 2 haut).

Discussion

La naloxone a raccourci la latence de réactions nociceptives chez des souris et chez des rats de diverses souches exposés sur une plaque chauffante. Comme on pouvait l'attendre, son action a été beaucoup plus nette que celle de la nalorphine dont il a été montré qu'elle exerçait une action morphinomimétique qui prédominait à faibles doses et interférerait avec l'effet facilitateur à doses plus élevées.

La netteté du phénomène résulte de l'utilisation de réactions dont la latence normale était relativement longue. Pour le bond, c'était le cas avec toutes les températures de plaque chauffante utilisées (50° C, 55° C, 65° C, et 80° C); pour le lèchement, ce l'était seulement pour celle de 50° C car dès 55° C, la latence des témoins atteint un minimum que ne modifient plus des élévations de la température de la plaque chauffante. Ceci est illustré par la Fig.3 qui montre aussi que la naloxone est capable de mimer les effets d'accroissements *modérés* du stimulus thermoalgésique mais non pas d'accroissements *intenses* même si les doses de naloxone sont augmentées: l'action est alors limitée par un plateau (Figs.1 et 2). Cette limitation pourrait, entre autres, résulter d'interférences de propriétés morphinomimétiques qui, pour faibles qu'elles soient, ne sont cependant pas totalement absentes (Lasagna, 1965; Collier et Schneider, 1969; Jacob et Michaud, 1974). On sait que la naloxone est également incapable de provoquer à elle seule des lèchements ou des sauts chez les animaux normaux.

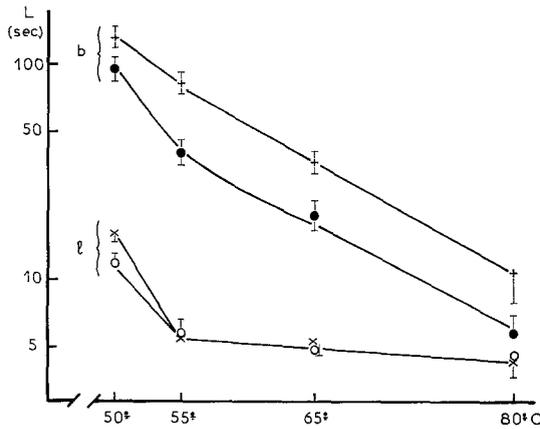


Fig. 3. Effets de la température sur les latences des réactions et facilitations maximales par la naloxone. En ordonnée: latences (en sec) échelle logarithmique. En abscisse: température de la plaque chauffante en ° C. La naloxone est injectée 10 min avant l'épreuve. Groupes de 20 souris pour chaque point. b: latence des bonds; l: latence des lèchements. + et ×: témoins. ● et ○: souris traitées: latences minimales des réactions

L'effet facilitateur a été obtenu avec de très faibles doses de naloxone, ce qui, selon les conceptions généralement admises et défendues en particulier par Lees *et al.* (1972), permet de penser qu'il résulte d'interactions au niveau des récepteurs spécifiques de la morphine.

Bien que les connaissances concernant ces récepteurs et plus encore leurs éventuels ligands naturels soient très pauvres, quelques hypothèses peuvent être formulées.

Tout d'abord, on peut suggérer que la facilitation par la naloxone est un cas particulier de ses propriétés antagonistes, ce qui plaiderait en faveur de l'existence d'un ligand naturel morphinomimétique dont le rôle serait de tempérer les réactions nociceptives. Inversement, la naloxone pourrait mimer un ligand qui serait le médiateur spécifique des influx nociceptifs: il serait alors, comme il a été représenté plus haut, un mimétique imparfait. La facilitation pourrait aussi être en relation avec la multiplication des récepteurs décrite par Pert *et al.* (1974) phénomène qui, comme la facilitation, survient et se dissipe rapidement après une administration unique d'antagoniste. Ces hypothèses ne postulent pas nécessairement une identité des sites actifs pour la naloxone et des ligands naturels qui pourraient se fixer sur d'autres parties de la macromolécule ou de ses associations (allostérie).

Enfin, l'existence d'un tel effet inverse de celui des morphiniques plaide en faveur de la conception, déjà avancée par d'autres auteurs (Villarreal, 1972; Jacob *et al.*, 1974) selon laquelle ce n'est pas seulement en antagonisant la substance morphinique résiduelle que la naloxone précipite des signes d'abstinence chez des animaux morphinisés, signes dont l'évolution chronologique est par ailleurs semblable à celle de l'action décrite ici.

Remerciements. Ce travail a bénéficié d'une aide de l'INSERM (Directeur: Pr. Burg — contrat n° 71452615) et de la DRME (Directeur: Pr. Dubois — contrat n° 72.826).

Références

- Blumberg, H., Daylor, H. B., George, M., Rapoport, D. N.: N-allylnoroxymorphone: A potent narcotic antagonist. *Fed. Proc.* **20**, 311 (1961)
- Cheney, D. L., Indson, B. A., Goldstein, A.: Failure of an opiate to protect mice against naloxone—precipitated abstinence. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **182**, 189—194 (1972)
- Collier, H. O. J., Schneider, C.: Profiles of activity in rodents of some narcotic and narcotic antagonist drugs. *Nature (Lond.)* **224**, 610—612 (1969)
- Foldes, F. F., Lunn, J. N., Moore, J., Brown, I. M.: N-allylnoroxymorphone: A new potent narcotic antagonist. *Amer. J. med. Sci.* **245**, 23—30 (1963)
- Jacob, J. J. C., Barthelemy, C. D., Colombel, M. C., Tremblay, E. C.: Potential usefulness of single dose acute physical dependence on and tolerance to morphine for the evaluation of narcotic antagonists. In: *Narcotic antagonists. Advances in biochemical pharmacology.* M. C. Braude, L. S. Morris, E. L. May, J. P. Smith, and J. E. Villarreal, Eds., Vol. 8, pp. 299—318. New York: Raven Press 1974

- Jacob, J. J. C., Michaud, G. M.: Acute physical dependence in the wake dog after single low dose of morphine. *Psychol. Med.* (in press) (1974)
- Jasinski, D. R., Martin, W. R., Haertzen, C. A.: The human pharmacology and abuse potential of N-allylnoroxymorphone (naloxone). *J. Pharmacol. exp. Ther.* **157**, 420—426 (1967)
- Kosterlitz, H. N., Watt, A. J.: Kinetic parameters of narcotic agonists and antagonists, with particular reference to N-allylnoroxymorphone (naloxone). *Brit. J. Pharmacol.* **33**, 266—276 (1968)
- Lasagna, L.: Drug interaction in the field of analgesic drugs. *Proc. roy. Soc. Med.* **58**, 978—983 (1965)
- Lees, G. M., Kosterlitz, H. W., Waterfield, A. A.: Characteristics of morphine—sensitive release of neurotransmitter substances. In: *Agonist and antagonist actions of narcotic analgesic drugs.* H. W. Kosterlitz, H. O. J. Collier, J. E. Villarreal, Eds., pp. 142—152. London: MacMillan 1971
- McClane, T. K., Martin, W. R.: Effects of morphine, nalorphine, cyclazocine and naloxone on the flexor reflex. *Int. J. Neuropharmacol.* **6**, 89—97 (1967)
- Martin, W. R.: Opioids antagonists. *Pharmacol. Rev.* **79**, 463—521 (1957)
- Pert, C. B., Pasternak, G., Snyder, S. H.: Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain. *Science* **182**, 1359—1361 (1973)
- Villarreal, J. E.: Unpublished communication at the satellite meeting of the 5th Pharmacological Congress. San Francisco 1972
- Wabeke, D., Van Eeden, C.: Handleiding voor de toets van Wilcoxon. *Mathematisch Centrum. Statistische Afdeling.* Amsterdam, July 1955.

Professeur Joseph Jacob
Chef du Service de Pharmacologie
et de Toxicologie
Institut Pasteur
28, rue du Dr. Roux
F-75015 Paris
France