

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**CARACTÉRISATION PHARMACOLOGIQUE DES RÉCEPTEURS
DES KININES ET DES NEUROKININES CHEZ LA SOURIS**

par

SUZANNE NSA ALLOGHO

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade

de Maître ès science (M.Sc.)

20 octobre 1997



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-35745-7

RÉSUMÉ

Caractérisation pharmacologique des récepteurs des kinines et des neurokinines chez la souris.

Par

Suzanne Nsa Allogho

Département de Pharmacologie

Mémoire présenté à la faculté de Médecine en vue
de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

Une étude systématique a été effectuée dans divers segments de l'intestin (duodenum, estomac, iléon, côlon, caecum) et du tractus urogénital (vessie, vas deferens non stimulé) de souris dans le but d'identifier les tissus qui sont sensibles à divers peptides vasoactifs notamment les kinines et les neurokinines. L'estomac de souris possède des sites fonctionnels B₁ et B₂ des kinines et NK-1 et NK-2 des neurokinines. La vessie s'avère être un tissu plus sélectif ne contenant que les sites B₂ des kinines et NK-2 des neurokinines. Les réponses myotropes véhiculées par les récepteurs B₁ sont lentes et réversibles comparativement aux réponses induites par l'activation des récepteurs B₂. Afin de procéder à une caractérisation pharmacologique des récepteurs aux kinines et neurokinines, deux critères de Schild ont été utilisés, à savoir l'ordre de puissance des agonistes (pD₂) et les affinités apparentes des antagonistes (pA₂).

L'ordre de puissance des agonistes sur les récepteurs B₂ de l'estomac et de la vessie de souris est LysBK = BK ≥ [Hyp³]BK > [Aib⁷]BK >>> desArg⁹BK, LysdesArg⁹BK. L'ordre de puissance des agonistes sur le récepteur B₁ de l'estomac de souris est LysdesArg⁹BK = desArg⁹BK = Sar[DPhe⁸]desArg⁹BK, alors que la BK et les autres agonistes B₂ sont inactifs. Ces résultats indiquent que le récepteur B₂ de souris est identique à celui de lapin et que le récepteur B₁ est différent de celui du lapin et de l'homme. Les antagonistes B₂ et B₁ de la première génération tel que respectivement le DArg[Hyp³,DPhe⁷,Leu⁸]BK et le Lys[Leu⁸]desArg⁹BK, agissent comme des agonistes partiels et montrent des activités agonistes résiduelles importantes (αE ≥ 0.5). L'ordre de puissance des antagonistes sur le récepteur B₂ de souris est : HOE 140 ≥ FR-173657 ≥ DArg[Hyp³,DPhe⁷,Leu⁸]BK > DArg[Hyp³,DPhe⁷]BK >> WIN 64338. Cet ordre est semblable à celui établi sur le récepteur B₂ de lapin (insensibilité au WIN 64338). Par contre, l'ordre de puissance établi sur le récepteur B₁ de la souris indique que ce dernier est différent de celui du lapin et montre une affinité semblable envers les trois antagonistes: [Leu⁸]desArg⁹BK = Lys[Leu⁸]desArg⁹BK = AcLys[DβNal⁷,Ile⁸]desArg⁹BK (R-715). Deux nouveaux composés ont été particulièrement caractérisés dans cette étude, notamment le FR 173657 (un antagoniste non peptidique des récepteurs B₂) et le R-715 (un antagoniste du récepteur B₁ obtenu dans nos laboratoires suite aux modifications des structures des antagonistes classiques du récepteur B₁). Grâce à leurs faibles activités agonistes résiduelles (αE = 0-0.16) et leurs fortes affinités (pA₂ entre 7.00 et 8.00), ces deux antagonistes s'avèrent être les composés de choix pour l'étude des récepteurs B₁ et B₂ des kinines chez la souris.

Les récepteurs NK-1 et NK-2 des neurokinines ont aussi été étudiés sur l'estomac de la souris; l'ordre de puissance des agonistes mesuré sur cette préparation est le suivant: Ac[Arg⁶,Sar⁹,Met(O₂)¹¹]SP (6-11) > NKA > SP > [β-Ala⁸]NKA (4-10) > NKB > [MePhe⁷]NKB. Par contre, sur le récepteur NK-2 de la vessie de souris, l'ordre de puissance des agonistes s'établit comme suit: NPγ > NKA > [β-Ala⁸]NKA (4-10) >>> SP, Ac[Arg⁶,Sar⁹,Met(O₂)¹¹]SP (6-11), [MePhe⁷]NKB. Afin de caractériser d'avantage les récepteurs NK-1 et NK-2 de la souris, nous avons testé des antagonistes. L'ordre de puissance des antagonistes des récepteurs NK-1 (RP-67580 > CP-99994) et NK-2 (MEN-10627 > R-396) de souris suggère que le récepteur NK-1 est similaire à celui du rat, alors que le récepteur NK-2 est identique à celui du lapin.

Je dédie cet ouvrage à ma mère, Mme
NDOUTOUME Marie-Geneviève qui m'a
appris le savoir-vivre, le savoir-faire et, m'a
permis d'acquérir la connaissance, ainsi qu'à
mon fils Melvin, qui héritera de cet
enseignement.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent d'abord au Dr Domenico Regoli, mon directeur de recherche, pour la confiance qu'il a témoignée à mon égard en m'intégrant dans sa dynamique équipe. Sans sa patience, ses encouragements et ses judicieux conseils, je n'aurais pu mener à bien cette recherche.

Je remercie également Dr Daniel Lamontagne du département de physiologie de l'Université de Montréal, et Dr Pedro D'Orléans-Juste du département de pharmacologie de l'Université de Sherbrooke pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Je tiens à adresser un merci spécial à Mr Fernand Gobeil pour m'avoir enseigné les techniques de base dans mon domaine de recherche, pour sa grande disponibilité, sa collaboration et nos discussions enrichissantes. Je remercie également les autres membres du laboratoire Cathérine Filteau, Pierrette Perreault, Stéphan Perron, Leng Hong Pheng, X.K Nguyen-Le, Wiltold Neugebauer et Martin Boussougou pour leur aide et leur agréable compagnie.

Finalement, je voudrais remercier tous ceux et celles qui ont participé de près ou de loin à ma formation académique, ma famille et mes amis (ies) et à leurs incessants encouragements, mon ami Amédée Kondji-Nyamat et notre fils Melvin-Fabien Kondji-Nyamat pour leur amour et leur soutien moral.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTES DES ILLUSTRATIONS	ix
LISTES DES TABLEAUX	xi
1- INTRODUCTION	1
1-1 Les kinines.....	1
1-1.1 Biosynthèse et dégradation.....	1
1-1.2 Hétérogénéité des récepteurs des kinines.....	3
1-1.2a Données pharmacologiques.....	3
Récepteur de type B ₁	3
Récepteur de type B ₂	5
1-1.2b Données moléculaires.....	6
1-1.3 Les mécanismes d'action des kinines.....	9
1-1.4 Effets biologiques des kinines.....	10
1-2 Les neurokinines.....	12
1-2.1 Biosynthèse et dégradation.....	12
1-2.2 Hétérogénéité des récepteurs des neurokinines.....	14
1-2.2a Le récepteur NK-1.....	14
1-2.2b Le récepteur NK-2.....	15
1-2.2c Le récepteur NK-3.....	17
1-2.3 Les effets biologiques des neurokinines.....	19
1-3 La rationnelle de l'étude.....	20

1-4	Les buts de l'étude.....	20
2-	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	21
2-1	Animaux utilisés.....	21
2-2	Méthodologie expérimentale.....	21
2-3	Préparation des tissus isolés.....	22
2-3.1	Estomac de souris.....	22
2-3.2	Vessie de souris.....	22
2-4	Protocoles expérimentaux.....	23
2-4.1	Évaluation des effets contractiles des différents peptides : kinines, neurokinines, et leurs fragments et analogues.....	23
2-4.2	Étude du métabolisme <i>in vitro</i> des kinines et des neurokinines.....	24
2-4.3	Détermination de l'affinité des agonistes (pD ₂).....	24
2-4.4	Détermination des affinités apparentes des antagonistes (pA ₂).....	25
2-4.5	Étude de la compétitivité du FR 173657, de HOE 140 et du R 715 par la méthode de la régression linéaire.....	25
2-4.6	Étude de la spécificité et de la sélectivité du FR 173657 et du R 715.....	26
2-4.7	Étude de la réversibilité et de la durée d'action du FR 173657, de HOE 140 et du R 715.....	26
2-5	Paramètres pharmacologiques.....	27
2-5.1	Affinité apparente des agonistes.....	27

2-5.2	Affinité relative des composés.....	27
2-5.3	Activité intrinsèque des composés.....	27
2-5.4	Affinité apparente des antagonistes.....	27
2-6	Calculs et évaluation statistiques des données.....	28
3-	RÉSULTATS.....	33
3-1	Récepteurs des kinines.....	33
3-1.1	Effets de la bradykinine et de la desArg ⁹ BK sur les tissus de souris normales.....	33
3-1.2	Étude du métabolisme des kinines (BK et desArg ⁹ BK) sur l'estomac et la vessie de souris.....	36
3-1.2a	Effet du captopril.....	36
3-1.2b	Effet du mergetpa.....	36
3-1.3	Spécificité de l'action myotrope des kinines sur l'estomac et la vessie de souris.....	41
3-1.4	Sélectivité des agonistes BK et desArg ⁹ BK sur leurs récepteurs respectifs.....	43
3-1.5	Différence dans le profil de contraction des réponses induites par la BK et la desArg ⁹ BK sur l'estomac de souris.....	45
3-1.6	Caractérisation des récepteurs de kinines par les critères de Schild.....	45
3-1.6a	Ordre de puissance des agonistes des récepteurs B ₁ et B ₂	48
3-1.6b	Caractérisation des récepteurs des kinines par	

les antagonistes.....	50
3-1.7 Étude des effets agonistes résiduels des antagonistes DArg[Hyp ³ , DPhe ⁷]BK et [LEU ⁸]desArg ⁹ BK sur l'estomac de souris.....	53
3-1.8 Étude de la nature de la compétitivité des antagonistes FR 173657, de HOE 140 et du R 715 par la méthode de la régression linéaire de Schild sur l'estomac de souris.....	55
3-1.9 Étude de la durée d'action et de la réversibilité du FR 173657, de HOE 140 et du R 715 sur l'estomac de souris.....	61
3-1.10 Étude de la spécificité des nouveaux composés R 715 et FR 173657 sur l'estomac de souris.....	61
3-2. Les neurokinines et leurs récepteurs chez la souris.....	65
3-2.1 Effets des neurokinines sur l'estomac et la vessie de souris.....	65
3-2.2 Études des récepteurs des neurokinines sur l'estomac de souris.....	70
3-2.2a Caractérisation du récepteur NK-1 par les deux critères de Schild.....	70
Ordre de puissance des agonistes sur les récepteurs de type NK-1.....	70
Affinités apparentes (pA ₂) des antagonistes du	

récepteur NK-1.....	73
3-2.2b Caractérisation du récepteur NK-2 par les deux	
critères de Schild.....	73
Ordre de puissance des agonistes :	
neurokinine A et ses congénères sur le	
récepteur de type NK-2.....	73
Affinités apparentes (pA_2) des antagonistes du	
récepteur NK-2.....	77
3-2.2c Ordre de puissance des agonistes du récepteur	
NK-3 : neurokinine B, [MePhe ⁷]NKB et	
senktide.....	79
3-2.2d Affinités apparentes(pA_2) des antagonistes des	
récepteurs NK-3.....	81
3-2.3 Études des récepteurs des neurokinines sur la	
vessie de souris par les deux critères de Schild.....	81
3-2.3a Ordre de puissance des agonistes des	
récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3.....	81
3-2.3b Affinités apparentes (pA_2) des antagonistes des	
récepteurs NK-1, NK-2, et NK-3.....	82
4- DISCUSSION.....	83
4-1 Caractérisation et classification du récepteur B ₂	
de la souris.....	86
4-2 Caractérisation et classification du récepteur B ₁	
de la souris.....	89

4-3	Caractérisation et classification des récepteurs	
	NK-1, et NK-2 de la souris.....	94
5-	CONCLUSION	99
6-	BIBLIOGRAPHIE	102
7-	ANNEXE	126

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 :	Comparaison de la séquence en acides aminés des récepteurs B ₁ et B ₂ de l'homme.....	8
Figure 2 :	Comparaison des séquences en acides aminés des récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3 de l'homme.....	18
Figure 3 :	Etude des effets dose-dépendants des kinines sur les tissus de souris.....	34
Figure 4A :	Courbe concentration-réponse de la BK obtenue en absence et en présence du captopril (10 ⁻⁶ M) sur l'estomac de souris.....	37
Figure 4B :	Courbe concentration-réponse de la desArg ⁹ BK obtenue en absence et en présence du captopril (10 ⁻⁶ M) sur l'estomac de souris.....	37
Figure 5 :	Courbe concentration-réponse de la BK obtenue en absence et en présence du captopril (10 ⁻⁶ M) sur la vessie de souris.....	39
Figure 6 :	Effets myotropes, en fonction du temps, induits par la BK (5.10 ⁻⁹ M), l'Ach (0.5 µM) et la desArg ⁹ BK (3.10 ⁻⁸ M) sur l'estomac de souris traité au captopril (10 ⁻⁶ M).....	44
Figure 7 :	Tracés montrant les effets myotropes de la BK (5.10 ⁻⁹ M) et de la desArg ⁹ BK (3.10 ⁻⁸ M) sur l'estomac de souris.....	46
Figure 8 :	Effets de HOE 140 (3.88 10 ⁻⁸ M), un anti-B ₂ , de R-715 (8,75 10 ⁻⁶ M), un anti-B ₁ et de mergetpa (4,2 10 ⁻⁵ M), un inhibiteur de la carboxypeptidase M (et N), sur les	

activités agonistes résiduelles de DAR[Hyp ³ , DPhe ⁷]BK (2.10 ⁻⁷ M) et de [Leu ⁸]desArg ⁹ BK (2,87 10 ⁻⁷ M) sur l'estomac de souris.....	54
Figure 9A-C: Régression linéaire de Schild du composé non peptidique FR 173657 sur l'estomac de souris.....	57
Figure 9B-D: Régression linéaire de Schild du composé HOE 140 sur l'estomac de souris.....	57
Figure 10: Régression linéaire de Schild du composé R-715 sur l'estomac de souris.....	59
Figure 11 : Étude comparative de la durée d'action et de la réversibilité des composés HOE 140, FR 173657 et de R-715 sur l'estomac de souris.....	62
Figure 12A: Tracés montrant les effets myotropes induits par Ac[Arg ⁶ , Sar ⁹ , Met(O ₂) ¹¹]SP (6-11) sur le récepteur NK-1 de souris.....	67
Figure 12B: Tracés montrant les effets myotropes induits par [β-Ala ⁸] NKA (4-10) sur le récepteur NK-2 de l'estomac de souris.....	67
Figure 13A: Courbe concentration-réponse de Ac[Arg ⁶ , Sar ⁹ , Met(O ₂) ¹¹] SP (6-11) en absence et en présence de SR 140333 (150 nM) et de SR 48968 (418 nM) respectivement sur l'estomac de souris.....	68
Figure 13B : Courbe concentration-réponse de [β-Ala ⁸]NKA (4-10) en absence et en présence de SR 140333 (416 nM) et de SR 48968 (167 nM) respectivement sur l'estomac de souris.....	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Structures primaires des peptides naturels utilisés dans cette étude.....	29
Tableau II :	Liste des composés pharmacologiques utilisés dans cette étude.....	30
Tableau III :	Affinités apparentes (pD_2) et effet maximal (E_{max}) de la BK et de la desArg ⁹ BK obtenue en absence et en présence de captopril (10^{-6} M) sur l'estomac et la vessie de souris.....	40
Tableau IV :	Effets des différents traitements pharmacologiques sur les réponses myogéniques induites par la BK, la desArg ⁹ BK, l'histamine et l'acétylcholine sur l'estomac et la vessie de souris.....	42
Tableau V :	Profils pharmacologiques <i>in vitro</i> des agonistes des récepteurs B ₁ et B ₂ des kinines sur les tissus de souris.....	49
Tableau VI :	Profils pharmacologiques <i>in vitro</i> des antagonistes des récepteurs B ₁ et B ₂ des kinines sur les tissus de souris.....	51
Tableau VII :	Spécificité d'action des nouveaux antagonistes AcLys[DβNaI ⁷ , Ile ⁸]desArg ⁹ BK (R-715) et de FR 173657 sur les récepteurs des kinines de l'estomac de souris.....	64
Tableau VIII :	Affinités apparentes (pD_2) de la substance P et de ses analogues sur les récepteurs NK-1 de souris.....	71
Tableau IX :	Affinités apparentes (pA_2) des antagonistes du récepteur	

NK-1 de souris.....	72
Tableau X : Affinités apparentes (pD_2) de la neurokinine A et de ses analogues sur les récepteurs NK-2 de souris.....	75
Tableau XI : Affinités apparentes (pA_2) des antagonistes du récepteur NK-2 de souris.....	76
Tableau XII : Affinités apparentes (pD_2) de la neurokinine B et de ses analogues sur les récepteurs NK-3 de souris.....	78
Tableau XIII: Affinités apparentes (pA_2) des antagonistes du récepteur NK-3 de souris.....	80

1- INTRODUCTION

1-1 LES KININES

Les kinines sont des peptides naturels dont le plus connu est le nonapeptide bradykinine (BK). Les kinines résultent de l'hydrolyse de deux substrats (kininogènes) par au moins deux protéases à sérine, les kallibréines plasmatique et tissulaire. Les kinines sont métabolisées par de nombreuses kininases, dont la plus connue, la kininase II, n'est autre que l'enzyme de conversion de l'angiotensine I.

1-1.1 Biosynthèse et dégradation

Pendant de nombreuses années, on a distingué deux systèmes kinine-kallibréine: un plasmatique et un tissulaire. En fait, il n'existe que deux enzymes kallibréines qui présentent des localisations, des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles bien distinctes (Bhoola *et al.*, 1992): la kallibréine plasmatique (MM: 60kDa) synthétisée par le foie, et les kallibréines tissulaires (MM entre 24 et 48 kDa) principalement synthétisées par le pancréas, le rein, l'intestin, le cerveau, les glandes sous-maxillaires et sudoripares. La kallibréine plasmatique est codée par un seul gène, alors que les kallibréines tissulaires appartiennent à une famille multigénique et sont codées par plusieurs gènes, localisés chez l'homme sur le chromosome 19 (Clements, 1989). Toutes deux hydrolysent, avec des affinités différentes, le kininogène de haut et de bas poids moléculaire. Les kininogènes de haut et de bas poids moléculaire, synthétisés dans le foie, proviennent de l'épissage alternatif d'un seul gène (Bhoola *et al.*, 1992) et présentent des variations de séquence en fonction des espèces. En conséquence, on observe également des variations interspécifiques dans la séquence peptidique des kinines. Chez l'homme et le boeuf, existent deux kinines principales: la

peptidique des kinines. Chez l'homme et le boeuf, existent deux kinines principales: la kallidine ou lys-bradykinine (lys-BK) qui est un décapeptide natif issu de l'action de la kallibréine tissulaire, la bradykinine (BK) qui est un nonapeptide (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), issue de la kallibréine plasmatique. Chez le rat, on trouve aussi une kinine spécifique du rat, la Ile-Ser-BK, aussi appelé T-kinine (Bhoola *et al.*, 1992). Celle-ci est libérée à partir d'un kininogène (le t-kininogène), identifié seulement chez le rat et hydrolysable uniquement par la trypsine (Bhoola *et al.*, 1992).

La demi-vie plasmatique des kinines est estimée à environ 15 secondes. Les principales enzymes dégradant les kinines sont la kininase I, également connue sous le nom de carboxypeptidase N (CPN dans le plasma) ou encore carboxypeptidase M (CPM sur la membrane plasmique). Ces enzymes libèrent la desArg⁹BK à partir de la BK et la LysdesArg⁹BK à partir de la kallidine: les deux fragments sont biologiquement actifs. La kininase II, plus connue sous le nom d'enzyme de conversion de l'angiotensine I, dégrade les kinines en fragments BK1-7 et LysBK1-7 qui sont inactifs, la kininase II assure également la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. Cette enzyme de conversion a une plus grande affinité pour la BK que pour l'angiotensine I (Jaspard *et al.*, 1993).

La rapidité d'inactivation des kinines par les kininases, laisse supposer que les concentrations des kinines qui sont présentes dans la circulation ne seraient suffisantes à activer les récepteurs éloignés. Ainsi s'est dessiné un concept d'action locale de type autocrine ou paracrine. Au niveau vasculaire, un ensemble de travaux suggère que la cellule endothéliale serait capable de produire de la BK (Bhoola *et al.*, 1992; Corvol *et al.*, 1993). Ces cellules favoriseraient la production de BK, grâce à la présence de sites de fixation du kininogène, sur lequel les kallibréines plasmatiques agiraient

(Hasan *et al.*, 1994). La BK serait ainsi libérée à proximité des récepteurs de l'endothélium, probablement en quantité suffisante pour leur activation.

1-1.2 Hétérogénéité des récepteurs des kinines

1-1.2a Données pharmacologiques

En 1980, D. Regoli et J. Barabé (Regoli *et al.*, 1980) proposaient l'existence de deux récepteurs de la BK sur des bases exclusivement pharmacologiques, à savoir, l'ordre de puissance des agonistes BK et desArg⁹BK sur l'aorte (desArg⁹BK > BK) et la veine jugulaire (BK > desArg⁹BK) de lapin, et le profil pharmacologique de l'antagoniste [Leu⁸]desArg⁹BK sur ces deux tissus (inactif sur la veine jugulaire et puissant sur l'aorte de lapin): Par la suite, grâce aux nombreuses études de structure-activité sur la contraction de différentes préparations vasculaires, ces auteurs distinguèrent deux types de récepteurs, qu'ils nommèrent B₁ et B₂ (B désignant la bradykinine).

Récepteurs de type B₁

Le récepteur B₁, d'abord identifié sur l'aorte et la veine mésentérique de lapin, est activé préférentiellement par la desArg⁹BK mais également par la BK avec une moindre efficacité, en fait, la BK perd cet effet en présence de mergetpa, un inhibiteur de la carboxypeptidase N ou M. Pendant de nombreuses années, le récepteur B₁ est apparu comme une curiosité d'espèces n'ayant été étudié que sur l'aorte de lapin.

Cependant, une expression de ce type de récepteur est souvent retrouvée dans des conditions physiopathologiques sur différents types cellulaires (muscles lisses, fibroblastes, macrophages, lymphocytes T ...etc.). La synthèse de ce type de récepteur est activée suite à une infection bactérienne, ou par certains traumatismes causés aux

tissus (Marceau et Regoli, 1991). En effet, la synthèse *de novo* des récepteurs B₁ a été reportée d'abord *in vitro* (suite à une incubation (37°C) prolongée des bandelettes d'aorte isolé de lapin) (Regoli *et al.*, 1977, Regoli *et al.*, 1978), puis *in vivo* après un traitement des animaux avec la lipopolysaccharide (LPS) bactérienne (Regoli *et al.*, 1981) et dans les modèles d'arthrite chez les animaux (Farmer *et al.*, 1991). Les études *in vitro* suggèrent l'implication des cytokines, telles que l'interleukine-1 (IL-1) et IL-2, comme les médiateurs qui induisent l'expression des récepteurs B₁ (Deblois *et al.*, 1988, Deblois *et al.*, 1989). Ainsi, l'activation des récepteurs B₁ sur les macrophages de souris provoque la libération des cytokines (Burch *et al.*, 1989, Tiffany *et al.*, 1989). Récemment, il a été montré que le [Leu⁸]desArg⁹BK, un antagoniste des récepteurs B₁, réduit significativement l'hyperalgésie dans les modèles d'inflammation chronique chez les animaux (Dray and Perkins, 1993; Perkins and Kelly, 1993; Perkins *et al.*, 1993), ce qui est une évidence de l'implication des récepteurs B₁ dans la pathophysiologie de l'inflammation chronique.

La distribution des récepteurs B₁, initialement démontré dans plusieurs lits vasculaires (rénal et mésentérique, surtout sur les tissus du lapin) a été aussi mise en évidence dans d'autres tissus et dans d'autres espèces, notamment chez l'homme (Burch *et al.*, 1995). Les récepteurs B₁ se manifestent dans différents types cellulaires en culture où ils entraînent la mobilisation du calcium intracellulaire et stimulent la prolifération cellulaire (Burch *et al.*, 1995; Bascand *et al.*, 1993). Par ailleurs, la comparaison des effets de la BK et de la desArg⁹BK sur le calcium libre intracellulaire, a permis de mettre en évidence la coexistence des deux types de récepteurs B₁ et B₂ sur la cellule mésangiale de rat (Bascand *et al.*, 1993). La coexistence des récepteurs B₁ et B₂ est aussi retrouvée dans plusieurs autres types cellulaires ().

L'activation des récepteurs B₁ par l'agoniste sélectif, la desArg⁹BK, produit des effets divers selon le tissu. Ces effets sont: la relaxation des tissus via des mécanismes endothélium-dépendant (la veine mésentérique de chien (Toda *et al.*, 1987) et l'artère coeliaque de lapin (Ritter *et al.*, 1989) ou des mécanismes endothélium-indépendant (l'artère rénale de chien (Rhaleb *et al.*, 1989); et la contraction des tissus suite à des effets directs sur les muscles lisses (l'aorte de lapin (Regoli *et al.*, 1980; Marceau *et al.*, 1983). D'autres effets tels que: la stimulation de la synthèse protéique et de la division cellulaire au niveau des fibroblastes pulmonaires (Goldstein et Wall, 1984), la production et la libération de certaines prostaglandines, de facteur d'activation plaquettaire (PAF), de facteur relaxant dépendant de l'endothelium (EDRF) (voire revue de Hall (1992)), et la libération de TNF α et de IL-1 par les macrophages (Tiffany, 1989; Bathon, 1992), sont obtenus après la stimulation des récepteurs B₁ par la desArg⁹BK.

Récepteurs de type B₂

Les récepteurs B₂, qui ont été les plus étudiés, sont présents dans un grand nombre de tissus en quantité plus élevée que les récepteurs B₁. Cependant, de nombreuses études pharmacologiques, utilisant des agonistes et des antagonistes suggèrent l'existence de sous-types de récepteurs B₂ (Gobeil. F, 1994). Plus récemment, Regoli et al. (Regoli *et al.*, 1994) ont distingué deux sous-types du récepteur B₂: le récepteur B_{2rb} ou B_{2A} (veine jugulaire de lapin) et B_{2gp} ou B_{2B} (iléon de cobaye), indiquant que l'hétérogénéité des récepteurs B₂ semble être associée à des différences d'espèces. Enfin, certains auteurs ont même proposé, uniquement sur la

base des effets des antagonistes, l'existence de récepteurs de type B₃, B₄ et B₅ (Stewart, 1995), qui n'a jamais été confirmée à l'échelle moléculaire.

Les récepteurs B₂ sont responsables de la majorité des effets biologiques des kinines, à savoir: la vasodilatation artérielle (Furchgott, 1981), l'extravasation plasmatique (Gabbiani *et al.*, 1970), la vénoconstriction (Regoli et Barabé, 1980), l'activation des fibres sensorielles (Steranka *et al.*, 1988) qui, dans certains cas, activent les réflexes cardiovasculaires, la stimulation la relâche de prostaglandines, d'EDRF à partir des cellules endothéliales (D'Orléans-Juste *et al.*, 1989), de la noradrénaline à partir des terminaisons nerveuses et de la glande surrénale (Tousignant *et al.*, 1987) et d'autres agents endogènes tels que l'histamine, l'acétylcholine, les purines, la substance P (Regoli et Barabé, 1980; Hall, 1992).

1-1.2b Les données moléculaires

L'utilisation des ligands radioactifs, en général des agonistes tritiés ou iodés, a permis de distinguer et de quantifier les deux types de récepteurs B₁ et B₂. De façon tout à fait remarquable, le clonage des ADNc et des gènes des récepteurs de la BK a confirmé, près de 15 ans plus tard, leur classification pharmacologique. Ainsi, les ADNc codant pour le récepteur B₂ de rat (McEachern *et al.*, 1991) de l'homme (Hess *et al.*, 1992), du lapin (Bacharov, 1995), et de la souris (Hess, 1996) ont été isolés. L'ADNc codant pour le récepteur B₁ de l'homme a été décrit plus récemment (Menke *et al.*, 1994) de même que celui de la souris, du rat (Pesquero, 1996) et du lapin (MacNeil, 1995). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Les récepteurs B₂ du rat et de l'homme sont composés respectivement de 366 et 364 acides aminés (avec 81 %

d'homologie), tandis que le récepteur B₁ de l'homme est composé de 353 acides aminés et présente 36% d'homologie avec le récepteur B₂ humain (figure 1).

Les expériences de mutagenèse dirigée ont permis de déterminer les acides aminés impliqués dans la reconnaissance des agonistes et des antagonistes (Burch *et al.*, 1995). Ces travaux ont surtout montré que le site de liaison de la BK est différent des sites de liaison des antagonistes. La création récente (Borkowski *et al.*, 1995) d'une souche de souris transgéniques n'exprimant plus le récepteur B₂ confirme l'existence d'un seul gène codant pour ce récepteur. La BK pouvant activer les deux types de récepteurs B₁ et B₂, ces animaux transgéniques seront un excellent modèle d'étude des effets physiologiques du récepteur B₁.

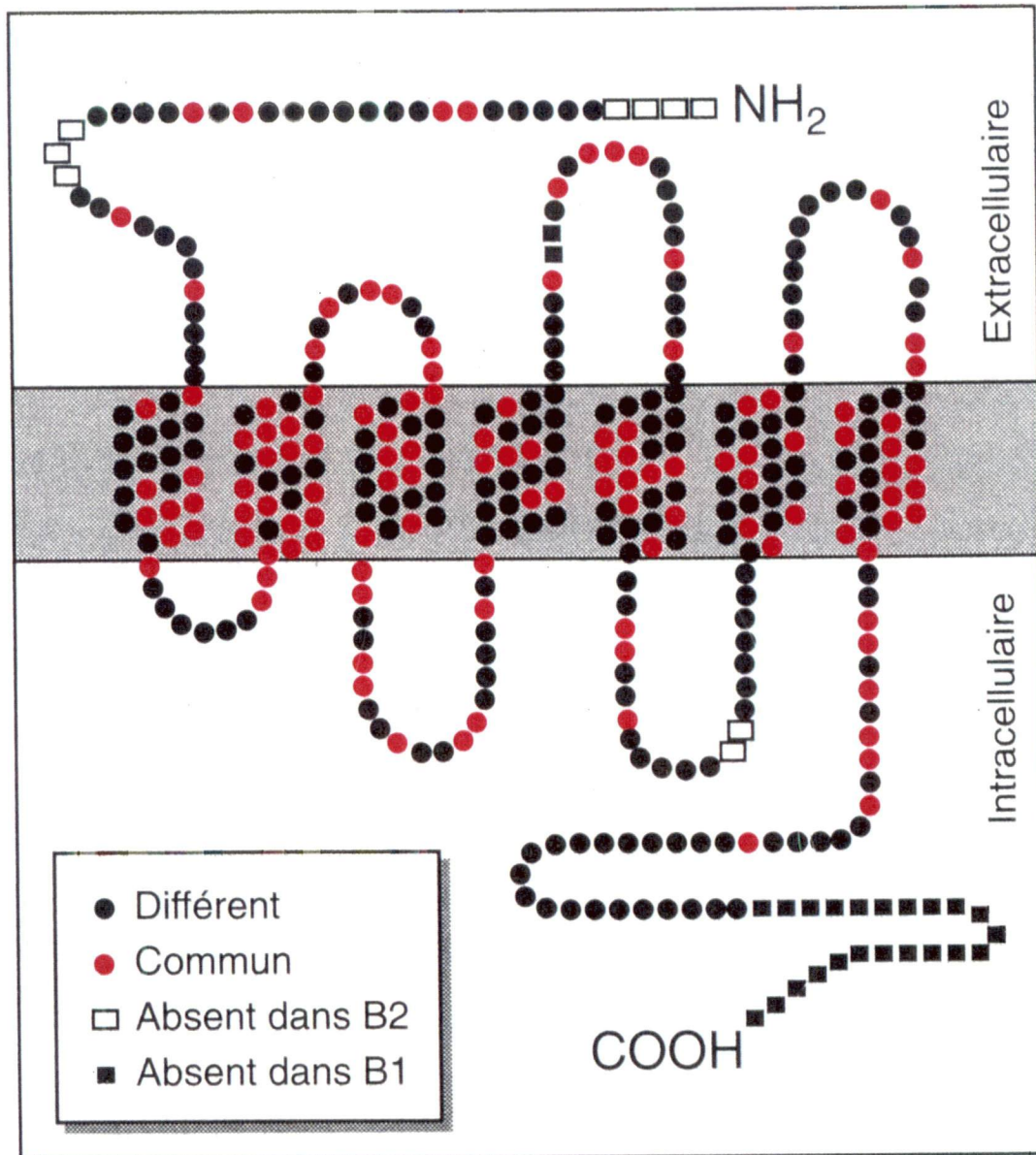


Figure 1. *Comparaison de la séquence en acides aminés des récepteurs B1 et B2 chez l'homme.*

1-1.3 Les mécanismes d'action des kinines (seconds messagers)

Alors que de nombreux travaux montrent finalement que la BK stimule la totalité des voies de signalisation connues dans l'ensemble des types cellulaires étudiés (Burch *et al.*, 1995; Hall, 1992), la nature des protéines G impliquées est moins bien connue. Dans la majorité des cas, l'activation de la phospholipase C (PLC) par la BK est insensible au traitement par la toxine pertussique alors que l'activation de la phospholipase A2 (PLA2) est, au contraire, le plus souvent inhibée indiquant un couplage du récepteur B₂ à une protéine de type Gi. La stimulation du récepteur B₂, dans presque tous les types cellulaires étudiés (cellules épithéliales, fibroblastes, cellules de neuroblastomes, cellules mésangiales, cellules musculaires lisses), conduit à l'activation de la voie de la PLC suivie de la formation d'inositol phosphate et de diacyl-glycérol. La BK entraîne une libération biphasique du calcium intracellulaire: une phase rapide et transitoire provenant de la libération du calcium du réticulum endoplasmique, et une phase plus lente et soutenue, associée à l'activation de canaux calciques (cette dernière est inhibée par le chlorure de nickel, bloqueur de canaux calciques de type T, tandis que les bloqueurs de canaux calciques de type L sont sans effet (Burch *et al.*, 1995; Bascand *et al.*, 1993) . Dans plusieurs tissus, la BK stimule la libération de différentes prostaglandines, leucotriènes, d'acides hydroxyéicosatétraénoïques (HETEs) et du facteur d'activation plaquettaire (PAF) via l'activation de la phospholipase A2 (Burch et Axelrod, 1987) . En ce qui concerne les relations avec l'adénylate cyclase, la BK est capable de stimuler indirectement la production d'AMPc dans les fibroblastes par l'intermédiaire des prostaglandines E2 agissant de façon autocrine (Burch *et al.*, 1995).

Bien que les mécanismes de transduction mis en jeu par l'activation du récepteur B₁ soient moins bien connus, ils ne semblent finalement pas très différents de ceux du récepteur B₂. La desArg⁹BK stimule la synthèse de prostaglandines par les cellules fibroblastiques, les cellules endothéliales et les ostéoblastes (Burch *et al.*, 1995; Hall, 1992). La desArg⁹BK élève également la concentration du calcium intracellulaire. Cependant, alors que l'activation du récepteur B₂ mobilise préférentiellement le calcium à partir des réserves intracellulaires, l'activation du récepteur B₁ semble être associée à un influx de calcium plus important qui est inhibé par le chlorure de nickel mais inaltéré par les antagonistes des canaux calciques de type L. L'identité de ces canaux, ainsi que le mécanisme contrôlant leur ouverture restent à déterminer (Bascand et Girolami., 1996).

1-1.4 Effets biologiques des kinines

C'est principalement pour son effet vasodépresseur sur le système cardiovasculaire que la BK est connue. De nombreux travaux montrent que la perfusion de la BK entraîne une forte diminution de la pression sanguine artérielle (Linz *et al.*, 1995). Cet effet pharmacologique est renforcé par l'utilisation des antagonistes qui bloquent l'activité vasodépressive du récepteur de type B₂. Le mécanisme d'action de cet effet est bien connu et repose sur la production, par la cellule endothéliale, de substances vasodilatatrices (prostaglandines, NO, EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor)) qui, par diffusion, vont relaxer la cellule musculaire lisse sous-jacente (Mombouli *et al.*, 1995; Linz *et al.*, 1995).

La BK aurait une action anti-proliférative sur les cellules du muscles lisses vasculaires grâce à l'activation des voies métaboliques bénéfiques telles que la

production d'ATP et de la phosphocréatine et à la stimulation du transport du glucose. Cet effet protecteur de l'intégrité de la paroi vasculaire est également à rapprocher de l'effet protecteur de la BK contre l'ischémie myocardique (Linz *et al.*, 1995). En revanche, plusieurs travaux effectués sur des cellules en culture montrent que la BK peut entraîner une contraction des cellules musculaires lisses par action directe sur la monocouche endothéliale, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité des capillaires et explique le rôle de la BK dans la formation des oedèmes (Hall, 1992).

Au niveau rénal, la perfusion de la BK dans l'artère rénale entraîne une augmentation du débit sanguin produite par la contraction des cellules mésangiales rénales et une diminution de la résistance artériole afférente. La BK a des propriétés diurétiques et natriurétiques: Les études de Lortie *et al.*, (1992) suggèrent que le récepteur B₁ serait responsable des réponses natriurétiques, tandis que la stimulation du récepteur B₂ produirait la diurèse (en inhibant la formation d'AMPc induite par l'hormone antidiurétique (Dixon *et al.*, 1989)).

Le rôle des kinines dans le système nerveux a fait l'objet d'une revue récente (Walkers *et al.*, 1995). Au niveau périphérique, la BK stimule les terminaisons nerveuses des fibres C impliquées dans la transmission d'influx liée à la nociception. Au niveau du système nerveux central, la BK produit une vasodilatation *via* les prostaglandines et le NO, une augmentation de la pression sanguine artérielle et une élévation de la fréquence cardiaque par stimulation des récepteurs B₂ (*via* la libération de la noradrénaline et de la sérotonine).

Au niveau du système pulmonaire, la BK entraîne, dans la plupart des espèces, une bronchoconstriction *via* la stimulation des fibres nerveuses libérant l'ACh et une

augmentation de la sécrétion de mucus. D'où son implication probable dans les maladies inflammatoires des voies aériennes.

L'effet des kinines sur le système gastro-intestinal repose essentiellement sur son action motrice sur les muscles lisses *via* la libération des prostaglandines et du monoxyde d'azote. La BK stimule principalement la sécrétion de chlorure au niveau de l'épithélium (Bhoola *et al.*, 1992; Hall, 1992).

La deuxième catégorie de peptides analysés dans la présente étude comprend les neurokinines: la substance P (SP) et les neurokinines A (NKA) et B (NKB) (Tableau 1).

1-2 LES NEUROKININES

La famille des tachykinines est constituée de peptides biologiquement actifs caractérisés par la séquence d'acides aminés Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ du côté c-terminal de la molécule. La SP (un endécapeptide), découverte en 1931 par Von Euler et Gaddum dans des extraits bruts de l'intestin et du cerveau de cheval en est le membre le mieux connu et le plus étudié grâce à son rôle potentiel dans la transmission de la douleur (Jessel et Iversen, 1977; Henry, 1982; Cuello, 1987) et dans l'inflammation (Marley et Livett, 1985; Cuello, 1987).

1-2.1 Biosynthèse et dégradation

Les neurokinines forment un groupe de neuropeptides exprimés dans les cellules du système nerveux sous forme de précurseurs dits prépotachykinines : Ces précurseurs subissent un processus de maturation et sont emmagasinés dans de larges granules au niveau des terminaisons nerveuses (Deacon *et al.*, 1987). Les gènes

responsables de la biosynthèse de la SP et de la NKA ont été décrits il y a peu de temps (Nakanishi, 1986; Bonner *et al.*, 1987; Krause *et al.*, 1987). Chez le boeuf, un seul gène est responsable de la production de la SP et de la NKA. Durant la traduction de l'acide désoxyribonucléique (ADN) en acide ribonucléique (ARNm), il y a production de trois ARNm à partir du même gène; ainsi trois différentes préhormones sont générées respectivement: L'alpha-préprotachykinine A (α PPT-A), la bêta-préprotachykinine A (β PPT-A) et la gamma-préprotachykinine A (γ PPT-A); les deux dernières préprotachykinines donnent la SP et la NKA (ainsi que les peptides apparentés de la NKA soit le NPK et le NP γ). Ces observations suggèrent fortement que les deux neurokinines sont générées et probablement libérées simultanément (Nakanishi, 1986, 1987; Ohkubo et Nakanishi, 1991).

La troisième neurokinine retrouvée chez les mammifères, la neurokinine B, est exprimée chez le boeuf dans un gène différent du précédent et génère la prépotachykinine B (Kotani *et al.*, 1986). La traduction de l'ADN en ARNm donne naissance à deux ARNm similaires. Les deux ARNm codent pour la même séquence, la prépotachykinine B. Lorsque l'on compare la PPT-A responsable de la production de la SP et de la NKA, avec la PPT-B responsable de la production de la NKB, on s'aperçoit que les deux gènes ont des organisations intron-exon identiques et ont des séquences très similaires (Bonner *et al.*, 1987; Krause *et al.*, 1987).

La maturation des prépotachykinines en protachykinines et, par après, en peptides actifs a besoin d'un clivage typique au niveau des sites Lys-Arg, Lys-Lys ou Arg-Arg par des enzymes protéolytiques nommés convertases (Chrétien *et al.*, 1989; Steiner *et al.*, 1993; Marcinkiewicz *et al.*, 1993). Les neurokinines sont stockées dans les granules et relâchées suite à une stimulation du neurone qui les génère.

1-2.2 Hétérogénéité des récepteurs des neurokinines

Trois types de récepteurs différents ont été décrits et caractérisés dans une variété d'organes isolés et de préparations, en utilisant des méthodes biochimiques et pharmacologiques (Buck *et al.*, 1984; Regoli *et al.*, 1985). Pendant plusieurs années, différentes nomenclatures ont été proposées pour les récepteurs des neurokinines. Après le Symposium de Montréal (Henry, 1987), on désigne par NK-1 le récepteur pour la SP, NK-2 le récepteur de la NKA et NK-3 pour le récepteur de la NKB. L'identification des trois types de récepteurs a été faite en utilisant comme critère l'ordre de puissance des agonistes particulièrement des trois neurokinines naturelles: la SP, la NKA et la NKB. Quelques analogues sélectifs pour l'un ou l'autre type de récepteurs ont été identifiés (Drapeau *et al.*, 1987) et utilisés pour décrire les profils des activités biologiques dans les organes isolés et dans les essais biochimiques de liaison. Enfin, des antagonistes spécifiques et sélectifs ont permis de valider la classification des récepteurs (Regoli *et al.*, 1994)

1-2.2a Le récepteur NK-1

Le récepteur NK-1 se caractérise par son affinité préférentielle pour la SP. La NKA et la NKB sont assez actives sur ce récepteur tel que démontré sur la carotide de chien et le muscle lisse de l'iléon de cobaye (Regoli *et al.*, 1988). Ces résultats démontrent que la non-sélectivité de la SP et des neurokinines est probablement due au fait qu'elles partagent la même séquence C-terminale Phe-X-Gly-Leu-MetNH₂. Des modifications en position 9 et 11 de la SP ([Sar⁹, Met(O₂)¹¹]SP) ou de l'hexapeptide SP(6-11) (N-Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(O₂)¹¹]) ont permis d'obtenir des agonistes sélectifs de hautes affinité pour le récepteur NK-1 (Drapeau *et al.*, 1987). Les sites NK-1 sont

présents dans différents tissus (cerveau de rat et de cobaye, iléon de cobaye etc...). Le récepteur NK-1 a été cloné à partir d'une librairie d'ADNc du cerveau et de glandes submaxillaires de rat (figure 2). Le récepteur cloné est formé de 407 acides aminés et possède un poids moléculaire de 46364 (Yokota *et al.*, 1989). La séquence déduite d'acides aminés contient sept domaines transmembranaires et montre une séquence similaire à celles des récepteurs couplés à des protéines G (Lefkowitz et Caron, 1988). L'activation du récepteur NK-1 résulterait en l'hydrolyse des phosphoinositides dans plusieurs tissus incluant les glandes salivaires de rat, le cerveau de rat (Mantyh *et al.*, 1984, 1989) et le muscle lisse longitudinal de l'iléon de cobaye (Watson et Downes, 1983).

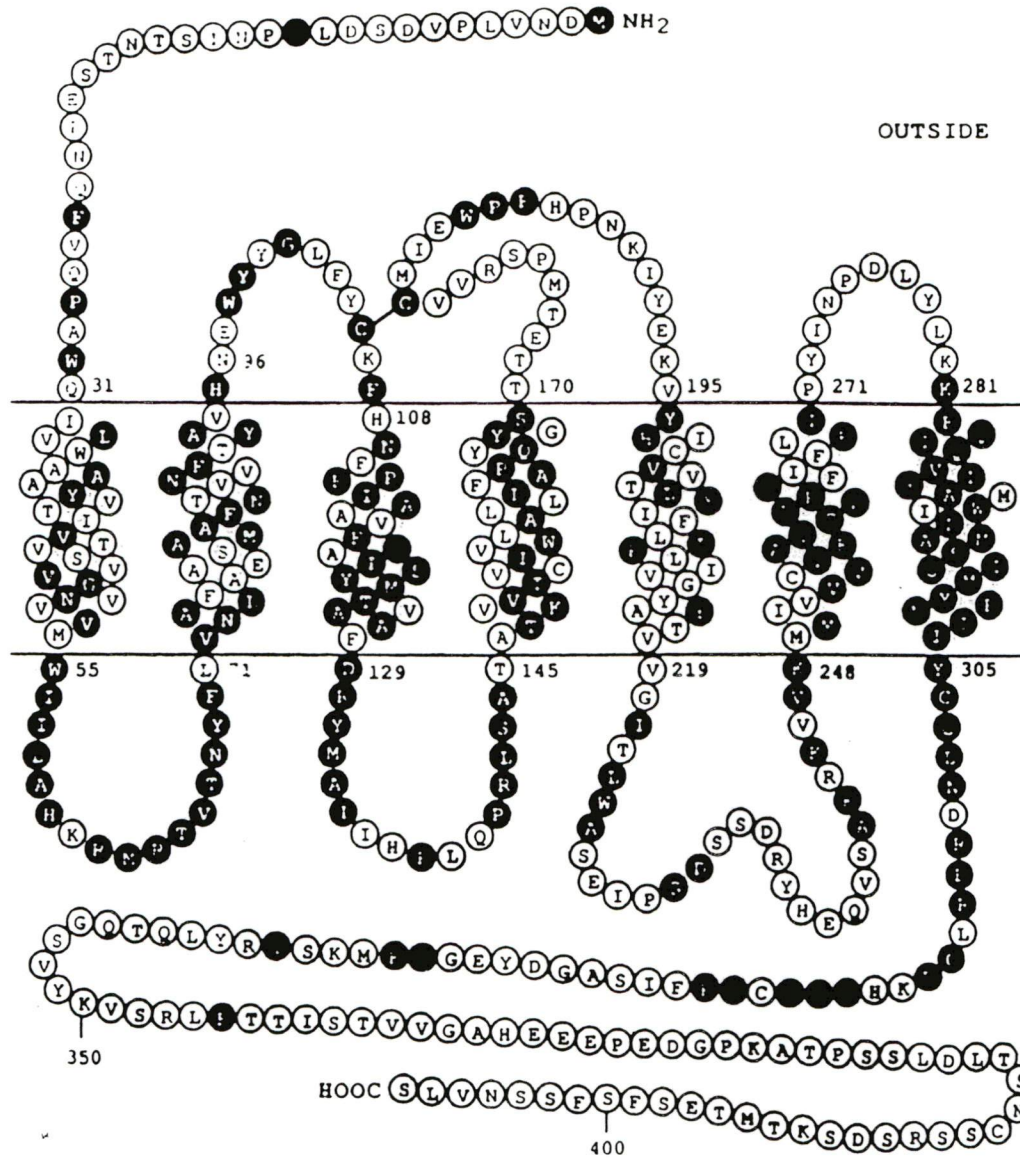
1-2.2b Le récepteur de type NK-2

Il a été suggéré que la NKA était la neurokinine la plus puissante sur le récepteur NK-2, la NKB et la SP étant moins actives à contracter l'artère pulmonaire de lapin (D'Orléans-Juste *et al.*, 1986). Le remplacement de la glycine par une β -Alanine en position 8 du fragment NKA (4-10) ($[\beta\text{-Ala}^8]$ NKA (4-10)) confère une certaine sélectivité pour le récepteur NK-2 (Rovero *et al.*, 1989). La $[\beta\text{-Ala}^8]$ NKA (4-10) est l'agoniste sélectif du récepteur NK-2 avec une affinité apparente 1000 fois plus élevée pour le récepteur NK-2 que pour le récepteur NK-1 et 10 fois plus élevée que pour le récepteur NK-3 (Rovero *et al.*, 1989). D'autres auteurs ont suggéré que le NPK aurait également une certaine sélectivité pour le récepteur NK-2 (Mcknight *et al.*, 1988). D'autre part, le NPy serait encore plus sélectif (Dam *et al.*, 1990) pour ce récepteur. Les sites NK-2 sont présents dans plusieurs tissus périphériques tels l'artère pulmonaire de lapin (Regoli *et al.*, 1987), la vessie de hamster (Burcher et

Buck, 1986), l'iléon de rat (Watson, 1984) et le canal déférens de rat (Toussignant *et al.*, 1987). La présence du récepteur NK-2 dans le système nerveux central est controversée étant donnée l'absence d'un traceur sélectif pour ce récepteur. Des études récentes, ont montré la présence des récepteurs NK-2 dans le cerveau et la moëlle épinière du rat adulte: D'une part, Zerari *et al* (1996) ont démontré une faible immunoréactivité des récepteurs NK-2 dans le système nerveux central de rat en utilisant des anticorps monoclonaux de souris dirigé contre un peptide synthétique (correspondant à la séquence c-terminale 359-390 du récepteur NK-2 de rat). D'autre part, Stratton *et al.*, (1996) ont aussi démontré l'existence des récepteurs NK-2 dans le cerveau de rat adulte par la localisation autoradiographique du composé [³H]SR-48968 sur des structures de gangliale basale. Le récepteur NK-2 a été cloné à partir d'une librairie d'ADNc provenant de l'estomac de boeuf (Masu *et al.*, 1987). Comme pour le récepteur NK-1 et NK-3, la séquence en acides aminés (390 acides aminés) est compatible avec une structure à sept domaines transmembranaires et montre une certaine similarité avec celle des récepteurs couplés aux protéines G (Masu *et al.*, 1987). La comparaison de la séquence d'acides aminés du récepteur NK-2 avec celle du récepteur NK-1 montre une homologie de 48% et de plus, les poids moléculaires des deux molécules sont semblables (43851 (NK-2) versus 46364 (NK-1)). La stimulation du récepteur NK-2 résulterait en l'hydrolyse des phosphoinositides dans des préparations de muscles lisses longitudinal de l'iléon de cobaye (Watson 1984) et de la vessie de hamster (Bristow *et al.*, 1987).

1-2.2c Le récepteur de type NK-3

L'agoniste naturel le plus puissant sur le récepteur NK-3 est le NKB, tel que démontré sur la veine porte de rat (Mastrangelo *et al.*, 1987). L'étude du récepteur NK-3 a été grandement facilitée par le développement d'un agoniste sélectif, la succinyl-[Asp⁶, MePhe⁸]SP(6-11) (senktide) (Worsmsers *et al.*, 1986). La [MePhe7]NKB obtenue par substitution en position 7 de la valine par une méthylphénylalanine, a fourni un excellent agoniste sélectif pour le récepteur NK-3 (Regoli *et al.*, 1988). Le récepteur NK-3 est présent dans le système nerveux central (Dam *et al.*, 1990) mais a également été identifié en périphérie dans les neurones du plexus myentérique de l'iléon de cobaye (Worsmsers *et al.*, 1986) et dans la veine porte de rat (Mastrangelo *et al.*, 1987). La distribution du récepteur NK-3 dans le cerveau et la moelle épinière est différente de celle observée pour le récepteur NK-1 (Buck *et al.*, 1986; Mantyh *et al.*, 1989) et le récepteur NK-2 (Yashpal *et al.*, 1990). Le récepteur NK-3 a été cloné à partir du cerveau de rat par Shigemoto *et al.* (1990). Comme le récepteur NK-1, le récepteur NK-3 est un membre de la famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires, et possède 452 acides aminés. L'hydrolyse des phosphoinositides qui fait suite à l'activation du récepteur NK-3 a été démontrée dans le plexus myentérique de l'iléon de cobaye (Guard *et al.*, 1989).



- acides aminés communs aux récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3
 - acides aminés différents dans les récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3
- Tiré de Gérald et al., 1993

Figure 2 : Comparaison des séquences en acides aminés des récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3 de l'homme

1-2.3 Les effets biologiques des neurokinines

Les neurokinines et leurs récepteurs sont largement distribués dans le corps où ils exercent plusieurs activités physiologiques:

Le récepteur NK-1 est impliqué dans la vasodilatation (Jacques *et al.*, 1989), la contraction et la relaxation musculaire (Regoli *et al.*, 1988; D'Orléans-Juste *et al.*, 1986) et dans la sécrétion salivaire (Snider *et al.*, 1991). Dans le système nerveux, la SP agirait comme un neurotransmetteur ou un neuromodulateur dans la transmission de stimuli douloureux à partir de la périphérie (Jessel et Iversen, 1977). Le récepteur NK-1 serait important dans le contrôle de la pression artérielle et du rythme cardiaque (Yashpal *et al.*, 1987).

Le récepteur NK-2 serait impliqué dans la contraction musculaire (Regoli *et al.*, 1988; Giuliani *et al.*, 1991) de même que dans le contrôle des fonctions hémodynamiques par le système nerveux central.

Le récepteur NK-3 est également impliqué dans la contraction musculaire (Regoli *et al.*, 1988). L'activation du récepteur NK-3 résulte en la libération d'acétylcholine des neurones du plexus myentérique du muscle longitudinal de l'iléon de cobaye (Fosbraey *et al.*, 1984). Des résultats similaires ont été observés au niveau du système nerveux central: en effet, l'activation des récepteurs NK-3 développe chez l'animal un comportement qui est associé à la relâche de l'acétylcholine (Stoessl *et al.*, 1988).

1-3 Rationnelle de l'étude:

Les trois neurokinines, les kinines et leurs récepteurs respectifs ont été étudiés chez plusieurs espèces, particulièrement le rat, le cobaye, le lapin et l'homme (Regoli *et al.*, 1994; Regoli *et al.*, 1997). Gérard *et al.* (1993) ont récemment résumé les études plus significatives des clonages des récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3 humains. Les récepteurs des neurokinines et des kinines chez la souris ont fait l'objet de peu d'études, généralement *in vivo* (Lembeck *et al.*, 1981; Lembeck et Holzer., 1979; Pernow, 1983). Les diverses activités physiologiques exercées par les neurokinines et les kinines, ainsi que la création récente d'une nouvelle souche de souris transgénique, dépourvue de récepteur de type B₂ des kinines, témoignent de l'importance de caractériser ces récepteurs adéquatement avec des agonistes et des antagonistes sélectifs pour ces récepteurs. Dans le présent travail, nous nous sommes proposé de procéder à l'exploration systématique de plusieurs tissus chez la souris afin d'identifier quelques préparations pharmacologiques utilisables comme essai biologique pour les récepteurs des neurokinines; les autres buts principaux de notre étude peuvent être schématiquement résumés comme suit:

1-4 Buts de l'étude

- 1) Identifier les outils pharmacologiques (tissus isolés, agonistes sélectifs et antagonistes spécifiques) adéquats pour la caractérisation des récepteurs des kinines et neurokinines chez la souris normale.
- 2) Caractériser le FR 173657, un nouvel antagoniste non peptidique des récepteurs B₂ des kinines.
- 3) Caractériser le R-715, un nouvel antagoniste des récepteurs B₁ des kinines.

MATERIELS ET METHODES

2-1 Animaux utilisés

Les tissus utilisés dans cette étude, proviennent de souris de sexe mâle: les souris C57/BL.6 (18 à 30 g), fournis par Charles River, St-Constant, Québec.

2-2 Méthodologie expérimentale

Les essais pharmacologiques ont été effectués sur divers tissus du tractus gastro-intestinal (estomac, duodénum, iléon, caecum, côlon) et du tractus génito-urinaire (vessie). Pour prélever les organes, les souris sont exsanguinées par sectionnement des artères carotides après dislocation des vertèbres cervicales.

Immédiatement après le prélèvement, les tissus sont immergés dans une solution physiologique de Krebs à 37° C (pH 7.4) dont la composition en mM est la suivante: NaCl: 117.5; KCL: 4.7; CaCl₂.6H₂O: 2.5; KH₂PO₄: 1.2; NaHCO₃: 25; MgSO₄.7H₂O: 1.2; D-Glucose: 5.5. La solution de Krebs est oxygénée à l'aide d'un mélange gazeux constitué de 95% O₂ et 5% CO₂.

Après dissection et élimination des tissus adipeux et conjonctifs, les tissus sont taillés et suspendus dans des bains siliconisés à organes isolés de 10 ml contenant la solution physiologique de Krebs. Toutes les réponses contractiles générées suite à l'injection de différentes substances chimiques dans les bains contenant les tissus, sont enregistrées à l'aide de transducteurs isométriques de force de type FT03C (Grass Instrument CO., Quincy, Mass.), calibrés à 1 g =30 mm et reliés à un physiographe Grass de modèle 7-D.

2-3 Préparation des tissus isolés

2-3.1 Estomac de souris

Les estomacs sont préparés selon la méthode décrite par Vane (1957). Le fundus de l'estomac est prélevé et la muqueuse gastrique est enlevée autant que possible. Les tissus obtenus sont ensuite taillés dans une direction puis dans la direction opposée pour finalement aboutir à des bandelettes de 3 mm de large. Les tissus sont alors coupés en segments de 1 à 1.5 cm de long et mis dans les bains contenant la solution de Krebs à 37 °C traitée en général avec 10^{-6} M de captopril dans le but de prévenir toute dégradation des kinines, neurokinines et leurs analogues respectifs par des peptidases (voir section "étude du métabolisme des kinines et neurokinines sur des préparations tissulaires de souris"). Une tension initiale de 0.5g est appliquée sur les tissus provenant de l'estomac de souris. La tension est réajustée à toutes les 15 min. lors du lavage. La période d'équilibration est d'environ 90 min.

2-3.2 Vessie de souris

Les vessies sont préparées selon la méthode initialement décrite par Vane (1957) pour l'estomac de rat. Les vessies sont disséquées, dégraissées *in situ* et dénudées autant que possible de leur muqueuse, puis ouvertes selon l'axe longitudinal du trigone au dôme. Les tissus obtenus sont ensuite taillés dans une direction puis dans la direction opposée, de façon à obtenir des bandelettes de 1.5 à 2 cm de large. Les tissus sont ensuite coupés en segments de 1.5 cm de long et suspendus dans les bains contenant la solution de Krebs à 37°C, traitée avec du captopril(10^{-6} M).

Une tension initiale de 0.5g est appliquée à la vessie et réajustée à toutes les 15 min. Le temps d'équilibration alloué à ces tissus s'échelonne sur une période de 45 à 60 min.

2-4 Protocoles expérimentaux

2-4.1 Evaluation des effets contractiles de différents peptides: kinines, neurokinines, et leurs fragments et analogues

Pour mesurer les effets contractiles des différents agents pharmacologiques, ceux-ci sont appliqués directement dans des bains thermostatés de 10 ml contenant les tissus à l'étude. Les protocoles expérimentaux servant à mesurer l'effet myotrope des kinines et leurs analogues et ceux servant pour l'évaluation des affinités des antagonistes des récepteurs des kinines, ont été décrits par Rhaleb *et al.*, (1990, 1991, 1992).

Le volume d'injection d'agents pharmacologiques dans les bains varie entre 0.1 et 0.4 ml. La concentration seuil de chaque agent contractile est déterminée par application de concentrations croissantes de ces mêmes agents sur les tissus jusqu'à l'obtention d'une réponse biologique quantifiable. La concentration-seuil de l'agent est par la suite augmentée par des facteurs de 4 à 10 jusqu'à l'obtention d'une réponse maximale.

Une concentration de chaque agent produisant une réponse de l'ordre de 50% de l'effet maximal est appliquée de façon répétitive et à divers laps de temps pour établir la stabilité de réponse du tissu face aux stimulations répétées et afin de déterminer l'intervalle de temps nécessaire pour éviter la désensibilisation. Dans cette étude, toutes les courbes concentration-réponse ont été réalisées de façon consécutive

afin d'éviter toute désensibilisation et tachyphylaxie. Pour ce faire, on mesure l'effet d'une seule concentration à la fois et on laisse, entre les applications de l'agent étudié, des intervalles de repos de 8 à 10 min. pour les concentrations inférieures ou égales à 10 ng/ml et de 20 à 30 min. pour les concentrations supérieures à 10 ng/ml.

2-4.2 Etude du métabolisme *in vitro* des kinines et neurokinines sur l'estomac de souris

L'inactivation *in vitro* de la BK, la desArg⁹BK et des neurokinines a été évaluée selon le protocole décrit par Rouissi *et al.* (1990a, 1990b). Les courbes concentration-réponses de chaque peptide ont été mesurées en absence et en présence des inhibiteurs de peptidases, à savoir le captopril (10^{-6} M) pour inhiber l'enzyme de conversion de l'angiotensine I et le mergetpa (10^{-6} M), l'inhibiteur de la carboxypeptidase M. Les tissus témoin, non traités avec les inhibiteurs, sont étudiés en parallèle. Un temps de repos de 60 à 90 min est alloué entre les deux courbes. L'inhibiteur est incubé pendant 30 min avant de débiter la deuxième courbe.

2-4.3 Détermination de l'affinité des agonistes (pD_2)

Les courbes concentration-réponses sont obtenues en injectant des concentrations croissantes d'agonistes (BK, desArg⁹BK, SP, NKA, NKB et leurs analogues respectifs) dans les bains à organes isolés afin de déterminer le pD_2 (logarithme négatif de la concentration molaire (M) de l'agoniste qui produit 50% de l'effet maximal). Un temps de 10 à 20 min. est alloué entre chaque dose, afin d'éviter la désensibilisation.

2-4.4 Détermination des affinités apparentes des antagonistes (pA_2)

Les affinités des antagonistes sont estimées en termes de pA_2 (voire "paramètres pharmacologiques" pour la définition), et sont mesurées avec le protocole suivant: on mesure d'abord l'effet d'une concentration d'agoniste et puis celui d'une concentration deux fois plus élevée. Après avoir vérifié la stabilité et reproductibilité des réponses de la préparation à l'agoniste, l'antagoniste est appliqué pendant 10 min. (pour les antagonistes peptidiques) ou 30 min. (pour les antagonistes de nature non peptidique) avant l'injection de la concentration double d'agoniste. La concentration d'antagoniste est alors variée jusqu'à l'obtention d'un effet égal ou inférieur à celui d'une concentration simple de l'agoniste. Pour mesurer l'effet antagoniste réel de composés non sélectif tels que le DArg[Hyp³, DPhe⁷, Leu⁸]BK, le DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK sur les préparations possédant les deux types de récepteurs (B_1 et B_2), les tissus sont traités au préalable avec une forte concentration (8.5 μ M) de R-715, un antagoniste des récepteurs B_1 .

2-4.5 Étude de la compétitivité du FR 173657, DE HOE 140 et du R 715 par la méthode de la régression linéaire

Afin d'élucider d'avantage le caractère compétitif de certains antagonistes, des courbes concentration-réponse complètes ont été effectuées en absence et en présence de concentrations croissantes d'antagonistes de façon à pouvoir construire un Schild plot (Rhaleb *et al.*, 1992). Une droite est tracée et, l'extrapolation de celle-ci sur l'axe de l'abscisse donne le pA_2 théorique. De plus, si la pente de la droite est comprise entre 0.95 et 1.05, l'antagoniste peut être considéré comme compétitif (Kenakin,

1982, 1984). Au delà ou en deça de ces limites, la compétitivité de l'antagoniste est mise en question (Tallarida *et al.*, 1979; Kenakin, 1982, 1984).

2-4.6 Étude de la spécificité et de la sélectivité du FR 173657 et du R 715

La spécificité des antagonistes est établie en mesurant, en absence et en présence de l'antagoniste, les effets contractiles des agents qui sont : la BK, la substance P (SP), l'angiotensine II (AT_{II}), l'acétylcholine (ACh) et l'histamine. Si l'antagoniste est spécifique pour le récepteur B₂ de la BK, seul l'effet de la BK sera diminué.

2-4.7 Étude de la réversibilité et de la durée d'action des antagonistes HOE 140, FR-173657 et R-715.

Les réponses contractiles à une concentration unique des agonistes BK (9.43nM) et desArg⁹BK (9nM) sont déterminées dans un premier temps dans tous les tissus. Après avoir lavé les agonistes, les tissus sont traités avec des concentrations élevées jusqu'à 8µM des antagonistes respectifs (HOE 140 et FR173657 pour la BK, et R-715 pour la desArg⁹BK) pendant une période d'incubation de 10 à 30 min. au terme de laquelle les agonistes sont reinjectés. Ensuite, on lave les tissus, 3 fois toutes les 15 min. pendant 60 min., et les réponses à la BK et à la desArg⁹BK sont déterminées après 20, 40 et 60 min. Les tissus contrôles, c'est-à-dire ceux n'ayant pas été traités avec les antagonistes, sont étudiés en parallèle afin de vérifier la stabilité des réponses.

2-5 Paramètres pharmacologiques

2-5.1 Affinité apparente des agonistes

L'affinité apparente des agonistes peut être exprimée sous deux formes: $-EC_{50}$ qui représente la concentration molaire d'agoniste produisant 50% de l'effet maximal ou $-pD_2$ qui est le logarithme négatif du EC_{50} .

2-5.2 Affinité relative des composés: AR

Pour comparer divers composés agissant sur le même récepteur, nous calculons l'affinité de chaque composé en pourcentage de l'affinité d'un agoniste de référence selon l'équation suivante:

$$AR = \frac{EC_{50} \text{ de l'agoniste de référence}}{EC_{50} \text{ de l'analogue}} \times 100$$

2-5.3 Activité intrinsèque des composés: α^E

L'activité intrinsèque représente la réponse maximale de l'agoniste de référence; elle indique la capacité d'un composé à occuper et à stimuler tous ses récepteurs. L' α^E d'une substance est déterminée à partir de la courbe concentration-effet. C'est le rapport entre la réponse maximale de l'agoniste à l'étude et celle de l'agoniste de référence. L' α^E de l'agoniste de référence est fixée à 1.0 (Ariens, 1964).

2-5.4 Affinité apparente des antagonistes: pA_2

L'affinité apparente des antagonistes (pA_2) est définie comme étant le logarithme négatif de la concentration molaire (M) d'un antagoniste nécessaire pour

réduire l'effet d'une concentration double d'agoniste à celui d'une concentration simple (Schild, 1947).

2-6 Calculs et évaluation statistique des données

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard. Les différences entre les moyennes sont évaluées à l'aide du test "t" de student pour les données appariées. Seules les valeurs de probabilité (p) inférieures à 0.05 sont considérées comme étant significatives.

TABLEAU I

STRUCTURES PRIMAIRES DES PEPTIDES NATURELS UTILISÉS DANS CETTE ÉTUDE

NOMS	STRUCTURES PRIMAIRES
1. BRADYKININE	Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg-COOH
2. DesArg ⁹ BRADYKININE	Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe -COOH
3. SUBSTANCE P	H Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met NH ₂
4. NEUROKININE A	H His Lys Thr Asp Ser Phe Val Gly Leu Met NH ₂
5. NEUROKININE B	H Asp Met His Asp Phe Phe Val Gly Leu Met NH ₂

TABLEAU II

LISTE DES COMPOSÉS PHARMACOLOGIQUES EMPLOYÉS DANS CETTE ÉTUDE

Abréviation	Nom pharmacologique ou chimique	Source
Atropine	Atropine sulfate	Sigma, St-Louis
Diphenhydramine	Diphenhydramine-HCl	Parke-Davis, Dorval
Captopril	([2S]-1-[3-Mercapto-2-méthyl- propionyl]-L-proline	Squibb, Montréal
Mergetpa	acide DL-2-Mercaptométhyl-3- guanidinoéthylthiopropionique	Calbiochem, Behringer
Ach	Acétylcholine-HCl	Sigma, St-Louis
Hist	Histamine-sulfate	Sigma, St-Louis
AT _{II}	Angiotensine II	Pharmacologie Sherbrooke
BK	Bradykinine	Pharmacologie Sherbrooke
LysBK	LysBradykinine	Pharmacologie Sherbrooke
[Hyp ³]BK	[Hyp ³]Bradykinine	Pharmacologie Sherbrooke
[Aib ⁷]BK	[Aib ⁷]Bradykinine	Pharmacologie Sherbrooke
desArg ⁹ BK	desArg ⁹ Bradykinine	Pharmacologie Sherbrooke
LysdesArg ⁹ BK	LysdesArg ⁹ Bradykinine	Pharmacologie Sherbrooke
Sar[DPhe ⁸]desArg ⁹ BK	Sar[DPhe ⁸]desArg ⁹ Bradykinine	Pharmacologie Shrebrooke
DArg[Hyp ³ ,DPhe ⁷ ,Leu ⁸]BK	DArg[Hyp ³ ,DPhe ⁷ ,Leu ⁸]Bradykinine	Pharmacologie Sherbrooke
DArg[Hyp ³ ,DPhe ⁷]BK	DArg[Hyp ³ ,DPhe ⁷]Bradykinine	Pharmacologie Sherbrooke
DArg[Hyp ³ ,DPhe ⁷]desArg ⁹ BK	DArg[Hyp ³ ,DPhe ⁷]desArg ⁹ Bradykinine	Pharmacologie Sherbrooke
[Leu ⁸]desArg ⁹ BK	[Leu ⁸]desArg ⁹ Bradykinine	Pharmacologie Sherbrooke
Lys[Leu ⁸]desArg ⁹ BK	Lys[Leu ⁸]desArg ⁹ Bradykinine	Pharmacologie Sherbrooke
DArg[Hyp ³ ,Thi ⁵ ,DTic ⁷ ,Oic ⁸]BK	HOE 140	Hoechst, Frankfurt
DArg[Hyp ³ ,Thi ⁵ ,DTic ⁷ ,Oic ⁸] desArg ⁹ BK	desArg ⁹ -HOE 140	Hoechst, Frankfurt
AcLys[DβNal ⁷ ,Ile ⁸] desArg ⁹ BK(R-715)	AcLys[DβNal ⁷ ,Ile ⁸]desArg ⁹ Bradykinine	Pharmacologie Sherbrooke
Win 64338	Phosphonium[[4-[[2-[[bis(cyclo- hexylamino)méthyl]nc]amino]-3- (2-naphtalenyloxy)propyl] amino]-phényl]-méthyl] tributyl, chlorure, monohydrochlorure)	Sterling Winthrop, Malvern
FR 173657	[(E)-3-(6-acetamido-3-pyridyl)- N(N-{2,4-dichloro-3-[(2-méthyl-8- quinolinyloxy)méthyl]phényl}-N- méthyl) aminocarbonyl méthyl)acrylamide]	Fujisawa, Osaka

TABLEAU II (suite)

LISTE DES COMPOSÉS PHARMACOLOGIQUES EMPLOYÉS DANS CETTE ÉTUDE

Abbréviation	Nom pharmacologique ou chimique	Source
SP	Substance P	Pharmacologie Sherbrooke
NKA	Neurokinine A	Pharmacologie Sherbrooke
NKB	Neurokinine B	Pharmacologie Sherbrooke
Ac[Arg ⁶ ,Sar ⁹ ,Met(O ₂) ¹¹]	Ac[]Substance P	Pharmacologie Shrebrooke
SP (6-11)	[]Substance P	Pharmacologie Sherbrooke
[Sar ⁹ ,Met(O ₂) ¹¹]SP	[pGlu ⁶ ,Pro ⁹]Substance P (6-11)	Pharmacologie Sherbrooke
Septide	[]Neurokinine A (4-10)	Pharmacologie Sherbrooke
[β-Ala ⁸]NKA (4-10)	[]Neurokinine A (4-10)	Pharmacologie Shrebrooke
[Nle ¹⁰]NKA (4-10)	Asp-Ala-Gly-Tyr-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂	
NPγ		
[MePhe ⁷]NKB	[]Neurokinine B	Pharmacologie Sherbrooke
Senktide	Suc-Asp-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂	Pharmacologie Shrebrooke
SR 140333	(S)-1-(2-[3,4-dichlorophenyl]-1-(3-isopropoxyphenylacetyl)piperidin-3-yl]-4-phenyl-1-azoniabicyclo[2.2.2]octane,chloride	Sanofi, Montpellier
RP 67580	(3aR, 7aR)-7,7-diphenyl-2-[1-imino-2-(2-methoxyphenyl)ethyl]perhydroisoindol-4-one	Paris, Rhône Poulenc
FK 888	N ² -[(4R)--4-hydroxy-1-(1-methyl-1H-indol-3-yl)carbonylpropyl]-N-methyl-N-phenylmethyl-3-(2-naphthyl)alaninamide	Fujisawa, Osaka
CP 99994	(+)-(2S,3S)-3-(2-methoxybenzylamino)-2-phenylpiperidine	Pfizer, Groton
SR 48968	(S)-N-methyl-N[4-(4-acetylamino-4-phenylpiperidino)-2-(3,4-dichlorophenyl)butyl]benzamide	Sanofi, Montpellier
R 396	Ac-Leu-Asp-Gln-Trp-Phe-Gly-NH ₂	Pharmacologie Sherbrooke

MEN 10627	cyclo(Met-Asp-Trp-Phe-Dap- Leu)cyclo(2 β -5 β)	Menarini, Florence
R 486	H-Asp-Ser-Phe-Trp- β Ala-Leu- Met-NH ₂	Pharmacologie Sherbrooke
SR 142801	(S)-(N)-91-(3-(1-benzoyl-3(3,4- dichlorophenyl)piperidin-3-yl)- propyl)-4-phenylpiperidin-4-yl)- N-methylacetamide.	Sanofi, Montpellier

3- RESULTATS

3-1 RECEPTEURS DES KININES

3-1.1 Effets de la bradykinine (BK) et de la desArg⁹BK sur les tissus de souris normales

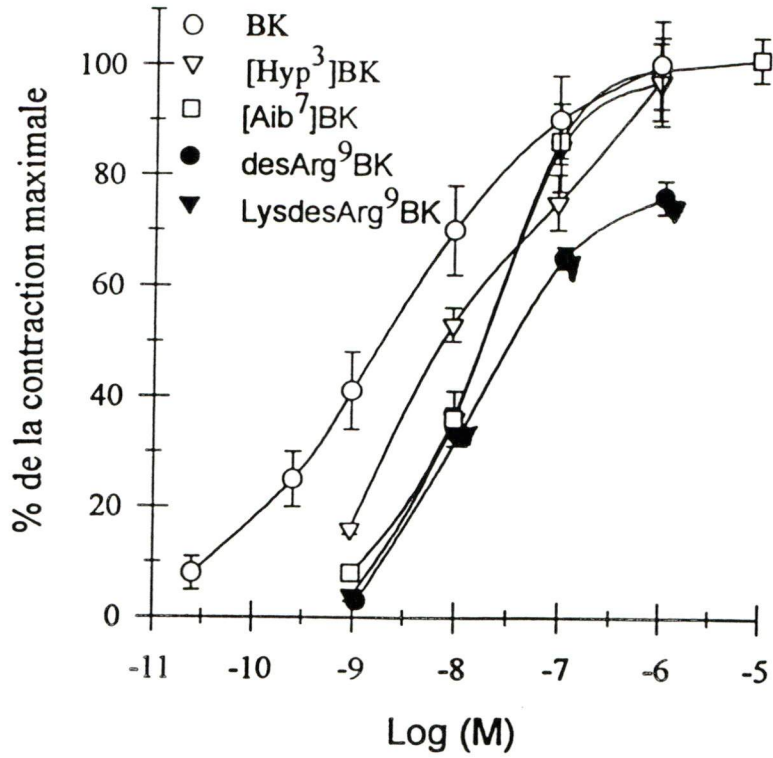
Dans des expériences préparatoires, différentes parties des tractus gastro-intestinal (duodénum, iléon, côlon, caecum, et estomac) et génito-urinaire (vas déferens non stimulé et vessie) de la souris ont été testées pour leur sensibilité aux kinines et autres agents vasoactifs; l'estomac et la vessie répondent aux kinines par des contractions dose-dépendantes (figure 3) et représentent ainsi des préparations adéquates et sensibles pour l'étude des récepteurs (B₁(uniquement sur la vessie) et B₂ (sur l'estomac et la vessie)) des kinines. Par ailleurs, le vas déferens de souris stimulé par un courant électrique a été caractérisé comme une préparation sensible à la bradykinine et à ses analogues (Rae *et al.*, 1995). Dans la présente étude, toutes les expériences sont réalisées sur l'estomac et la vessie de souris. De plus, on observe une différence dans l'entrée en action et dans la durée de la réponse contractile de l'estomac à la desArg⁹BK par rapport à la BK. Cette différence sera analysée plus en détails dans la partie "Différence dans le profil de contraction des réponses induites par la BK et la desArg⁹BK".

Figure 3: Etude des effets dose-dépendant des kinines sur les tissus de souris. En haut, les courbes concentration-réponses obtenues avec les agonistes des récepteurs B₁ (desArg⁹BK et LysdesArg⁹BK) et B₂ (BK, [Hyp³]BK et [Aib⁷]BK) sont mesurées sur l'estomac de souris. En bas, les courbes concentration-réponses obtenues avec les agonistes des récepteurs B₂ (BK, [Hyp³]BK et [Aib⁷]BK) sont mesurées sur la vessie de souris.

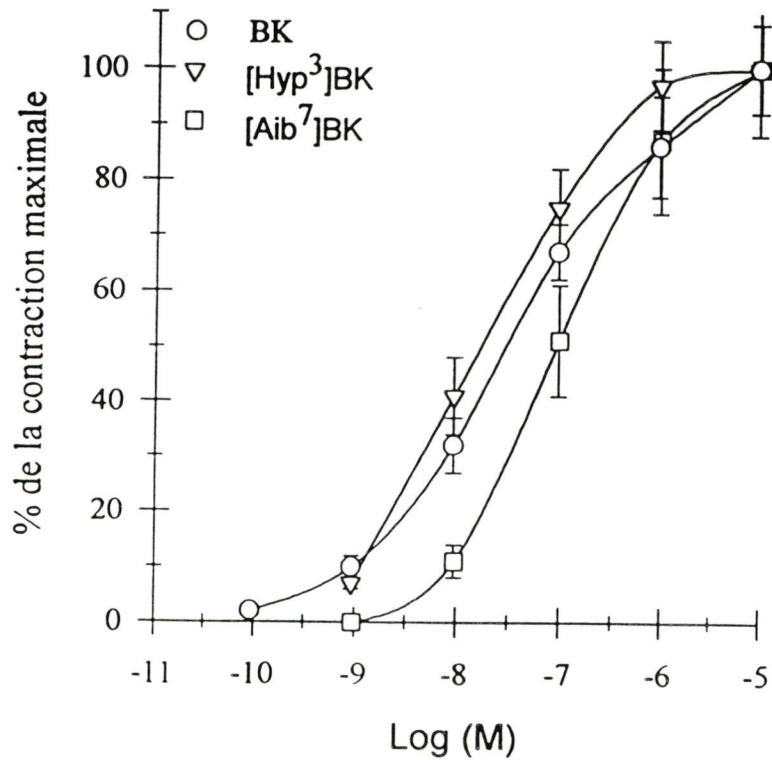
Abscisse: Concentration (M) des agonistes.

Ordonnée: Effets contractiles des agonistes étudiés exprimés en pourcentage de la contraction maximale (CM) produite par la BK (agoniste de référence).

Estomac



Vessie



3-1.2 Etude du métabolisme des kinines (BK et desArg⁹BK) sur l'estomac et la vessie de souris

Les variations des activités biologiques de BK et desArg⁹BK provoquées par le captopril (inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou de la kininase II) et par le mergetpa (inhibiteur de la carboxypeptidase N ou de la kininase I) ont été évaluées afin d'établir d'une façon indirecte la contribution relative des enzymes protéolytiques telles que les kininases I et kininases II à l'inactivation de kinines.

3-1.2a Effet du captopril

Les réponses de l'estomac (figure 4A-B) et de la vessie (figure 5) à la BK et à la desArg⁹BK sont augmentées significativement après le traitement des tissus avec 1 μ M de captopril. Les courbes dose-réponses de BK et desArg⁹BK sont déplacées vers la gauche et une augmentation des affinités de ces agonistes pour leurs récepteurs respectifs en présence du captopril est observée (voir les valeurs de pD_2 au tableau III). Ces résultats suggèrent la présence des kininases II sur les tissus de souris. Un point intéressant à noter, c'est l'augmentation significative des réponses maximales de la BK qui se manifeste particulièrement sur la vessie.

3-1.2b Effet du mergetpa

L'inhibition des carboxypeptidases N (ou kininase I) par l'incubation des tissus (estomac et vessie) avec le mergetpa à une concentration élevée de 1 μ M n'influence point les courbes dose-réponses de BK obtenues. Ces résultats indiquent que la BK n'est pas convertie en desArg⁹BK sur les tissus de souris et suggèrent que ces tissus ne possèdent pas de kininases I actives (résultats non présentés).

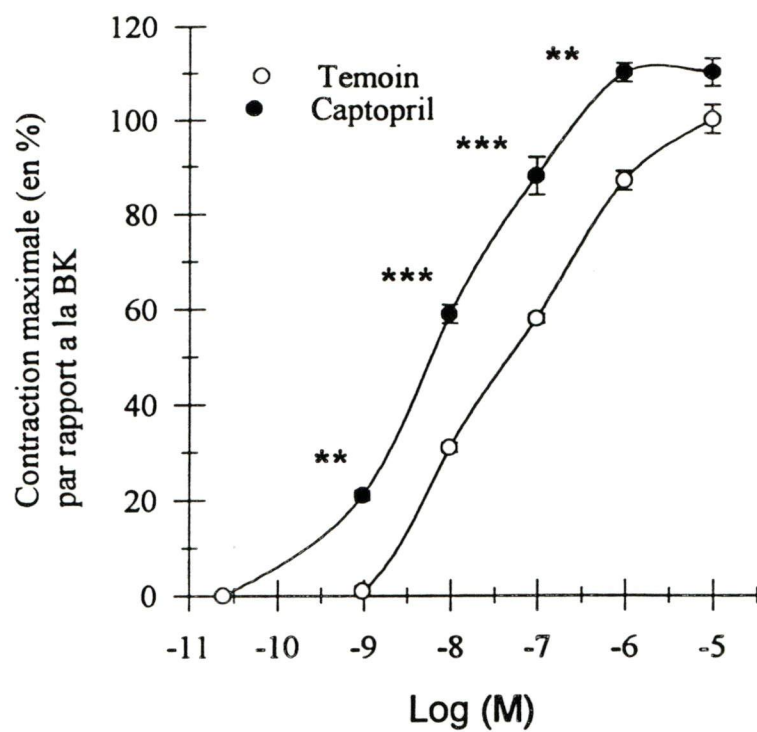
Figure 4: Courbes concentration-réponse de la BK (A) et de la desArg⁹BK (B) obtenues en absence et en présence du captopril (10⁻⁶ M) sur l'estomac de souris.

Abscisse: concentration d'agoniste.

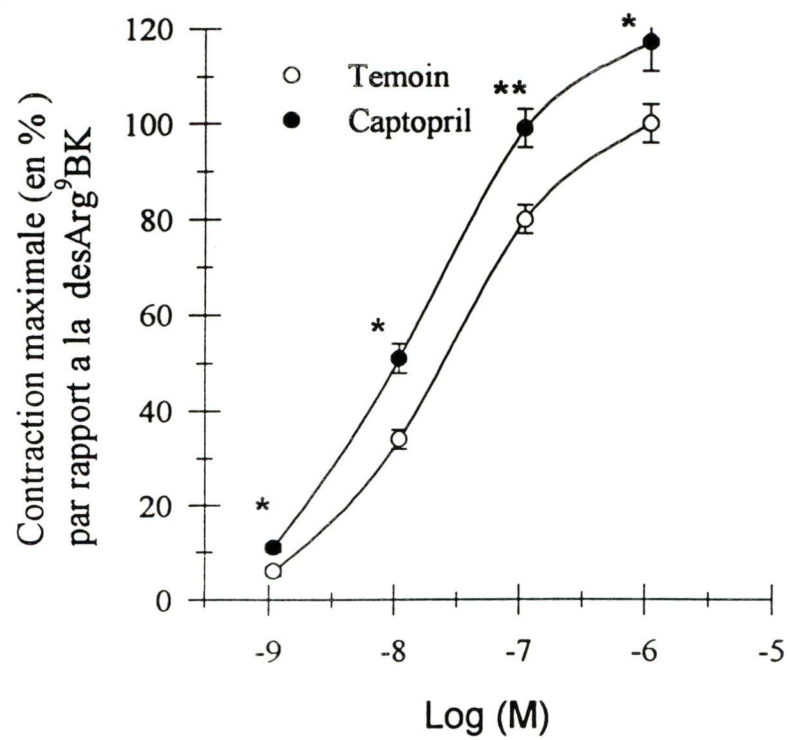
Ordonnée: effets contractiles de la BK et la desArg⁹BK exprimés en pourcentage (%) de la contraction maximale des tissus non traités (témoin).

*: indique les significations statistiques; *p< 0.05; **p< 0.01; ***p< 0.001

A



B



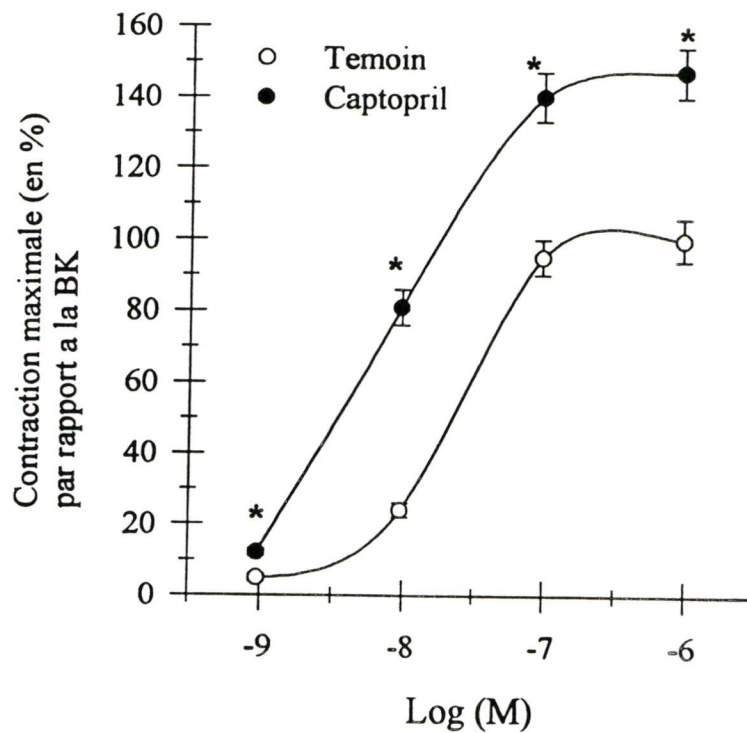


Figure 5: Courbe concentration-réponse de la BK obtenue en absence et en présence du captopril (10^{-6} M) sur la vessie de souris.

Abscisse: Concentration d'agoniste

Ordonnée: Effets contractiles de la BK exprimés en pourcentage (%) de la contraction maximale des tissus non traités (témoin).

*: indique les significations statistiques; * $p < 0.05$.

Tableau III. Affinités apparentes (pD_2) de la BK et de la desArg⁹BK obtenues en absence et en présence de captopril (1 μ M) sur l'estomac et la vessie de souris.

Agent/traitement	Tissus			
	Estomac		Vessie	
	pD_2	Emax (g)	pD_2	Emax (g)
BK	7.50±0.07	1.48±0.09	7.67±0.02	1.16±0.20
BK + captopril	8.35±0.06**	1.63±0.09	8.01±0.02*	1.70±0.25*
desArg ⁹ BK	7.50±0.07	1.19±0.13	-	-
desArg ⁹ BK + captopril	8.00±0.05*	1.39±0.20	-	-

Note. Les valeurs de pD_2 et de Emax des agonistes sur les tissus témoins et traités (captopril, 10^{-6} M) ont été comparées par une analyse Student pour données paires. **; $p < 0.01$, *; $p < 0.05$. Emax: Indique l'effet maximal de l'agoniste, exprimé en grammes de contraction.

3-1.3 Spécificité de l'action myotrope des kinines (BK et desArg⁹BK) sur l'estomac et la vessie de souris.

Cette étude a été faite en absence et en présence de doses relativement fortes d'antagonistes ou inhibiteurs spécifiques, à savoir l'atropine (4 μM), la diphényhydramine (10 μM), et l'indométhacine (7 μM) afin d'évaluer la contribution éventuelle de certains agents endogènes tels l'acétylcholine, l'histamine et les prostaglandines sur les réponses induites par la BK (9.43 nM) et la desArg⁹BK (9 nM) sur l'estomac et la vessie de souris. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau IV; on note que l'atropine (un antagoniste spécifique des récepteurs cholinergiques), l'indométhacine (un puissant inhibiteur de la biosynthèse des prostaglandines) et le diphényhydramine (de même que la cimétidine à 10 μM (résultat non présenté), deux antagonistes des récepteurs histaminergiques) n'ont aucun effet sur les réponses induites par la BK et la desArg⁹BK sur l'estomac, alors qu'ils bloquent celles induites par l'acétylcholine (0.5 μM) et l'histamine (22 μM) respectivement. Ces résultats montrent que les effets myotropes de la BK et de la desArg⁹BK sur l'estomac seraient dus à la stimulation directe des récepteurs spécifiques pour ces agonistes. Par contre, sur la vessie, on observe une diminution significative de l'effet de la BK en présence d'indométhacine (tableau IV), ce qui indique une contribution des prostaglandines à la réponse induite par la BK sur ce tissu.

Tableau IV. Effet de différents traitements pharmacologiques sur les réponses myogéniques induites par la BK, la desArg⁹BK, l'histamine et l'acétylcholine sur:

L'ESTOMAC DE SOURIS

Agents	BK (9.43 nM)		desArg ⁹ BK (9 nM)		Histamine (22 µM)		Acétylcholine (0.5 µM)	
	contrôle	test	contrôle	test	contrôle	test	contrôle	test
Atropine (4 µM)	1.08±0.16	1.14±0.10	0.60±0.05	0.60±0.06			0.71±0.05	0***
Diphényldramine (10 µM)	1.04±0.08	0.95±0.05	0.65±0.06	0.60±0.05	0.80±0.02	0***		
Indométhacine (7 µM)	1.16±0.09	1.14±0.10	0.59±0.05	0.54±0.06	-	-	-	-

LA VESSIE DE SOURIS

Agents	BK (9.43 nM)		Acétylcholine (0.5 µM)	
	contrôle	test	contrôle	test
Atropine (4 µM)	0.66±0.05	0.75±0.06	0.53±0.02	0***
Diphényldramine (10 µM)	0.69±0.03	0.76±0.02		
Indométhacine (7 µM)	0.81±0.01	0.59±0.02**	-	-

Note. Valeurs exprimées en grammes de contraction. ***; p< 0.001, **; p< 0.01. (n= 4-6 pour chaque donnée)

3-1.4 Sélectivité des agonistes BK et desArg⁹BK sur leurs récepteurs respectifs.

Les réponses contractiles de l'estomac de souris à l'ACh (représentant le contrôle externe), la BK et la desArg⁹BK ont été mesurés à divers intervalles de temps après la période d'équilibration (90 min. représentant le temps 0), pour contrôler la stabilité des trois agonistes. Tel que montré dans la figure 6, des contractions comparables sont observées pour l'ACh et la BK sur les tissus stimulés à 90, 150, 210 ou 270 min., tandis que la réponse à la desArg⁹BK varie. Cette réponse est présente (bien que faible) dès la fin de la période d'équilibration et elle augmente significativement entre 90 et 150 minutes pour ensuite se maintenir au niveau élevé pendant au moins deux heures. Soulignons que les réponses de l'ACh et de la BK potentialisées à 210 et à 270 min ne sont pas bloquées par le R715 (2.2µM), un antagoniste du récepteur B₁. Ces résultats montrent qu'il semble avoir une formation *de novo* des récepteurs activés sélectivement par la desArg⁹BK.

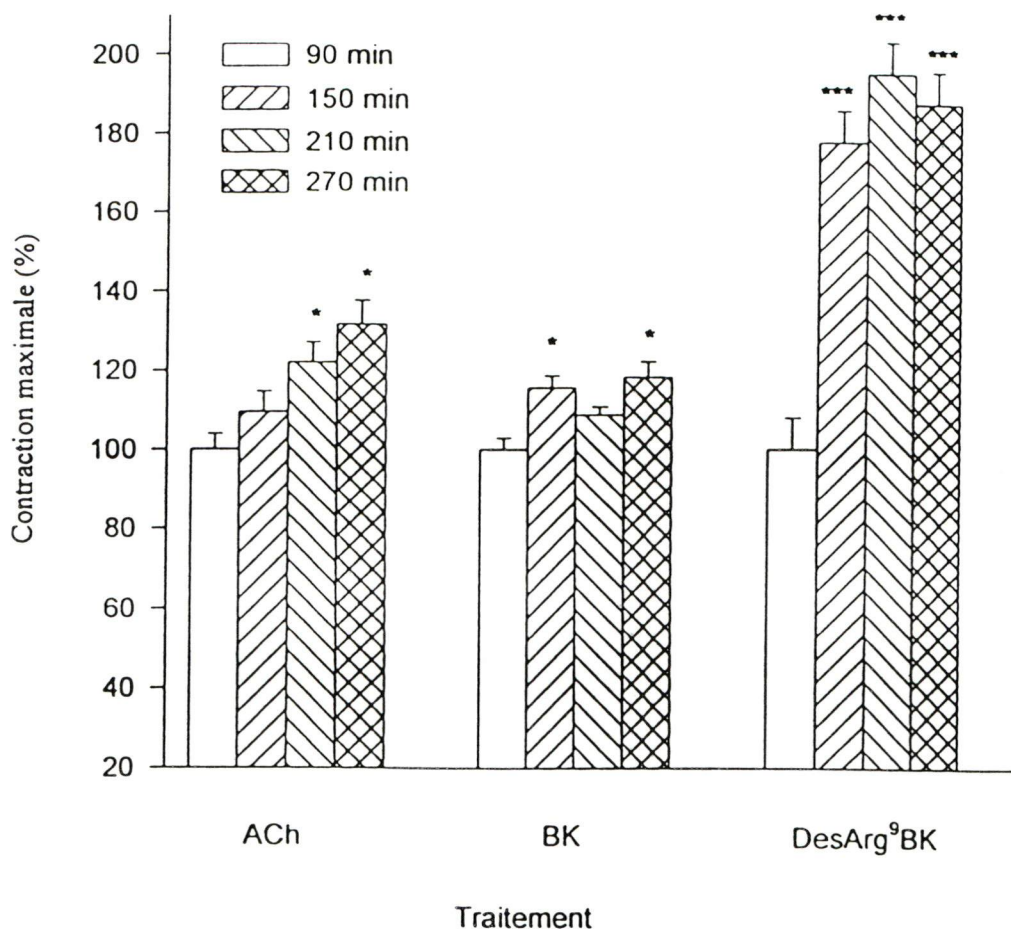


Figure 6: Effets myotropes induits par la ACh ($0.5 \cdot 10^{-6}$ M), la BK ($5 \cdot 10^{-9}$ M) et la desArg⁹BK ($3 \cdot 10^{-8}$ M) en fonction du temps (90, 150, 210, 270 min. après une période d'équilibration de 90 min. représentant le temps 0) en présence de captopril (10^{-6} M). La réponse induite par la BK n'augmente pas de façon significative avec le temps, par contre, celle induite par la desArg⁹BK augmente significativement après 150 min et reste élevée.

Abscisse: temps

Ordonnée: effets contractiles de BK, desArg⁹BK et ACh exprimés en pourcentage (%) des contractions obtenues par ces agents au temps 0

*: indique les significations statistiques

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (n= 8-10)

3-1.5 Différence dans le profil de contraction des réponses induites par la BK et la desArg⁹BK sur l'estomac de souris

Les effets myotropes de la BK et de la desArg⁹BK sur l'estomac de souris sont illustrés dans la figure 7. L'effet (entrée en action, pic et relaxation après lavage) de la BK est très rapide (1 à 2 min.) tandis que la réponse contractile de la desArg⁹BK se développe assez rapidement et elle est lentement réversible (5 à 15 min.). En présence de HOE 140 (8 μ M), le puissant antagoniste sélectif des récepteurs B₂, l'effet de la BK est complètement bloqué alors que celui induit par la desArg⁹BK reste inchangé. Par contre, le R715 (8 μ M), l'antagoniste sélectif des récepteurs B₁, inhibe la réponse à la desArg⁹BK et ne touche pas à l'effet de la BK. La combinaison des deux antagonistes inhibe simultanément les réponses de l'estomac à la BK et à la desArg⁹BK. Ces résultats suggèrent que la différence observée dans le profil de contraction des agonistes B₁ et B₂ serait manifestement due au type de récepteur stimulé: la contraction rapide est due à la stimulation du récepteur B₂ par la BK tandis que la réponse lente est provoquée par le récepteur B₁, stimulé par la desArg⁹BK.

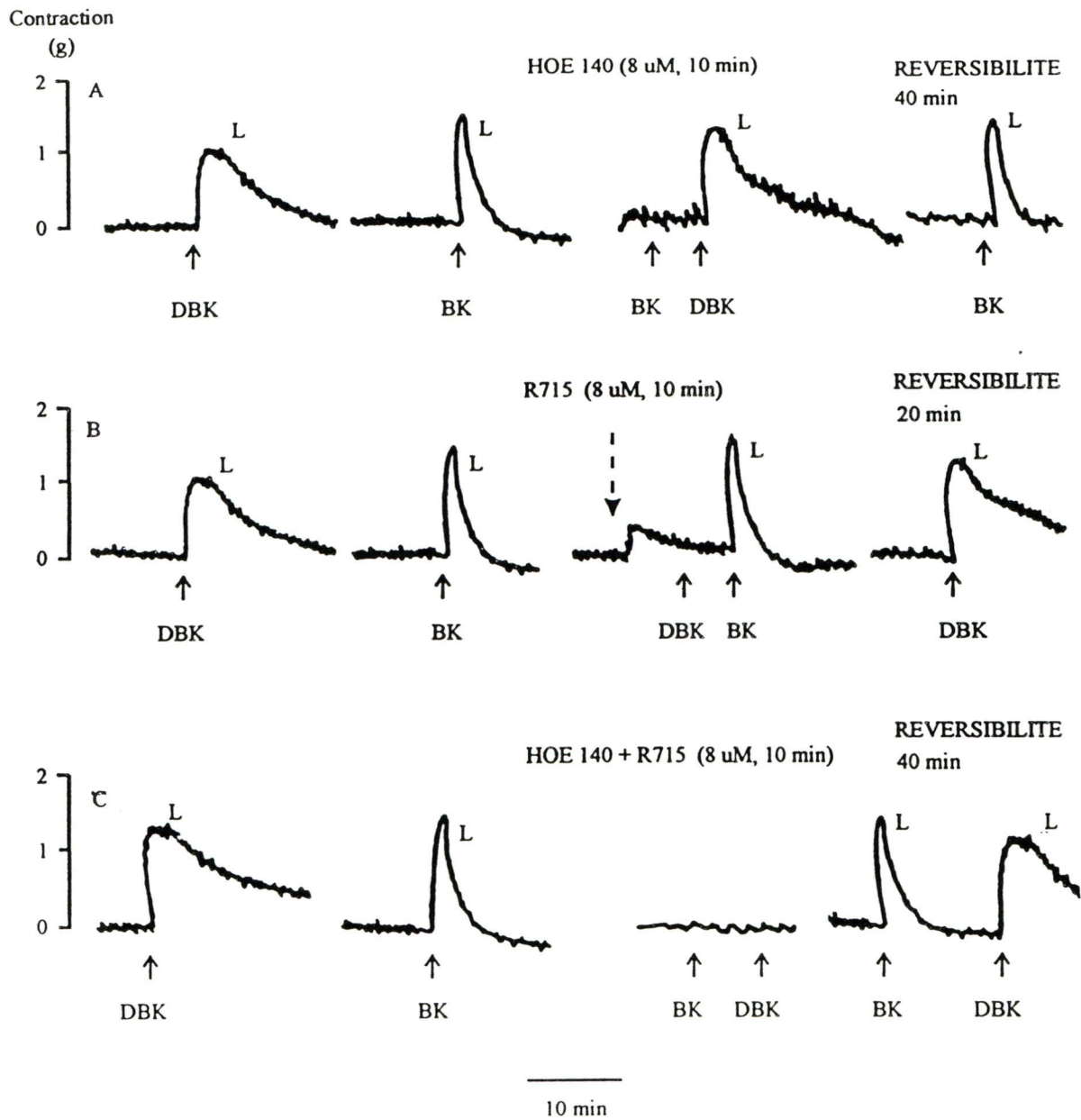
3-1.6 Caractérisation des récepteurs de kinines par les deux critères de Schild

Les récepteurs B₁ et B₂ des kinines ont été caractérisés sur les préparations tissulaires de souris par l'utilisation des agonistes sélectifs et d'antagonistes compétitifs dans le but d'établir l'ordre de puissance des agonistes et d'estimer les affinités apparentes des antagonistes, qui sont les deux critères nécessaires pour appliquer la classification des récepteurs proposée par Schild (1973).

Figure 7: Tracés typiques montrant les effets myotropes de la BK (5.10^{-9} M) et de la desArg⁹BK (3.10^{-8} M) sur l'estomac de souris. En A, les effets de la desArg⁹BK et la BK sont mesurés avant et parés un traitement de 10 min., avec HOE 140, un antagoniste du récepteur B₂ qui inhibe BK et ne modifie pas l'effet de la desArg⁹BK. En B, les effets de desArg⁹BK et BK sont mesurés avant et un traitement de 10 min., avec R 715, un antagoniste du récepteur B₁ qui inhibe l'effet de desArg⁹BK et n'affecte pas la réponse de BK. En C, les effets de desArg⁹BK et BK sont mesurés après un traitement simultané avec les deux antagonistes HOE 140 et R 715. Les effets inhibiteurs des deux antagonistes sont réversibles. L: lavage. DBK: desArg⁹BK

Abscisse: temps

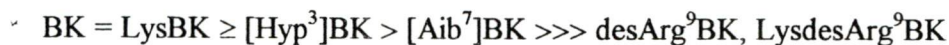
Ordonnée: contraction en grammes.



3-1.6a Ordre de puissance des agonistes des récepteurs B₁ et B₂

Les agonistes naturels BK et LysBK aussi bien que leurs métabolites desArg⁹BK et LysdesArg⁹BK, et quelques agonistes sélectifs tels que [Hyp³]BK, [Aib⁷]BK et Sar[DPhe⁸]desArg⁹BK ont été extensivement utilisés dans cette étude.

Tel que montré dans le tableau V, les agonistes utilisés sont des agonistes purs (voire valeurs de α^E) sur les deux préparations, à savoir l'estomac et la vessie de souris. En fait, les réponses maximales des tissus aux divers agents, exprimées en terme de α^E (activité agoniste intrinsèque), sont toutes proches de l'unité (tableau V); ainsi les affinités apparentes de tous ces agents peuvent être exprimées en termes de pD₂. Les agonistes des récepteurs B₂ (BK, LysBK, [Hyp³]BK, [Aib⁷]BK) sont inactifs sur les récepteurs B₁; de même, les agonistes des récepteurs B₁ (desArg⁹BK, LysdesArg⁹BK, Sar[DPhe⁸]desArg⁹BK) ne stimulent pas les récepteurs B₂. Pour ce qui est des agonistes des récepteurs B₂, [Hyp³]BK est de 0.5 unité Log plus actif que [Aib⁷]BK tandis que BK et LysBK stimulent les récepteurs B₂ avec la même affinité (pD₂ 8.7) sur l'estomac et sur la vessie. L'ordre de puissance des agonistes ainsi établi sur les récepteurs B₂ de l'estomac et la vessie de souris est le même dans les deux tissus, à savoir:



cependant, [Hyp³]BK est beaucoup plus actif sur la vessie que sur l'estomac.

D'après ce même tableau, les résultats obtenus avec les trois agonistes des récepteurs B₁ montrent que ces trois composés sont équipotents. Ainsi, l'ordre de puissance des agonistes des récepteurs B₁ sur l'estomac s'établit comme suit:



Tableau V. Profils pharmacologiques in vitro des agonistes des récepteurs B₁ et B₂ des kinines sur les tissus de souris

AGONISTES	Préparations								
	Estomac (fundus)						Vessie		
	Récepteur B ₂			Récepteur B ₁			Récepteur B ₂		
	pD ₂	A.R.	αE	pD ₂	A.R.	αE	pD ₂	A.R.	αE
BK	8.69±0.16	100	1.00	Inactif			7.71±0.06	100	1.00
LysBK	8.70±0.08	102	0.98	-			7.68±0.07	104	1.01
[Hyp ³]BK	7.98±0.02	19	0.97	Inactif			7.74±0.08	107	1.02
[Aib ⁷]BK	7.66±0.08	9	1.01	Inactif			6.91±0.13	16	1.02
DesArg ⁹ BK	Inactif			7.65±0.07	100	1.00	Inactif		
LysDesArg ⁹ BK	Inactif			7.70±0.12	112	0.97	Inactif		
Sar[DPhe ⁸]Des Arg ⁹ BK	Inactif			7.78±0.08	135	1.09	Inactif		

Note. pD₂ Log₁₀ négatif de la concentration molaire (M) de l'agoniste qui produit 50% de la réponse maximale.

A.R.: Affinité relative exprimée en pourcentage de BK pour les récepteurs B₂ et de desArg⁹BK pour les récepteurs B₁. αE: Activité agoniste intrinsèque. Inactif: indique qu' aucune activité agoniste n est observée à une concentration supérieure à 10 μM. Les valeurs indiquent la moyenne ± l'erreur standard, sur la moyenne d'au moins 7 à 15 déterminations.

Notons que la présence d'un résidu Lys additionnel à l'extrémité N-terminal de desArg⁹BK, ne mène pas à une augmentation de l'affinité du composé LysdesArg⁹BK chez la souris, contrairement aux résultats observés chez d'autres espèces (lapin et l'homme (Regoli *et al.*, 1997), où LysdesArg⁹BK est plus puissant que la desArg⁹BK.

3-1.6b Caractérisation des récepteurs des kinines par les antagonistes

Les affinités apparentes (pA_2) et les effets agonistes résiduels (α^E) des antagonistes utilisés dans cette étude, sont présentés dans le tableau VI. Trois générations d'antagonistes des récepteurs B₂ des kinines ont été largement étudiées: Les composés peptidiques tels que DArg[Hyp³, DPhe⁷, Leu⁸]BK et DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK représentent la première génération des antagonistes des récepteurs B₂. Le composé DArg[Hyp³, DPhe⁷, Leu⁸]BK est de 0.5 à 1 unité Log plus puissant que DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK sur la vessie et sur l'estomac; ces deux composés, malgré leurs affinités apparentes relativement élevées, possèdent des activités agonistes résiduelles importantes se manifestant particulièrement sur l'estomac ($\alpha^E \geq 0.50$). Nos résultats démontrent que ces composés agissent comme des agonistes partiels et, ne peuvent donc être considérés comme des outils adéquats pour la caractérisation des récepteurs B₂ chez la souris puisque lesdits effets agonistes interfèrent avec la mesure réelle des activités antagonistes. De plus, ces deux antagonistes maintiennent une faible activité antagoniste sur les récepteurs B₁ ($pA_2 = 5.70$ et 6.10 respectivement). HOE 140, représentant de la deuxième génération d'antagonistes des récepteurs B₂, possède une forte affinité apparente de 8.30 environ et une activité agoniste résiduelle très faible ($0 < \alpha^E \leq 0.13$); HOE 140 est inactif sur les récepteurs B₁ même à fortes doses.

Tableau VI. Les profils pharmacologiques in vitro des antagonistes des récepteurs B₁ et B₂ des kinines sur les tissus de souris

COMPOSES	TISSUS					
	Estomac		(fundus)		Vessie	
	Récepteur B ₂		Récepteur B ₁		Récepteur B ₂	
	pA ₂	α E	pA ₂	αE	pA ₂	α E
DArg[Hyp ³ ,DPhe ⁷]BK	7.05±0.03 ^a	0.57 ^a	6.10±0.01 ^b	0.44 ^b	6.97±0.02	0.12
DArg[Hyp ³ ,DPhe ⁷ ,Leu ⁸]BK	6.78±0.03	0.84	5.70±0.03 ^b	0.19 ^b	7.34±0.03	0.18
DArg[Hyp ³ , Thi ⁵ , DTic ⁷ , Oic ⁸]BK (HOE 140)	8.06±0.01 ^a	0.52 ^a	-	-	-	-
WIN 64338	8.28±0.05	0.13	Inactif		8.64±0.04	0
FR 173657	5.00±0.03	0	Inactif		< 5.00	0
	8.09±0.07	0.07	Inactif		8.45±0.03	0.01
[Leu ⁸]desArg ⁹ BK	Inactif		6.93±0.06	0.64	Inactif	
Lys[Leu ⁸]desArg ⁹ BK	Inactif		7.00±0.09	0.70	Inactif	
DArg[Hyp ³ ,Thi ⁵ ,DTic ⁷ ,Oic ⁸]des Arg ⁹ BK	5.38±0.09 ^a	0.21 ^a	7.21±0.07 ^b	0.48 ^b	5.08±0.01	0.05
DArg[Hyp ³ ,DPhe ⁷]desArg ⁹ BK	5.05±0.01 ^a	0.20 ^a	6.95±0.01 ^b	0.52 ^b	-	-
AcLys[D Nal ⁷ ,Ile ⁸]desArg ⁹ BK (R-715)	Inactif		7.00±0.02	0.16	Inactif	

Note. pA₂: Log₁₀ négatif de la concentration molaire (M) d antagoniste qui réduit l'effet d'une dose double d'agoniste à celui d'une dose simple. α^E: Activité agoniste résiduelle. Inactif: indique qu'aucun effet antagoniste n'est observé à une concentration supérieure à 10 μM. Les valeurs indiquent la moyenne ± l'erreur standard, d'au moins 4 à 7 déterminations. ^a : valeurs de pA₂ et d'α^E mesurées en présence de R-715 (8.10⁻⁶ M). ^b: valeurs de pA₂ et d'α^E mesurées en présence de HOE 140 (8.10⁻⁶ M).

WIN 64338 et FR 173657, deux antagonistes non peptidiques des récepteurs B_2 sont complètement dépourvus d'effets agonistes résiduels ($\alpha^E = 0$) mais par contre, ils présentent des profils pharmacologiques opposés quant à leurs affinités apparentes. WIN 64338 est pratiquement inactif sur les deux préparations, contrairement au nouveau composé FR 173657 qui montre une forte affinité, $pA_2 \geq 8.09$ sur les récepteurs B_2 . Ces deux composés sont inactifs sur les récepteurs B_1 même aux fortes concentrations. Il est important de noter que le composé DArg[Hyp³, DPhe⁷, Leu⁸]BK est plus actif que le WIN 64338 sur les récepteurs B_2 de la souris par au moins 2 unités Log.

Sur les récepteurs B_1 , les antagonistes classiques tels [Leu⁸]desArg⁹BK et Lys[Leu⁸]desArg⁹BK, maintiennent des effets agonistes résiduels très importants ($\alpha^E \geq 0.60$) et des affinités apparentes relativement élevées (pA_2 6.9-7.0). Ces résultats indiquent que ces deux composés agissent comme des agonistes partiels et sont complètement inactifs sur les récepteurs B_2 . De même que DArg[Hyp³, DPhe⁷, Leu⁸]BK et DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK, les composés [Leu⁸]desArg⁹BK et Lys[Leu⁸]desArg⁹BK ne sont pas utilisables pour la caractérisation des récepteurs B_1 des kinines dans nos préparations non vasculaires de souris.

Par contre, AcLys[D β Nal⁷, Ile⁸]desArg⁹BK (R715), un nouveau composé synthétisé dans notre laboratoire à partir de modifications structurelles des antagonistes classiques des récepteurs B_1 , montre une affinité relativement forte (pA_2 7.00) et surtout un effet agoniste résiduel faible ou presque nul ($0 < \alpha^E \leq 0.16$). Il représente donc l'antagoniste de choix pour une étude de caractérisation des récepteurs B_1 chez la souris. D'autres antagonistes des récepteurs B_1 tels DArg[Hyp³, Thi⁵, DTic⁷, Oic⁸]desArg⁹BK et DArg[Hyp³, DPhe⁷]desArg⁹BK possèdent des activités

antagonistes faibles sur les récepteurs B₂ (pA₂ variant de 5.00 à 5.40) de même que les activités agonistes résiduelles élevées ($\alpha^E=0.5$). Ces composés, malgré leurs bonnes affinités apparentes sur les récepteurs B₁ (pA₂ \pm 7.00), ne sont pas utilisables pour une étude de caractérisation pharmacologique des récepteurs B₁ chez la souris.

Les affinités apparentes des antagonistes des récepteurs B₁ obtenues dans nos expériences indiquent que les cinq antagonistes étudiés sont équipotents sur les récepteurs B₁.(tableau VI).

3-1.7 Etude des effets agonistes résiduels des antagonistes DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK et [Leu⁸]desArg⁹BK sur l'estomac de souris.

Dans cette partie de l'étude, nous avons voulu préciser la nature des effets agonistes résiduels des antagonistes peptidiques des récepteurs B₂, DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK et des récepteurs B₁, [Leu⁸]desArg⁹BK. Pour cela, nous avons utilisé HOE 140 (anti-B₂), R715 (anti-B₁) et mergetpa (inhibiteur des carboxypeptidases N ou M). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 8 . L'effet agoniste résiduel de DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK est complètement inhibé par HOE 140 (8 μ M). Par contre, cet effet n'est pas réduit de façon significative par le R 715 (8 μ M) ni par le mergetpa (1 μ M); l'effet de DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK est réversible après 20 à 30 min. (n= 7). Ces résultats indiquent que l'activité agoniste résiduelle de DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK est médiée par les récepteurs B₂ et non par les récepteurs B₁ et de plus, que DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK n'est pas converti en antagoniste du récepteur B₁ correspondant (DArg[Hyp³, DPhe⁷]desArg⁹BK).

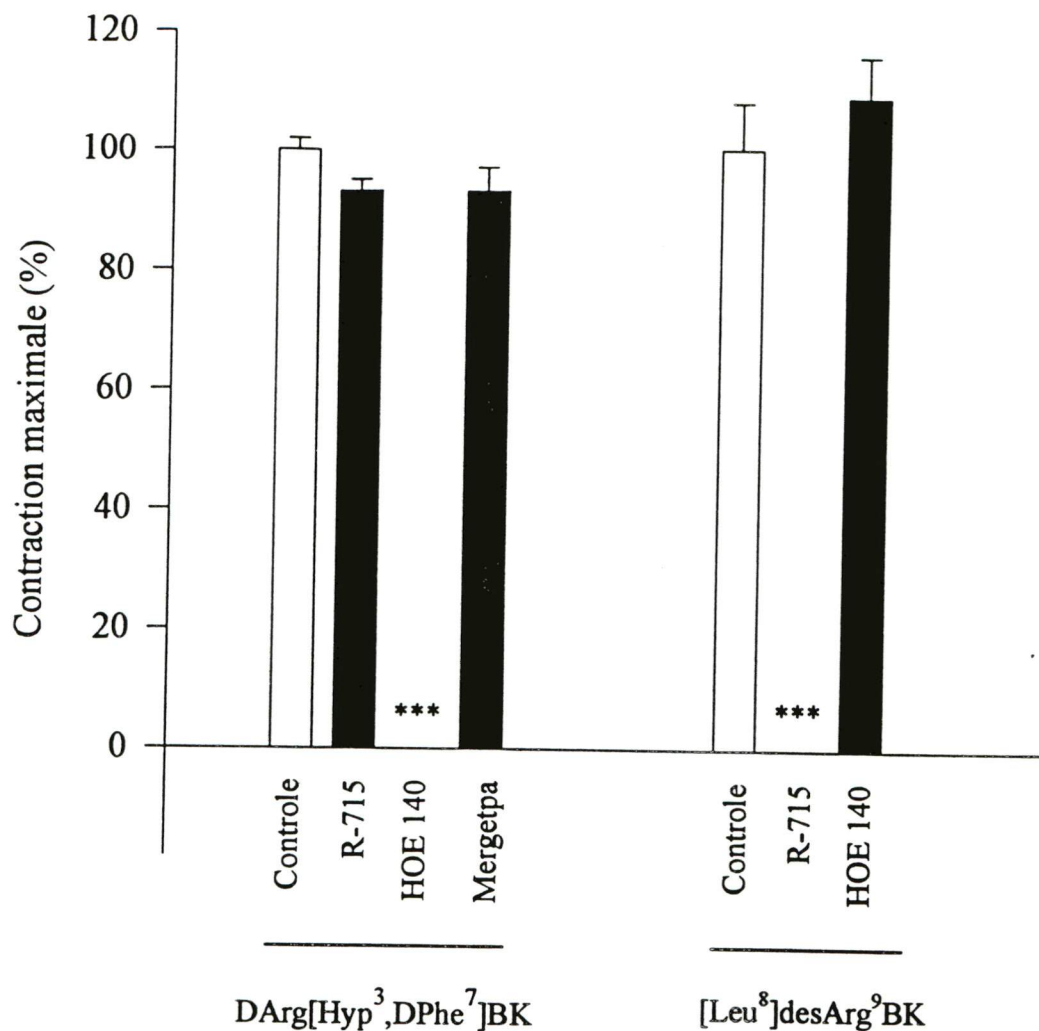


Figure 8: Effets de HOE 140 (3.88×10^{-8} M), un anti-B₂, de R 715 (8.75×10^{-6} M), un anti-B₁ et de mergetpa ($4,21 \times 10^{-5}$ M), un inhibiteur des carboxypeptidases N et M, sur les activités agonistes résiduelles de D Arg[Hyp³, DPhe⁷]BK (2.10^{-7} M) et de [Leu⁸]desArg⁹BK (2.87×10^{-7} M) sur l'estomac de souris. Les colonnes en blanc représentent les résultats obtenus en absence d'antagoniste. Les colonnes en noir représentent les résultats obtenus en présence d'antagoniste. (n= 7)

Abscisse: traitements

Ordonnée: effets contractiles de la DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK et de la [Leu⁸]desArg⁹BK exprimés en pourcentage (%) des contractions maximales des tissus non traités (témoin).

L'effet agoniste de [Leu⁸]desArg⁹BK est bloqué par R 715 incubé pendant 10 min. (n= 7); suggérant ainsi que l'activité agoniste résiduelle de [Leu⁸]desArg⁹BK se fait via les récepteurs B₁.

Les résultats de cette étude sur les antagonistes DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK et [Leu⁸]desArg⁹BK permettent de supposer que les effets résiduels d'autres composés analogues tels le DArg[Hyp³, DPhe⁷, Leu⁸]BK et le Lys[Leu⁸]desArg⁹BK pourraient être dus respectivement à l'activation des récepteurs B₂ et B₁.

3-1.8 Etude de la nature de compétitivité des antagonistes HOE 140, R 715, et de l'antagoniste non peptidique FR 173657 par la méthode de la régression linéaire de Schild

Dans cette partie du travail, nous avons évalué le type d'antagonisme exercé par HOE 140, FR 173657 et R 715, trois antagonistes des récepteurs des kinines qui ont été trouvés utiles pour la caractérisation des récepteurs B₁ et B₂ chez la souris dans la présente étude. Pour cela, nous avons réalisé une série d'expériences dans lesquelles des concentrations croissantes des trois composés ont été utilisées dans le but d'obtenir les données nécessaires pour la construction d'un Schild plot et calculer ainsi la dérivation selon Schild (1973). Les résultats obtenus avec HOE 140 et FR-173657 sont présentés dans la figure 9: On observe un déplacement non parallèle des courbes concentration-réponse de la BK et une dépression de l'effet maximal de BK sur l'estomac de souris en présence de concentrations croissantes de HOE 140 et FR 173657 (figure 9A et 9B). La transposition de ces courbes en régression linéaire de Schild donne deux droites dont les pentes sont significativement différentes de l'unité (figure 9C et 9D): Les pentes obtenues de ces régressions linéaires sont de 0.29 (pour

HOE 140) et de 0.49 (pour FR 173657). Ces résultats suggèrent la nature non compétitive des composés HOE 140 et FR 173657 sur les récepteurs B₂ de souris.

Par contre, les courbes concentration-réponses de desArg⁹BK sont déplacées d'une façon proportionnelle vers la droite en présence de R 715 et l'effet maximal de desArg⁹BK observé en présence des concentrations croissantes de R 715 est maintenu (figure 10). La régression linéaire de Schild montre une droite dont la valeur de la pente (0.83) est proche de l'unité et laisse prévoir une interaction à tendance compétitive du R 715 sur les récepteurs B₁. Cette interprétation est consolidée par le fait que l'effet antagoniste de ce composé est rapidement réversible après le lavage du tissu.

Figure 9:

(A et B): Courbes concentration-réponse de la BK obtenues sur l'estomac de souris.

Les courbes sont mesurées en absence et en présence de concentration croissantes de FR 173657 (A) et de HOE 140 (B).

Abscisse: Log_{10} négatif des concentrations molaire (M) de l'agoniste.

Ordonnée: contraction exprimée en pourcentage (%) de la réponse à la BK.

(C et D): Régression linéaire de Schild de FR 173657 (C) et de HOE 140 (D) contre BK sur l'estomac de souris.

Abscisse: Log_{10} négatif de la concentration molaire (M) de l'antagoniste.

Ordonnée: Log_{10} négatif de (Dose-Ratio- 1) de l'agoniste.

Chaque point indique la moyenne \pm l'erreur standard, d'au moins 4 à 7 déterminations.

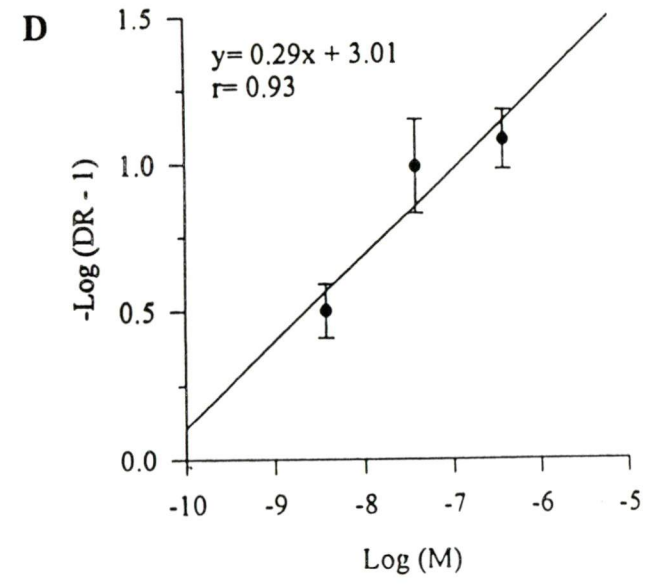
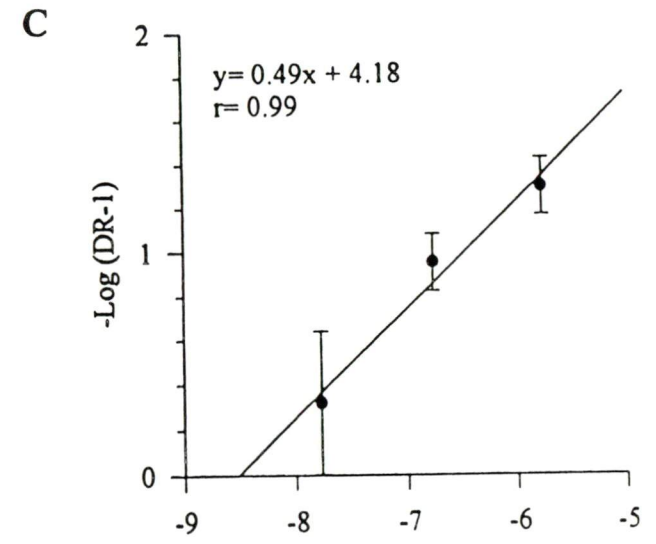
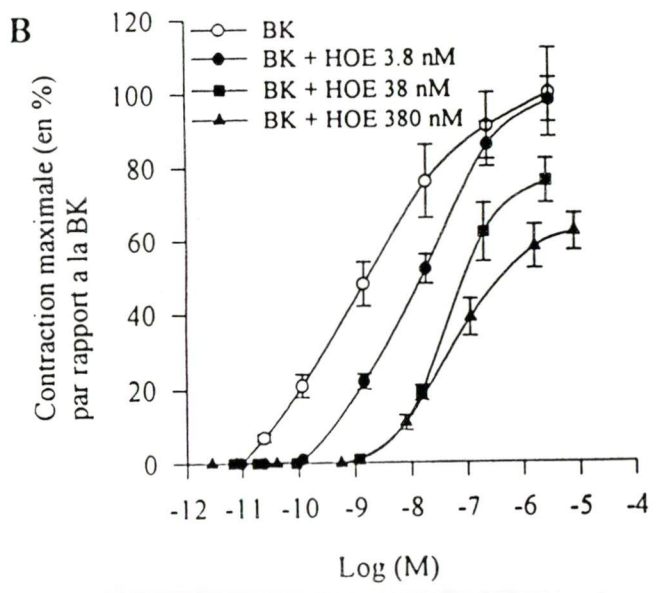
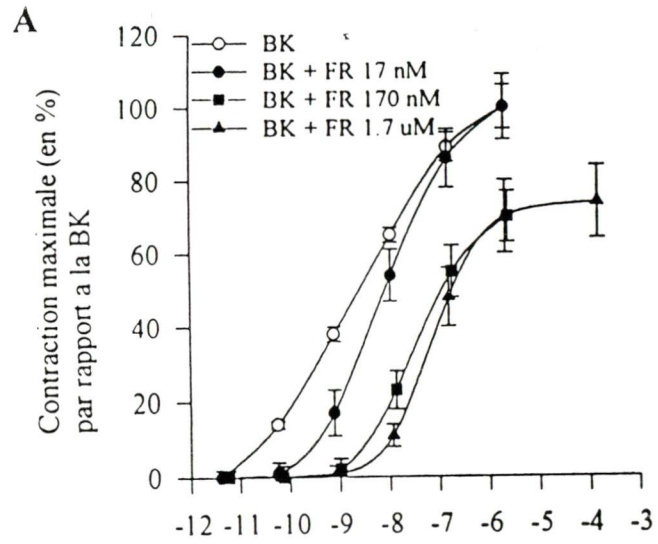


Figure 10:

A: Courbes concentration-réponse de la desArg⁹BK obtenues sur l'estomac de souris en absence et en présence de concentrations croissantes de R 715.

Abscisse: Log₁₀ négatif des concentrations en molaire (M) de l'agoniste.

Ordonnée: contractions exprimées en pourcentage (%) de la réponse de desArg⁹BK.

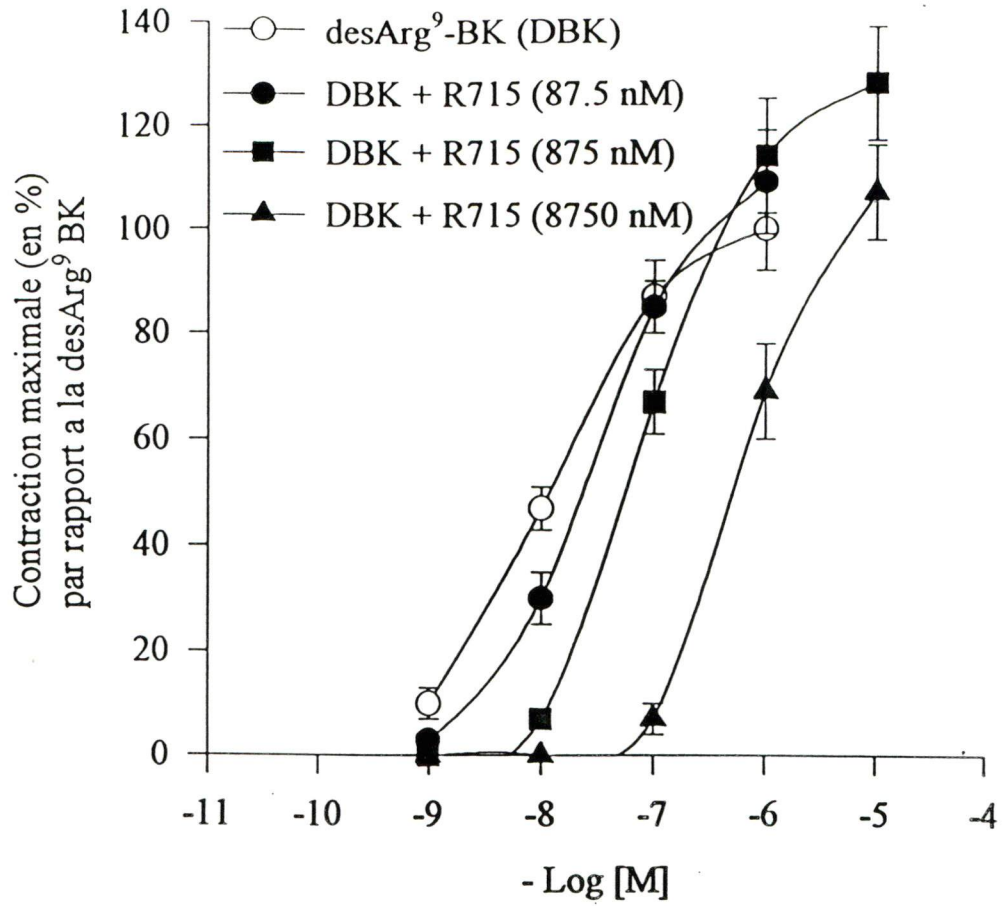
B: Régression linéaire de Schild de R 715 contre la desArg⁹BK sur l'estomac de souris.

Abscisse: Log₁₀ négatif de la concentration molaire (M) de l'antagoniste.

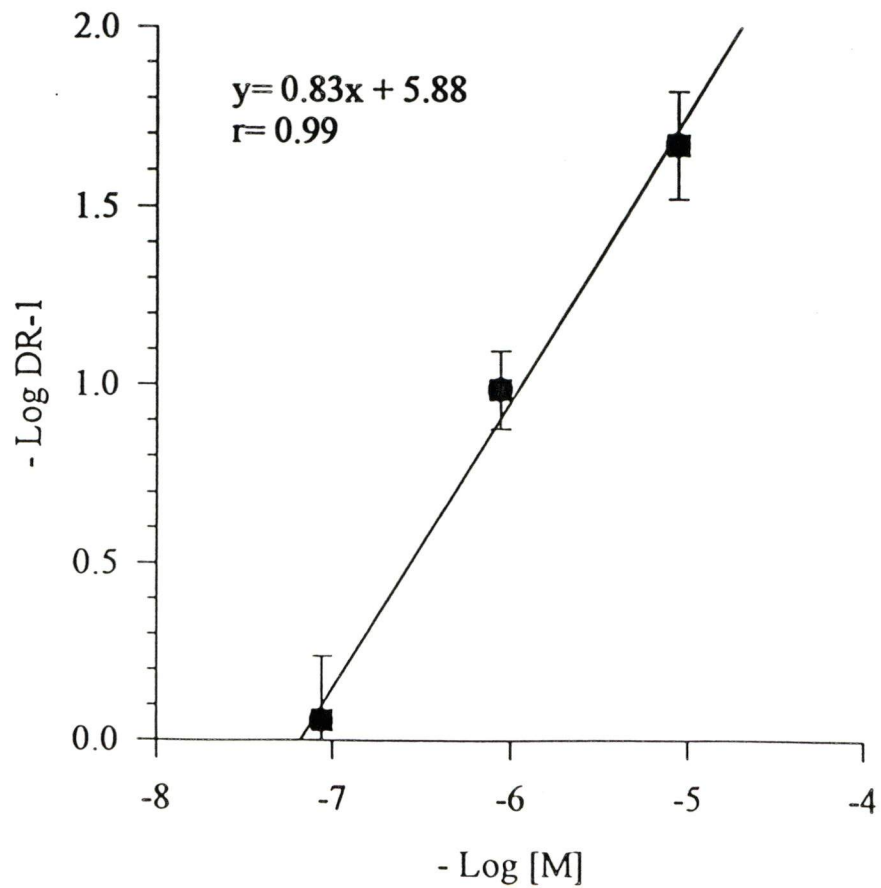
Ordonnée: Log₁₀ négatif de (Dose-Ratio -1) de l'agoniste.

Chaque point indique la moyenne ± l'erreur standard, d'au moins 4 à 8 déterminations.

A



B



3-1.9 Etude de la durée d'action et de la réversibilité de HOE 140, FR 173657 et R 715 sur l'estomac de souris

La durée d'action et la réversibilité de ces composés ont été approximativement évalués suivant le protocole de la figure 11 sur une période de 20, 40, et 60 min. après l'incubation des tissus avec les antagonistes. HOE 140 et FR 173657 sont difficilement réversibles, leurs actions antagonistes persistent 40 min. après le lavage des tissus (n= 6 à 10) ce qui confirme la nature non compétitive des antagonismes exercés par ces composés.

A l'opposé, R 715 est rapidement réversible puisque l'activité biologique de l'agoniste desArg⁹BK est retrouvée entièrement 20 min. après lavage du tissu (n= 6 à 10).

3-1.10 Etude de la spécificité des nouveaux composés R 715 et FR 173657 sur l'estomac de souris

Nos résultats montrent que le R 715 et FR 173657 aux concentrations respectives de 2.2 μ M et 4.2 μ M n'influencent pas les réponses à l'angiotensine II (24 nM), de l'acétylcholine (0.5 μ M) et de la substance P (2 nM) sur l'estomac de souris, démontrant ainsi une certaine spécificité de R715 envers les récepteurs B₁ et du FR173657 envers les récepteurs de type B₂ des kinines (tableau VII). De plus, la sélectivité de ces composés a été vérifiée sur les récepteurs B₁ et B₂ de la même préparation de souris (figure 7 et tableau VII): en présence de R 715 (8 μ M ou 2.2 μ M), seule la réponse de la desArg⁹BK a été diminuée fortement (celle de la BK restant inchangée). De même, 4.2 μ M de FR 173657 inhibe significativement la réponse à la BK et demeure sans effet sur celle de desArg⁹BK .

Figure 11: Etude de la durée d'action et de la réversibilité de HOE 140, FR 173657 et R 715 sur des tissus provenant de l'estomac de souris. Ces deux paramètres sont évalués à 20, 40, et 60 min. après le traitement avec les antagonistes. En A, le HOE 140 inhibe l'effet contractile produit par la BK. HOE 140 est totalement réversible après 40 min. En B, le FR-173657 bloque la réponse myotrope induite par la BK. Son effet persiste encore à 40 min. A 60 min., on obtient la réversibilité complète. En C, R-715 inhibe la réponse contractile de la desArg⁹BK (DBK). La réversibilité est obtenue 20 min. après le traitement.

Abscisse: temps

Ordonnée: contraction en grammes.

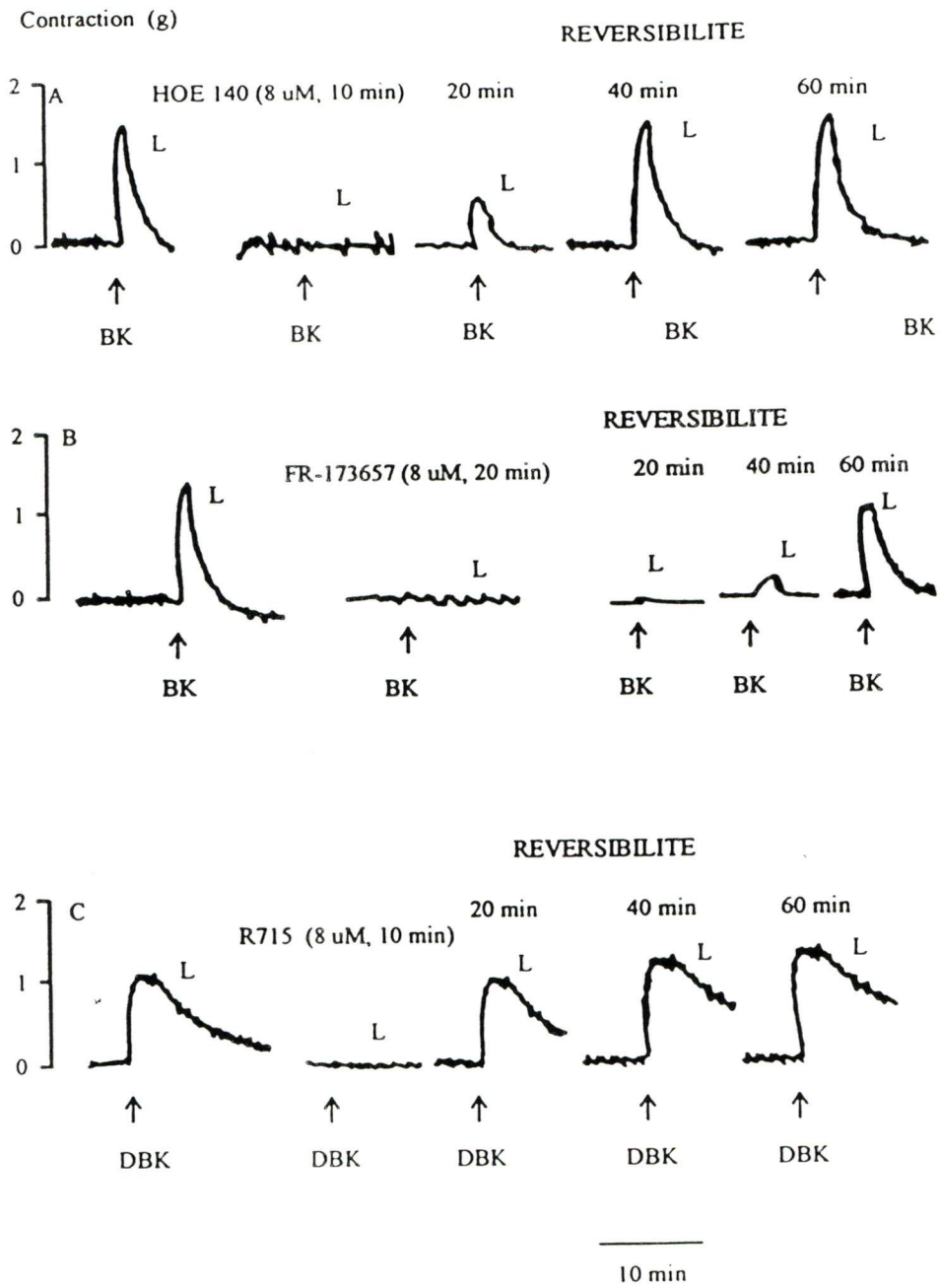


Tableau VII. Spécificité d'action des nouveaux antagonistes AcLys[D NaI⁷,Ile⁸]desArg⁹BK (R715) et FR 173657 sur les récepteurs des kinines de l'estomac de souris.

Agonistes (Conc.)	Contrôle	R-715 (2.2 µM)	Contrôle	FR 173657 (4.2 µM)
BK (10 nM)	1.12±0.07	1.11±0.05	1.13±0.03	0 ***
DesArg ⁹ BK (9 nM)	0.64±0.05	0 ***	0.63±0.06	0.65±0.07
Acetylcholine (0.55 µM)	0.79±0.02	0.82±0.02	0.73±0.03	0.72±0.02
Substance P (2 nM)	0.80±0.04	0.82±0.08	0.61±0.01	0.54±0.02
Angiotensine II (24 nM)	0.50±0.02	0.57±0.02	0.58±0.02	0.65±0.04

Note. Les valeurs indiquent les réponses contractiles de l'estomac (exprimées en grammes) aux agonistes (moyennes ± s.e.m. de 4-5 expériences), *** p< 0.001.

3-2 Les Neurokinines et leurs récepteurs chez la souris

Les neurokinines naturelles (SP; NKA; NKB) et plusieurs agonistes sélectifs ont été testés dans le but de caractériser les sites fonctionnels qui sont présents dans les tissus de souris et déterminer un ordre de puissance des agonistes. Plusieurs composés antagonistes ont aussi été testés, afin d'appliquer aux récepteurs NK-1 et NK-2 des neurokinines, les deux principaux critères de classification des récepteurs recommandés par Schild (1973).

3-2.1 Effets des neurokinines sur l'estomac et la vessie de souris

La vessie et l'estomac de souris répondent aux neurokinines par des contractions dont l'intensité est dose-dépendante, ce qui en fait des préparations adéquates pour des études *in vitro*. Des exemples de tracés obtenus avec les agonistes sélectifs du récepteur NK-1, le Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(O₂)¹¹]SP (6-11) et du récepteur NK-2, soit [β-Ala⁸]NKA (4-10) sur l'estomac de souris sont illustrés dans les figures 12. Ces agents produisent une élévation de la tension qui est rapidement réversible après le lavage des tissus. En présence de SR 140333, l'antagoniste des récepteurs NK-1, l'effet de Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(O₂)¹¹]SP (6-11) est complètement aboli (figure 12A). De même, les réponses de l'estomac à la [β-Ala⁸]NKA (4-10) sont réduites en présence de SR 48968, l'antagoniste des récepteurs NK-2 (figure 12B). La Figure 13 est une illustration de l'effet des antagonistes précédents sur les courbes concentration-réponses obtenues avec Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(O₂)¹¹]SP (6-11) (figure 13A) et [β-Ala⁸]NKA (4-10) (figure 13B): on note un déplacement de la courbe concentration-réponse de Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(O₂)¹¹]SP (6-11) vers la droite et une dépression de l'effet maximal de cet agoniste sur l'estomac de souris en présence de SR 140333

(figure 13A); d'une autre part, la présence de SR 48968 conduit à un déplacement de la courbe concentration-réponse de $[\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}$ (4-10) vers la droite et une diminution des réponses maximales de l'estomac à cet agent (figure 13B). Par contre, on note dans les deux cas (figures 12 et 13), que l'effet de $\text{Ac}[\text{Arg}^6, \text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}]\text{SP}$ (6-11) n'est pas modifié en présence de SR 48968, et que SR 140333 n'affecte pas l'effet de $[\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}$ (4-10).

Seuls les agonistes des récepteurs NK-2 produisent des effets myotropes sur la vessie de souris, effets qui, par ailleurs, sont bloqués par le SR 48968, tandis que le SR 140333 reste inactif contre ces effets (résultats non montrés).

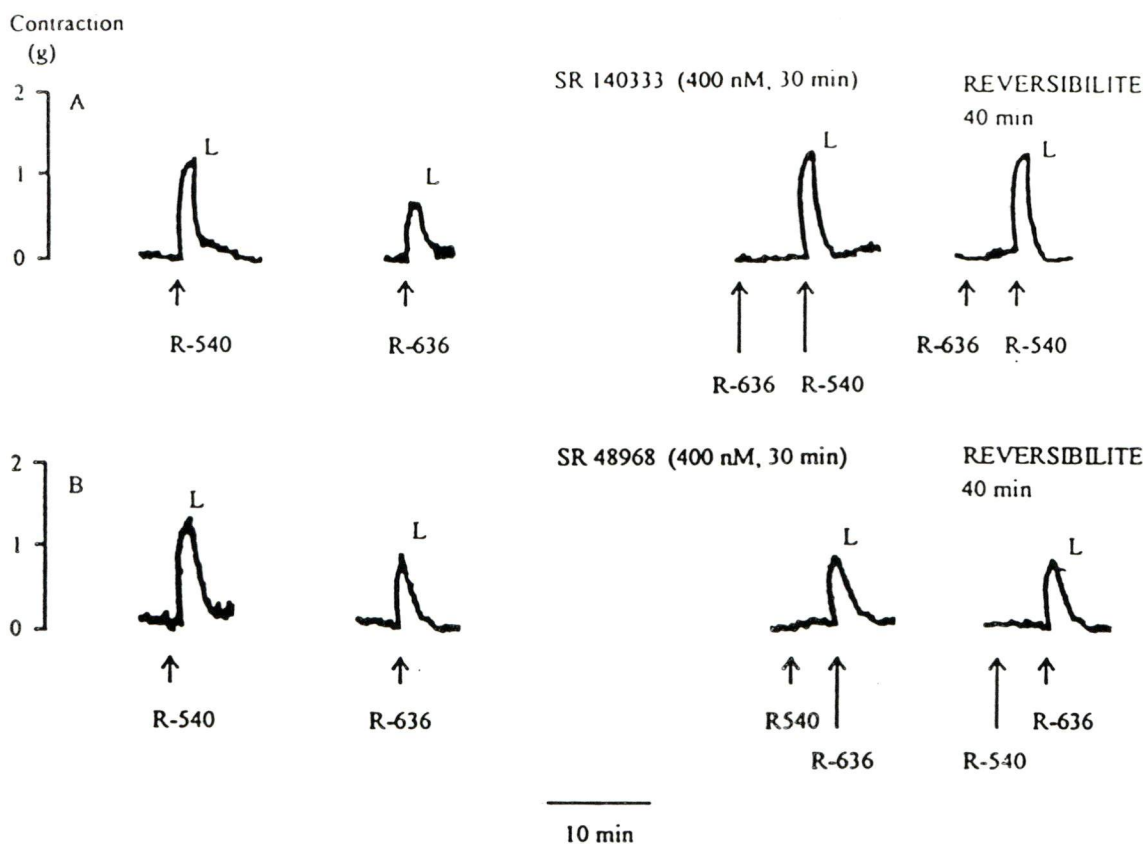


Figure 12: Tracés typiques montrant les effets myotropes de la Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(O₂)¹¹]SP(6-11) (2.10⁻⁸ M) et de la [β-Ala⁸]NKA (4-10) (9.10⁻⁹ M) sur l'estomac de souris. En A, les effets de la Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(O₂)¹¹]SP(6-11) (R-636) et de la [β-Ala⁸]NKA(4-10) (R-540) sont mesurés avant et après 30 min. de traitement avec SR 140333, un antagoniste des récepteurs NK-1, qui inhibe l'effet de la Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(O₂)¹¹]SP(6-11) et ne modifie pas celui de la [β-Ala⁸]NKA (4-10). L'antagoniste montre une longue durée d'action, n'étant pas réversible après 40 min. En B, les effets de la Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(O₂)¹¹]SP(6-11) et de la [β-Ala⁸]NKA (4-10) sont obtenus en absence et en présence de SR 48968, un antagoniste des récepteurs NK-2, qui bloque la contraction induite par la [β-Ala⁸]NKA (4-10) et ne change pas l'effet de la Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(O₂)¹¹]SP(6-11). L'antagoniste montre une durée d'action prolongée car son effet n'est pas réversible après 40 min. L: lavage.

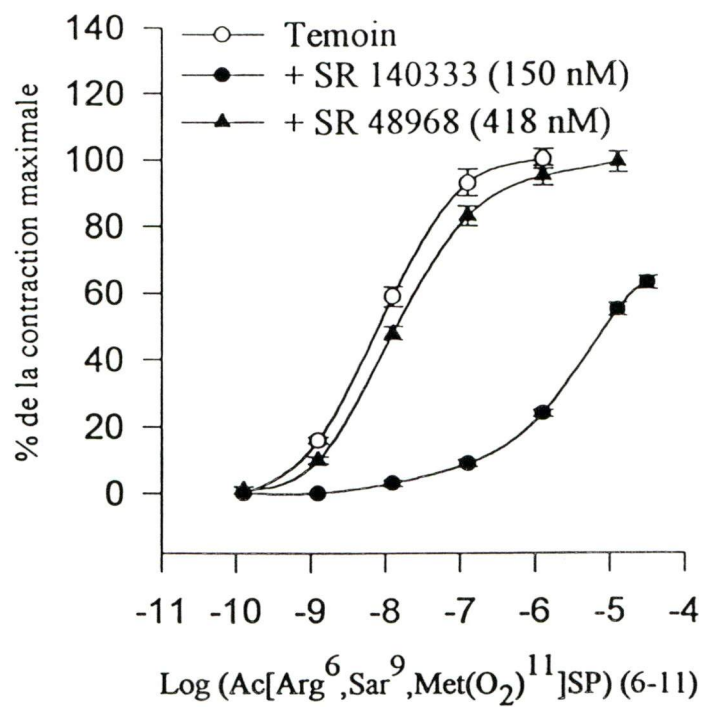
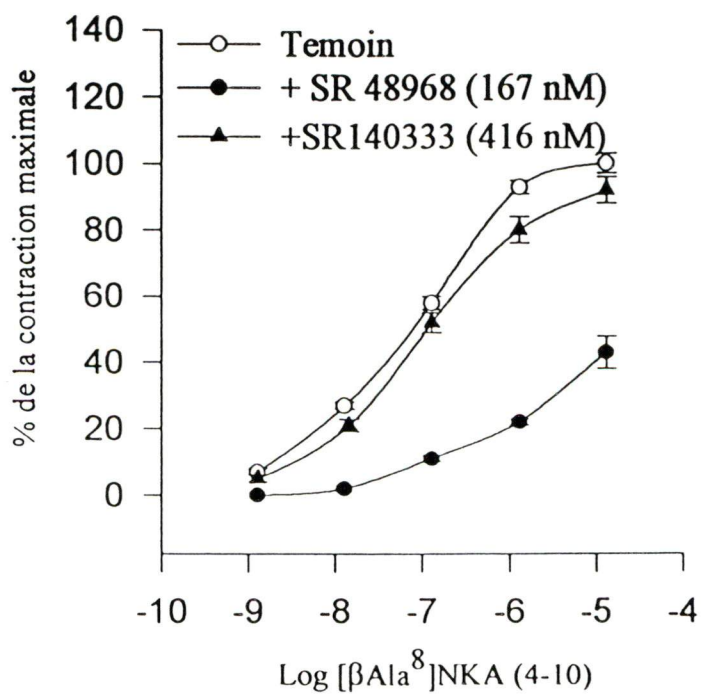
Abscisse: temps

Ordonnée: contraction en grammes.

Figure 13: Les courbes concentration-réponses obtenues sur l'estomac de souris avec Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(O₂)¹¹]SP (6-11) (en haut) en absence (o) et en présence de SR 140333 (●) ou SR 48968 (▲). Les courbes concentration-réponses obtenues sur une préparation d'estomac de souris avec [β-Ala⁸]NKA (4-10) (en bas) en absence (o) et en présence de SR48968 (●) ou SR 140333 (▲).

Abscisse: concentration molaire (M) de l'agoniste.

Ordonnée: effet maximal en pourcentage (%).

NK₁NK₂

3-2.2 Etude des récepteurs des neurokinines sur l'estomac de souris

3-2.2a Caractérisation du récepteur NK-1 par les 2 critères de Schild

Ordre de puissance des agonistes sur les récepteurs de type NK-1

Plusieurs agonistes connus comme stimulateurs du récepteur NK-1 ont été testés sur l'estomac de souris. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VIII. La substance P (SP) (agoniste naturel) et les agonistes sélectifs des récepteurs NK-1 que nous avons étudiés sont tous actifs et montrent des affinités (pD_2) supérieures à 7.00 sur l'estomac. Les affinités des agonistes SP, $[Sar^9, Met(0_2)^{11}]SP$ et septide sont équivalentes, tandis que $Ac[Arg^6, Sar^9, Met(0_2)^{11}]SP$ (6-11) (pD_2 8.13) est plus puissant d'au moins une unité logarithmique par rapport aux autres composés. Ces résultats indiquent que l'estomac de souris possède des sites fonctionnels de type NK-1 sur lesquels l'ordre de puissance des agonistes est le suivant:

$Ac[Arg^6, Sar^9, Met(0_2)^{11}]SP(6-11) > SP \geq [Sar^9, Met(0_2)^{11}]SP \geq \text{septide} \gg \gg [\beta-Ala^8]NKA(4-10), [MePhe^7]NKB.$

Sur le même tableau, on peut aussi noter qu'un traitement de l'estomac isolé avec un antagoniste du récepteur NK-2, le SR 48968 à forte concentration ($4 \times 10^{-7}M$), ne modifie pas l'affinité (en terme de pD_2) de SP pour les récepteurs NK-1. Ce qui suggère que SP n'interagit pas avec les récepteurs de type NK-2 de l'estomac de souris et fonctionne comme un agoniste sélectif du récepteur NK-1.

Tableau VIII. Affinités apparentes (pD_2) de la substance P et de ses analogues sur les récepteurs NK-1 de souris.

Peptides	Tissus		
	Estomac		Vessie
	pD_2	A.R.	pD_2
Substance P (SP)	7.41±0.08	100	Inactif
* SP	7.37±0.05	90	Inactif
[Sar ⁹ , Met(O ₂) ¹¹]SP (6-11)	7.25±0.08	68	Inactif
Ac[Arg ⁶ , Sar ⁹ , Met(O ₂) ¹¹]SP (6-11)	8.13±0.07	543	Inactif
Septide	7.20±0.06	60	Inactif

Note. * indique que l'affinité de la SP a été mesurée en présence du SR 48968

($4 \times 10^{-7} M$, préincubé pendant 30 min.).

A.R. : activité relative exprimée en pourcentage de l'activité de la SP, l'agoniste de référence.

Tableau IX

Affinités apparentes (pA_2) des antagonistes des récepteurs NK-1 sur l'estomac de la souris

	SR 140333			RP 67580	FK 888	CP 99994
	SP	SP*	Ac[Arg ⁶ ,...]SP*	Ac[Arg ⁶ ,...]SP*	Ac[Arg ⁶ ,...]SP*	Ac[Arg ⁶ ,...]SP*
pA_2	8.12±0.03	8.49±0.05	8.08±0.08	8.41±0.03	6.57±0.04	6.06±0.03

Note. * indique que l'affinité de l'antagoniste a été mesurée en présence du SR 48968

($4 \times 10^{-7} M$, préincubé pendant 30 min.).

Abbréviation; Ac[Arg⁶,...]SP: Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(O₂)¹¹]SP (6-11).

Affinités apparentes (pA_2) des antagonistes des récepteurs NK-1

Quatre antagonistes des récepteurs NK-1 ont été testés contre l'Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(0₂)¹¹]SP (6-11), le puissant agoniste sélectif du récepteur NK-1 (tableau IX). Les résultats obtenus montrent que SR 140333 et RP 67580 sont les composés les plus actifs puisqu'ils possèdent des affinités apparentes (pA_2) d'environ 8.5, contrairement aux composés CP 99994 et FK 888 qui ont des affinités apparentes plus faibles d'au moins 2 unités logarithmiques. En plus, lorsque testés contre la SP en présence d'un antagoniste des récepteurs NK-2, le SR 48968, utilisé à forte concentration, les affinités apparentes (pA_2) des antagonistes des récepteurs NK-1 étudiés, ne sont pas modifiées (tableau IX). L'ensemble de ces résultats confirme que l'estomac possède des sites de type NK-1. L'ordre de puissance des antagonistes des récepteurs NK-1 sur l'estomac de souris est le suivant:

SR 140333 ≥ RP 67580 > FK 888 > CP 99994.

3-2.2b Caractérisation des récepteurs de type NK-2 des neurokinines par les 2 critères de Schild

Ordre de puissance des agonistes: neurokinine A (NKA) et ses congénères sur les récepteurs de type NK-2

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau X: La neurokinine A ou NKA, l'agoniste naturel des récepteurs NK-2, le [β -Ala⁸]NKA(4-10) et le [Nle¹⁰]NKA(4-10), deux agonistes sélectifs des récepteurs NK-2, de même que le neuropeptide γ (NP γ) ont été trouvés actifs sur l'estomac de souris. Les agonistes étudiés montrent des valeurs de pD_2 comprises entre 7.0 et 7.7; le composé les plus

actif est le NKA (pD_2 7.7). Étant donné la co-présence des sites NK-1 et NK-2 sur l'estomac de souris, on a voulu savoir si les récepteurs NK-1 contribuaient à l'activité biologique de NKA; on a donc prétraité les bandelettes d'estomac avec un puissant antagoniste des récepteurs NK-1, le SR 140333 ($4 \times 10^{-7} M$) dans le but d'éliminer les interférences potentielles de ce récepteur. Les résultats obtenus suggèrent que NKA ne stimule pas les sites NK-1 (pD_2 de NKA a pratiquement la même valeur en absence et en présence de SR 140333) (tableau X). Ces résultats indiquent que l'estomac de souris contient des récepteurs de type NK-2 en plus des récepteurs NK-1, et que la vessie ne possède que les récepteurs de type NK-2. L'ordre de puissance des agonistes établit sur les récepteurs NK-2 de l'estomac est le suivant:

NKA > NPγ ≥ [β-Ala⁸]NKA(4-10) > [Nle¹⁰]NKA(4-10) >>> Ac[Arg⁶, Sar⁹,
Met(O₂)¹¹]SP (6-11), [MePhe⁷]NKB.

Dans certaines expériences, nous avons utilisé le côlon de souris et nous avons constaté que ce tissu est riche en récepteurs de type NK-2 (résultats non présentés).

Tableau X. Affinités apparentes (pA_2) de la Neurokinine A et de ses congénères sur les récepteurs NK-2 de la souris.

Peptides	Tissus			
	Estomac		Vessie	
	pD_2	A.R.	pD_2	A.R.
Neurokinine A (NKA)	7.67±0.09	100	6.45±0.03	100
NKA**	7.62±0.01	91		
[β Ala ⁸]NKA (4-10)	6.99±0.10	21	6.15±0.06	50
[Nle ¹⁰]NKA (4-10)	6.40±0.06	5	Inactif	
Neuropeptide γ	7.02±0.05	22	7.15±0.04	506

Note. ** indique que l'affinité de la NKA a été mesurée en présence du SR 140333 (4×10^{-7} M; préincubé pendant 30 min.).

A.R. : activité relative exprimée en pourcentage de l'activité de la NKA, l'agoniste de référence.

Tableau XI. Affinités apparentes (pA_2) des antagonistes des récepteurs NK-2 de la souris.

Antagonistes	Agonistes	Tissus	
		Estomac	Vessie
		pA_2	pA_2
SR 48968	NKA	7.76 ± 0.05	8.64 ± 0.02
	NKA*	8.78 ± 0.01	-
	[β Ala ⁸]NKA (4-10)*	9.05 ± 0.05	-
R-396	NKA	5.62 ± 0.05	5.51 ± 0.03
	NKA*	5.62 ± 0.05	-
	[β Ala ⁸]NKA (4-10)*	6.21 ± 0.05	-
MEN 10627	NKA	7.71 ± 0.04	8.82 ± 0.05
	NKA*	8.08 ± 0.05	-
	[β Ala ⁸]NKA (4-10)*	9.20 ± 0.04	-

Note. * indique que l'affinité de la NKA a été mesurée en présence du SR 140333 (4×10^{-7} M; préincubé pendant 30 min.).

Affinités apparentes (pA_2) des antagonistes des récepteurs NK-2

Les résultats obtenus avec les trois antagonistes des récepteurs NK-2 testés sont présentés dans le tableau XI. SR 48968 et MEN 10627 présentent des pA_2 très élevés ($8.5 < pA_2 < 9.2$) surtout lorsqu'ils sont testés contre l'agoniste sélectif [β -Ala⁸]NKA(4-10) et contre la NKA en présence de SR 140333. Contrairement à ces deux antagonistes, le R 396 est presque inactif sur les récepteurs NK-2 et possède une affinité plus faible d'au moins 3 unités logarithmiques, comparativement aux deux antagonistes précédents. Le pA_2 du R 396 n'augmente pas de façon significative en présence de SR 140333; ceci pourrait s'expliquer en raison de la faible affinité de ce composé pour les récepteurs NK-2 de la souris. L'ordre de puissance des antagonistes des récepteurs NK-2 (étudiés dans le tableau XI) sur l'estomac de souris est :

MEN 10627 > SR 48968 > R396.

Tableau XII. Affinités apparentes (pD_2) de la NKB et de ses analogues sur les récepteurs NK-3 de la souris.

Peptides	Tissus		
	Estomac		Vessie
	pD_2	A.R.	pD_2
Neurokinine B (NKB)	7.30 ± 0.11	100	Inactif
NKB*	6.87 ± 0.10	37	-
NKB**	6.43 ± 0.09	13	-
NKB***	5.92 ± 0.09	4	-
[MePhe ⁷]NKB	5.93 ± 0.09	4 (100)	Inactif
[MePhe ⁷]NKB***	5.35 ± 0.06	(33)	-
Senktide	Inactif		Inactif

Note. A.R. : activité relative exprimée en pourcentage de l'activité de la NKB, l'agoniste de référence.

Les valeurs entre parenthèses indiquent les affinités relatives (%) comparées avec l'agoniste de référence [MePhe⁷]NKB non traitée.

*: Indique que l'affinité de la NKB a été mesurée en présence du SR 48968

(4×10^{-7} M; préincubé pendant 30 min.).

** : Indique que l'affinité de la NKB a été mesurée en présence du SR 140333

(4×10^{-7} M; préincubé pendant 30 min.).

***: Indique que l'affinité de l'agoniste a été mesurée en présence de SR 48968 et

SR 140333 (4×10^{-7} M; préincubé pendant 30 min. respectivement).

3-2.2c Ordre de puissance des agonistes du récepteur NK-3: neurokinine B (NKB), [MePhe⁷]NKB et senktide.

NKB et deux agonistes sélectifs des récepteurs NK-3 ([MePhe⁷]NKB et senktide) ont été testé en absence et en présence d'antagonistes des récepteurs NK-1 (SR 140333) et NK-2 (SR 48968) sur l'estomac isolés de souris (tableau XII). NKB a montré un pD_2 de 7.3 qui est réduit en présence de SR 140333 ($4 \times 10^{-7} M$) ou de SR 48968 ($4 \times 10^{-7} M$). Le co-traitement des tissus avec ces deux antagonistes provoque une baisse de plus d'une unité logarithmique dans l'affinité de NKB, ramenant la valeur de pD_2 de NKB à 5.92, donc approximativement identique à celle de l'agoniste sélectif du récepteur NK-3, le [MePhe⁷]NKB ($pD_2 = 5.93$). De même, la présence des antagonistes SR 140333 et SR 48968 aux mêmes concentrations, réduit légèrement la valeur de pD_2 de [MePhe⁷]NKB (de 0.5 unité logarithmique). Ces données suggèrent la contribution des récepteurs NK-1 et NK-2 dans la réponse contractile induite par les agonistes NK-3, utilisés à fortes concentrations. Le deuxième agoniste sélectif des récepteurs NK-3, le senktide est inactif. Ce qui indique que l'estomac contient une faible population de récepteurs de type NK-3, puisque les agonistes NK-3 maintiennent une activité substantielle en présence des antagonistes SR 140333 et SR 48968.

Tableau XIII. Affinités apparentes (pA_2) d'antagonistes sélectifs aux récepteurs NK-3, mesurées contre l'effet myotrope de la $[MePhe^7]NKB$.

Tissus	SR 142801		R-486	
	pA_2	α^E	pA_2	α^E
Estomac	5.07 ± 0.09	0.18	N.M.	0.92

Note. N.M.: Activité antagonistique non mesurable suite à une activité agoniste intrinsèque trop élevée (α^E 0.92). R-486; $[Trp^7, \beta Ala^8]NKA$ (4-10).

3-2.2d Affinités apparentes (pA_2) des antagonistes des récepteurs NK-3

Deux composés, le R 486 et le SR 142801, ont été utilisés pour déterminer et éventuellement confirmer l'existence possible des sites NK-3 fonctionnels sur l'estomac de souris. R 486 agit comme un agoniste puisqu'il est caractérisé par une activité intrinsèque (α^F) de 0.9. Il a donc été impossible de déterminer la valeur du pA_2 de ce composé. Par contre, le SR 142801 qui présente un faible effet agoniste ($\alpha^E = 0.18$), est cependant presque inactif ($pA_2 = 5.1$) (tableau XIII). Cette donnée indique que le récepteur NK-3 est en quantité extrêmement faible sur l'estomac de souris.

Des tentatives de recherche du récepteurs NK-3 sur d'autres segments du tractus gastro-intestinal (duodénum, côlon, iléon et caecum) ou sur d'autres tissus tels la veine porte et le vas déferens de la souris n'ont pas donné de résultats positifs.

3-2.3 Etude des récepteurs des neurokinines sur la vessie de souris par les deux critères de Schild

3-2.3a Ordre de puissance des agonistes des récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3

La SP et les agonistes sélectifs du récepteur NK-1 (tableau VIII), ainsi que le NKB (agoniste naturel du récepteur NK-3) (tableau XII) et ses analogues, que nous avons étudiés, sont tous inactifs sur la vessie de souris. Ces résultats montrent que la vessie ne possède pas de sites fonctionnels NK-1 et NK-3. Par contre, le NKA, le [β -Ala⁸]NKA (4-10) et le NP γ , des agonistes du récepteur NK-2, ont été trouvés actifs sur cette préparation (tableau X). Les valeurs de pD_2 varient de 6.2 à 7.2; le composé

le plus actif étant le NP γ (pD₂ 7.2). L'ordre de puissance des agonistes, établi sur le récepteur NK-2 de la vessie de souris, est:

NP γ > NKA > β -Ala⁸]NKA (4-10) >>> [Nle¹⁰]NKA (4-10), Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(0₂)¹¹]SP (6-11), [MePhe⁷]NKB.

Cet ordre est différent de celui établi sur l'estomac, de plus, contrairement à l'estomac, le composé [Nle¹⁰]NKA (4-10) est complètement inactif. Cela suggère-t-il l'existence d'un sous-type de récepteur NK-2 ? Nous répondrons à cette question après l'analyse de résultats obtenus avec les antagonistes.

3-2.3b Affinité apparente des antagonistes des récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3

Les antagonistes des récepteurs NK-1 et NK-3 sont tous inactifs sur la vessie de souris (tableau IX et tableau XIII). Cela confirme donc l'absence des récepteurs NK-1 et NK-3 sur cette préparation en accord avec les résultats obtenus avec les agonistes. Par contre, les résultats obtenus avec les trois antagonistes du récepteur NK-2 que nous avons essayé (tableau XI), confirment la présence des sites NK-2 fonctionnels sur la vessie. Les valeurs de pA₂ trouvés sont très élevées (8.5 et 9.2 pour les composés SR 48968 et MEN 10627 respectivement), tandis que le composé R 396 montre une faible affinité pour le récepteur NK-2. L'ordre de puissance des antagonistes sur le récepteur NK-2 de la vessie de souris est donc:

MEN 10627 > SR 48968 > R396

Cet ordre est identique à celui établi sur l'estomac. Ce résultat répond négativement à la question d'une présence éventuelle de sous-types différents du récepteur NK-2 sur la vessie et sur l'estomac de souris.

4 - DISCUSSION

L'importance de l'utilisation des inhibiteurs de peptidases dans la caractérisation des récepteurs peptidergiques a déjà été mentionnée à la section "protocoles expérimentaux". En effet, avant de pouvoir amorcer une étude sur la caractérisation des récepteurs des kinines sur les tissus de souris, il est important de développer des conditions expérimentales qui limiteront le métabolisme causé par une ou plusieurs peptidases pouvant être présentes sur le tissu étudié. Dans la présente étude, l'influence des enzymes protéolytiques tissulaires telles que la carboxypeptidase M (EC 3.4.17.3) et l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (EC 3.4.15.1) sur les activités biologiques des kinines et leurs analogues, a été évaluée de façon semi-quantitative, en mesurant ces mêmes activités en absence et en présence d'inhibiteurs sélectifs de ces deux peptidases, respectivement le mergetpa et le captopril. Nos résultats montrent une potentialisation significative des effets biologiques des kinines en présence du captopril sur l'estomac et la vessie de souris. Ces données indiquent la présence d'une inactivation active des kinines sur ces tissus par l'enzyme de conversion de l'angiotensine II aussi appelée kininase II. Il est généralement admis que les enzymes protéolytiques se trouvent près des récepteurs (Kenny et Maroux, 1984) et que les peptides auraient pour ces enzymes des affinités semblables à celles qu'ils ont pour leurs récepteurs. Ainsi, ces enzymes seraient capables de transformer les peptides en métabolites actifs ou inactifs. Selon cette explication, la BK serait donc convertie par les kininases II présentes sur les tissus de souris en fragments inactifs (BK (1-5), BK(6-9), BK(1-7) et BK(8-9)) (Dorer *et al.*, 1974) et la desArg⁹BK serait dégradée en DBK(1-5) et DBK(6-8) (Inokuchi & Nagamatsu, 1981; Erdos & Skidgel, 1986) inactives. Une inhibition de l'activité enzymatique des kininases II aurait donc

pour conséquence une augmentation de l'activité biologique des kinines, puisque les peptides ne sont plus inactivés et leur concentration dans le compartiment récepteur serait maintenue plus élevée que dans le tissu témoin n'ayant pas été traité avec le captopril. L'absence d'effet du mergetpa sur les réponses myotropes des kinines sur les tissus de souris normales, de même que l'absence totale d'effet de BK sur le récepteur B_1 , en présence de captopril, suggère l'absence de carboxypeptidases M actives dans les tissus de souris normales. Des résultats plus récents (Nsa Allogho *et al.* 1998) indiquent qu'une activité faible de type carboxypeptidase M est présente dans l'estomac de souris normales et celui de souris ne possédant pas (Knock out) les récepteurs de type B_2 . Suite à ces observations, nous suggérons que les affinités apparentes d'agonistes (pD_2) et d'antagonistes (pA_2) des récepteurs des kinines, ainsi que tous les essais sur les kinines sur les tissus isolés de souris, soient faits en présence d'inhibiteurs de peptidases; l'utilisation du captopril (ou un de ses congénères), nous semble absolument nécessaire et l'addition de mergetpa est recommandée pour des composés pouvant être transformés en agonistes du récepteur B_1 .

Nos résultats montrent que l'effet maximal (E_{max}) de la BK en présence de captopril est augmenté. Cette potentialisation se manifeste uniquement sur la vessie et elle est absente sur l'estomac de souris. À quoi peut être due une telle différence? Nous considérons diverses hypothèses: d'abord, il est possible que le métabolisme de la BK sur la vessie soit très élevé et que la forte activité de la kininase II empêche l'occupation de 100% des récepteurs par l'agoniste, ce qui ne serait pas le cas dans l'estomac. En faveur de notre interprétation, nous mentionnons que les valeurs de la réponse maximale de la vessie sont augmentées significativement par le captopril, alors que celles de l'estomac ne le sont pas. Une autre différence entre la vessie et

l'estomac est représentée par l'effet résiduel des antagonistes du récepteur B₂. On note que les antagonistes de première génération c'est-à-dire le DArg[Hyp³, DPhe⁷, Leu⁸]BK et le DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK maintiennent des effets agonistes très marqués sur l'estomac (0.52 et 0.57 respectivement) et des effets moins évidents sur la vessie (0.18 et 0.12 respectivement). Ces effets dérivent vraisemblablement d'une activité intrinsèque résiduelle de ces composés peptidiques métabolisables. Ces effets sont dus à l'activation du récepteur B₂ car ils sont bloqués par le HOE 140, un antagoniste sélectif du récepteur B₂. La différence des effets agonistes résiduels produits par les antagonistes B₂ de première génération plus forts sur l'estomac que sur la vessie pourrait aussi être attribuée au mécanisme d'action des kinines sur les deux tissus (voire ci-dessous).

La contribution relative d'agents endogènes tels que l'acétylcholine (ACh), les prostaglandines (PGs) et l'histamine (Hist) sur les réponses contractiles des kinines, a été exclue par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs M de l'ACh, H₁ de l'histamine et par le traitement des tissus avec l'indométhacine qui bloque la synthèse des PGs. Nos résultats suggèrent que l'action de la BK et de la desArg⁹BK seraient dues à une action directe sur le muscle lisse de l'estomac puisque l'antagonisme des récepteurs cholinergiques par l'atropine, histaminergiques par la diphenhydramine (ou la cimétidine) et l'inhibition de la cyclooxygénase par l'indométhacine, n'amène aucune modification dans les réponses contractiles des kinines sur ce tissu. Par contre, sur la vessie, l'inhibition de la synthèse des prostaglandines par l'indométhacine, diminue fortement et significativement ($p < 0.05$) les effets de la BK. Ce qui suggère que la libération des prostaglandines est une composante importante du mécanisme d'action de la BK sur la vessie de souris. Dans ce sens, il a été démontré par plusieurs études

que la BK active la PLA₂, permettant à l'acide arachidonique d'être transformé en eicosanoïdes biologiquement actifs. Ces derniers varient selon le type cellulaire étudié; on trouve principalement les prostaglandines E₂ et I₂ mais aussi les leucotriènes et le PAF (platelet activating factor) (Burch, R.M. et al, 1995).

Les études préparatoires, discutées dans la page précédente, nous ont permis de préciser que a) les kinines sont exposées à un métabolisme enzymatique important et b) qu'elles exercent un effet direct sur l'estomac de souris. La caractérisation des récepteurs des kinines a été poursuivie premièrement sur l'estomac (effet direct) traité avec le captopril (10⁻⁶ M) pour éviter le métabolisme et sur la vessie n'ayant subi aucun traitement, en utilisant plusieurs agonistes et des antagonistes. Les récepteurs B₁ et B₂ de l'estomac (système birécepteuriel) et le récepteur B₂ de la vessie (système monorécepteuriel) ont été caractérisés et classifiés avec les deux critères recommandés par Schild (1973) à savoir, l'ordre de puissance des agonistes et les affinités apparentes des antagonistes.

4-1 Caractérisation et classification du récepteur B₂ de la souris

Le récepteur B₂ de la souris (estomac) présente une affinité (pD₂) pour la BK qui est de 8.64. Comparée aux affinités retrouvées sur d'autres récepteurs B₂ (ex: 8.6 et 8.5 chez l'homme et le lapin respectivement), celle de la souris est comprise dans la même intervalle de valeurs (Regoli *et al.*, 1988; Gobeil, 1996a; Hess, 1992; Bacharov, 1995).

Pour établir l'ordre de puissance des agonistes, nous avons utilisé une série de peptides apparentés à la BK et le résultat est indiqué ci-dessous:

BK = LysBK ≥ [Hyp³]BK > [Aib⁷]BK >>> desArg⁹BK, LysdesArg⁹BK.

Cet ordre correspond à celui d'un récepteur de type B₂ des kinines, étant donné que la BK et la LysBK sont actives et la desArg⁹BK et la LysdesArg⁹BK sont inactives (Regoli et Barabé, 1980). D'ailleurs, cet ordre est similaire à celui établi grâce aux études de liaison sur le récepteur B₂ cloné de souris (Hess, 1993).

L'utilisation de [Hyp³]BK et [Aib⁷]BK nous a permis de classer le récepteur B₂ de la souris dans le sous-type B_{2A} (Regoli et Gobeil, 1995) car [Hyp³]BK est plus actif que [Aib⁷]BK par 0.5 unité log. De ce fait, le récepteur B₂ de la souris est semblable à celui du lapin et de l'homme, et par contre, il est différent de celui de cobaye, ce qui est en accord avec les résultats de Regoli *et al.* (1994).

L'utilisation d'antagonistes nous a conduit d'une part à définir le profil pharmacologique du récepteur B₂ de la souris et à identifier les différences entre les espèces. Les composés peptidiques de première génération, à savoir DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK et DArg[Hyp³, DPhe⁷, Leu⁸]BK (Stewart et Vavrek 1991, Regoli *et al.*, 1990), ne peuvent être recommandés pour les tissus de souris, à cause des fortes activités agonistes résiduelles qui les caractérisent. Pour la première fois, il a été démontré que ces composés agissent comme des agonistes partiels sur les récepteurs B₂ des tissus de souris, étant donné qu'à faibles concentrations, ils bloquent partiellement les récepteurs, tandis qu'à fortes concentrations, ils deviennent des agonistes assez puissants ($\alpha^E \geq 0.5$). L'utilisation de tels composés doit être évitée car leurs effets agonistes et antagonistes montrent de larges variations entre les organes et les espèces. Ceci est effectivement le cas dans la présente étude (voire les valeurs de α^F obtenues sur l'estomac et la vessie).

Le composé peptidique représentant la deuxième génération des antagonistes des récepteurs B₂, le HOE 140 (Hock *et al.*, 1992) est pratiquement dépourvu

d'activité agoniste résiduelle et maintient de fortes affinités pour le récepteur B₂ de la souris. Ces caractéristiques pharmacologiques font du HOE 140 un composé de choix pour la caractérisation et la classification du récepteur B₂ des kinines. Mais le HOE 140 possède certaines limitations; en effet, ce composé a une longue durée d'action et exerce un antagonisme de type non-compétitif. Nous suggérons donc, de l'utiliser à de faibles concentrations, pour lesquelles, un tel composé se comporte comme un antagoniste compétitif. À de très fortes concentrations (> 7.5 µM), le HOE 140 agit comme un antagoniste non compétitif ("non équilibre") et perd sa sélectivité pour le récepteur B₂ car il interagit aussi avec le récepteur B₁. D'où l'utilité du nouvel antagoniste non peptidique, le FR 173657 (Inamura *et al*, 1996), qui agit comme un antagoniste pur sur les récepteurs B₂ et, il est très sélectif pour ce type de récepteur même à des fortes doses (> 7.5 µM). Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Rizzi *et al*. (1997) sur les tissus humains, du lapin et du cochon. Mais tout comme le HOE 140, ce composé exerce un antagonisme de nature non-compétitive, qui est dû probablement à sa longue durée d'action. Les précautions suggérées pour l'utilisation de FR-173657 sont donc les mêmes que pour le HOE 140, à savoir, l'emploi de faibles doses et temps d'incubation prolongé. Le WIN 64338 (Sawutz *et al*, 1994), le deuxième antagoniste non peptidique caractérisé dans cette étude, est peu actif et n'est pas sélectif pour les récepteurs B₂. WIN 64338 n'est pas spécifique pour la BK, puisqu'à fortes concentrations, il antagonise l'effet de l'acétylcholine et de l'angiotensine II sur les tissus de souris (Nsa Allogho, résultats non présentés) et d'autres espèces (Regoli *et al*, 1995).

Le WIN 64338 a été utilisé par Regoli *et al*. (1994) pour valider l'hypothèse de l'existence de deux sous-types du récepteur B₂, liés à l'espèce animale. WIN-

64338 est presque inactif chez le lapin, tandis qu'il montre une assez bonne puissance ($pA_2 > 7.0$) chez le cobaye (Regoli *et al.* 1994). Dans la présente étude, nous nous sommes servi de ce critère pour classer le sous-type auquel appartient le récepteur B₂ de la souris. Les résultats obtenus confirment que le récepteur B₂ de la souris est similaire à celui du lapin (insensibilité au WIN 64338) et donc appartient au sous-type B_{2rb} (originellement nommé B_{2A}); et il est aussi différent de celui du cobaye (B_{2gp} ou B_{2B}) qui est caractérisé par une bonne affinité pour le WIN 64338 (Regoli *et al.*, 1994; Gobeil et Regoli, 1995).

4-2 Caractérisation et classification du récepteur B₁ de la souris

L'estomac de souris nous a servi aussi pour caractériser le récepteur B₁. Tout d'abord, nous avons observé une augmentation progressive (50% par rapport au contrôle) *in vitro* de la réponse de l'estomac à la desArg⁹BK durant les 3 à 4 premières heures d'incubation suggérant la formation *de novo* des récepteurs B₁ *in vitro*, similaire à ce qui fut observé chez le lapin (Regoli *et al.*, 1978) et plus récemment chez l'homme (Gobeil *et al.*, 1996a). Cette synthèse *de novo* des récepteurs B₁ serait induite par une libération d'interleukines, provoquée par le traumatisme que subirait le tissu lors de son isolement de l'animal et de l'incubation *in vitro* (Marceau, 1995). La formation *de novo* du récepteur des kinines serait spécifiques aux récepteurs B₁ puisque les récepteurs B₂ ne sont pas induits. L'induction des récepteurs B₁ est vraisemblablement due à une nouvelle synthèse protéique car elle est abolie par des inhibiteurs de la transcription et de la traduction chez le lapin (Regoli et Barabé, 1980; Burch *et al.*, 1995).

Les agonistes LysdesArg⁹BK, desArg⁹BK et Sar[DPhe⁸]desArg⁹BK activent le récepteur B₁ de souris avec la même puissance (pD₂ 7.70; 7.65; 7.78 respectivement). Comparé à celui de l'homme et du lapin, le récepteur B₁ de la souris montre une affinité plus faible (pD₂ de la LysdesArg⁹BK est de 8.7; 8.6; 7.70 sur le récepteur B₁ de l'homme, du lapin et de la souris, respectivement) (Gobeil *et al.*, 1996a; Rhaleb *et al.*, 1990). Cette différence a été, par ailleurs, confirmée par Hess *et al.* (1996) pendant le congrès "Peptide Receptors" à Montréal (Août 1996). Une autre différence importante est représentée par l'activité de la desArg⁹BK qui est beaucoup plus active (par une unité log) chez la souris (pD₂ 7.7) que chez l'homme ou le lapin (pD₂ 6.8; 6.7 respectivement) (Gobeil *et al.*, 1996a; Rhaleb *et al.*, 1990). Ceci est en accord avec les résultats obtenus sur les récepteurs B₁ clonés par Menke *et al.* (1994). Les différences qui caractérisent les gènes codant pour les récepteurs B₁ de souris et ceux codant pour le récepteur B₁ de lapin et de l'homme se trouvent au niveau de la première boucle intracellulaire (insertion de 8 acides aminés de plus chez la souris) et de la séquence C-terminal (absence de la séquence allant de 334 à 352 acides aminés chez la souris) et conduisent à une protéine plus courte chez la souris (Pesquero *et al.*, 1996). Ces différences peuvent expliquer les profils pharmacologiques distincts observés entre le récepteur B₁ de souris et ceux du lapin et de l'homme et la durée de la réponse contractile analysée dans la présente étude. Malgré les différences discutées ci-dessus, l'ordre de puissance des agonistes mesuré sur le récepteur B₁ de la souris est typique d'un récepteur B₁ car la LysdesArg⁹BK et la desArg⁹BK sont actifs, tandis que la BK et la LysBK sont inactifs. Cet ordre est similaire à celui reporté pour le récepteur B₁ cloné du lapin (MacNeil, 1995), de l'homme (Menke, 1994) et de la

souris (Pesquero, 1996) et il est identique à celui observé pour le récepteur B₁ dans les cellules IMR-90 (Goldstein and Wall, 1984)

Comme pour le récepteur B₂, les antagonistes peptidiques du récepteur B₁, tels la [Leu⁸]desArg⁹BK, la Lys[Leu⁸]desArg⁹BK, la DArg[Hyp³, Thi⁵, DTic⁷, Oic⁸]desArg⁹BK et la DArg[Hyp³, DPhe⁷]desArg⁹BK (Regoli *et al.*, 1977; Regoli et Barabé, 1980; Vavrek et Stewart, 1985; Hock *et al.*, 1991), ne peuvent être recommandés pour les tissus de souris, à cause des fortes activités agonistes résiduelles qui les caractérisent. Pour la première fois, il a été démontré que ces composés agissent comme des agonistes partiels sur les récepteurs B₁ des tissus de souris, étant donné qu'à faibles concentrations, ils bloquent partiellement les récepteurs, tandis qu'à fortes concentrations, ils deviennent des agonistes assez puissants ($\alpha^E \geq 0.5$) dont les effets sont bloqués par un antagoniste du récepteur B₁, le R715. Des auteurs tel Van der Ploeg *et al* (1996) ont confirmé ces faits grâce à une méthode fonctionnelle permettant de mesurer la mobilisation du calcium provoquée par l'activation du récepteur B₁ de l'homme et de souris: d'autres auteurs, tels Meini *et al* (1996) ont montré que ces mêmes antagonistes se comportent comme de purs agonistes sur le récepteur B₁ de rat. Il a donc fallu chercher un composé dépourvu d'activité agoniste: Ce composé, le R-715 a été découvert récemment dans une étude de structure-activité des antagonistes du récepteur B₁ (Gobeil *et al.*, 1996b, Gobeil *et al.*, 1996c), et nous a permis d'appliquer le deuxième critère de Schild au récepteur B₁ de la souris. D'après notre étude, le R-715 est un antagoniste compétitif et sélectif pour le récepteur B₁ car il est inactif sur le récepteur B₂ même à fortes concentrations; de plus, il est spécifique au récepteur B₁, parce qu'il n'affecte pas les récepteurs AT₁ de l'angiotensine II, NK-1 de la substance P et muscariniques de l'acétylcholine. Le R-

715 (0.4 μM) a également été trouvé inefficace pour contrer les effets myotropes de l'angiotensine II, la noradrénaline et de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ sur l'aorte de lapin, confirmant ainsi la spécificité de ce composé pour le récepteur B_1 (Gobeil. *et al.*, 1996c). Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Gobeil *et al.* (1996b) sur le récepteur B_2 du lapin (veine jugulaire) et du cobaye (iléon): R 715 est inactif dans ces systèmes. L'utilisation de ce nouvel antagoniste est recommandée pour toute étude sur le récepteur B_1 de la souris puisque R 715 ne présente pas d'effet agoniste; d'ailleurs, ceci est aussi vrai pour le récepteur B_1 de l'homme et du lapin

La présente étude nous a donc permis de caractériser les récepteurs B_1 et B_2 de la souris et de les comparer à ceux d'autres espèces.

Les récepteurs B_1 et B_2 des kinines sont des entités biologiques qui diffèrent non seulement par leur profil pharmacologique (Regoli et Barabé, 1980), par la séquence génétique et protéique (Hess *et al.*, 1992) mais aussi par leur mécanismes d'action. En fait, un des résultats originaux de cette étude, est la différence entre la contraction induite par la BK et celle provoquée par la desArg^9BK sur l'estomac de souris. La première (B_2) est rapide et réversible et la deuxième (B_1) est lente et prolongée. Cette différence pourrait être le résultat du type d'interaction agoniste-récepteur ou du deuxième messenger utilisé par les deux agonistes ou encore des phénomènes qui font suite à l'activation du récepteur par l'agoniste (internalisation, désensibilisation). La contraction prolongée induit par la desArg^9BK pourrait s'expliquer par l'occupation prolongée du récepteur par l'agoniste. D'autre part, la différence observée dans la mobilisation du calcium intracellulaire provoquée par la BK et la desArg^9BK sur plusieurs systèmes cellulaires isolés (Bascand *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1995) des muscles lisses vasculaires mises en culture (Mathis *et al.*,

1996), pourrait fournir une autre explication de nos observations. D'après ces travaux, l'activation du récepteur B₂ par la BK mobiliserait préférentiellement le calcium à partir des réserves intracellulaires (réticulum endoplasmique); alors que l'activation du récepteur B₁ par la desArg⁹BK serait associée à un influx de calcium extracellulaire (par l'ouverture des canaux calciques) qui se poursuivrait pendant toute la durée de l'occupation du récepteur par l'agoniste. D'autres auteurs (Lévesque *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1995) qui se sont plus intéressés au mode d'action du récepteur B₁, ont montré que l'influx calcique induit par l'activation de ce type de récepteur pouvait être inhibé par le chlorure de nickel, tandis qu'il n'est pas influencé par les antagonistes des canaux calciques de type L telle la nifédipine. Ces travaux ont été réalisés respectivement sur les cellules endothéliales provenant d'artères pulmonaires de boeuf et sur des cellules musculaires lisses de l'aorte isolé de lapin. Des études récentes ont montrées que l'activation du récepteur B₂ est suivie d'internalisation (Girolami et Bascand, 1996) et de désensibilisation (Weintraub *et al.*, 1992), tandis que celle du récepteur B₁ ne l'est pas (Austin *et al.* 1996). La raison de cette différence serait dans la composition (séquence) des deux récepteurs: le récepteur B₂ possède une boucle (numéro 4) C-terminale intracellulaire beaucoup plus longue que celle du récepteur B₁. Ce serait au niveau de cette boucle que sont localisés les résidus Ser (Thr) et Tyr, responsables des phosphorylations qui favorisent l'internalisation du récepteur. Le récepteur B₁ n'étant pas internalisé, ni désensibilisé, peut continuer à agir pendant toute la durée de son occupation par l'agoniste. Ceci pourrait expliquer la durée prolongée de l'effet myotrope et le manque de désensibilisation que nous observons sur l'estomac. Beaucoup de travail reste à faire pour répondre aux diverses questions que nous avons soulevées.

La recherche des récepteurs des neurokinines a été pratiquée sur quelques tissus isolés de souris à savoir l'iléon, le caecum, le côlon, la veine cave, l'estomac et la vessie dans le but d'identifier des préparations tissulaires monoréceptoriels ou multiréceptoriels chez la souris. Comme pour les kinines, seuls l'estomac et la vessie répondent à ces peptides par des contractions. Les réponses de l'estomac sont principalement médiées par les récepteurs de type NK-1 et NK-2 des neurokinines, tandis que celles induites sur la vessie dépendent uniquement de l'activation des récepteurs de type NK-2 : ceci a été démontré par l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes.

4-3 Caractérisation et classification des récepteurs NK-1 et NK-2 de la souris

L'utilisation des agonistes naturels ou (et) sélectifs ainsi que celle des antagonistes peptidiques ou (et) non peptidiques, a permis d'arriver à une caractérisation *in vitro* des récepteurs des neurokinines sur des préparations de tissus de souris. En considérant la co-présence des récepteurs NK-1 et NK-2 sur l'estomac et la non sélectivité des agonistes naturels (SP, NKA et NKB) révélée chez d'autres espèces (Regoli *et al.*, 1994), nous avons estimé l'utilisation d'antagonistes et d'agonistes sélectifs particulièrement pertinente pour la présente étude: En effet, cela a permis d'étudier sélectivement les récepteurs NK-1 en bloquant complètement les récepteurs NK-2 avec le SR 48968, un antagoniste sélectif des récepteurs NK-2, et inversement, nous avons pu étudier de façon sélective les récepteurs NK-2 après avoir bloqué les récepteurs NK-1 avec le SR 140333, un puissant antagoniste sélectif des récepteurs NK-1. Les résultats obtenus dans les deux cas montrent que les agents

peptidiques (SP, NKA, [β -Ala⁸]NKA (4-10) et Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(0₂)¹¹]SP (6-11)) utilisés dans notre étude, possèdent une sélectivité apparente par rapport à leurs récepteurs respectifs, ceci particulièrement chez la souris (comparé à d'autres espèces, tels le cobaye (Regoli *et al.*, 1994). Un exemple est donné par la détermination du pD₂ de NKA obtenu en absence et en présence de SR 140333: l'affinité apparente (pD₂) ainsi que l'activité maximale de NKA sur l'estomac ne sont pas modifiées en présence de SR 140333, ce qui suggère que NKA est un agoniste assez sélectif du récepteur NK-2 de la souris. Cependant, cette interprétation doit être confirmée par les résultats obtenus avec les antagonistes.

Suite à l'analyse des différentes affinités obtenues avec les agonistes des récepteurs NK-1, nos résultats montrent que les récepteurs NK-1 de souris sont plus sensibles (de 0.7 à 1 unité logarithmique) à l'agoniste sélectif Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(0₂)¹¹]SP (6-11) qu'aux autres agonistes du récepteur NK-1. On peut noter ici que l'acétylation du composé [Sar⁹, Met(0₂)¹¹]SP (6-11) (pD₂ 7.25) menant au produit Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(0₂)¹¹]SP (6-11) (pD₂ 8.13) a pour effet d'augmenter l'affinité de ce produit pour les récepteurs NK-1 de souris. Ce changement d'affinité peut s'expliquer par deux raisons: D'une part, la modification chimique peut procurer une conformation plus adéquate au peptide, lui permettant de mieux stimuler les récepteurs. D'autre part, elle peut aussi protéger le peptide du métabolisme enzymatique; ainsi, la concentration du composé dans le compartiment récepteuriel serait plus élevée, ce qui aurait pour résultat une stimulation plus importante (ou plus prolongée) des récepteurs. Par ailleurs, une étude réalisée *in vivo* favorise la deuxième hypothèse en démontrant la longue durée d'action du composé Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(0₂)¹¹]SP (6-11) chez le rat et le cobaye (Rouissi *et al.*, 1993).

La caractérisation des récepteurs NK-2 de souris par les agonistes montre que l'agoniste naturel NKA est le plus actif sur l'estomac tandis que c'est le neuropeptide γ l'est sur la vessie. Cette différence dans l'ordre de puissance des agonistes des récepteurs NK-2 de l'estomac et de la vessie, semble suggérer la présence d'une hétérogénéité des sites NK-2 sur la vessie et l'estomac. Néanmoins, cette éventualité sera revue dans la section discutant des résultats obtenus avec les antagonistes. De plus, le [Nle¹⁰]NKA (4-10) (Drapeau *et al.*, 1987; Regoli *et al.*, 1988), un autre agoniste sélectif des récepteurs NK-2 présente un profil pharmacologique différent sur les deux tissus (pD₂ 6.40 sur l'estomac et inactif sur la vessie).

Les résultats obtenus avec les agonistes des récepteurs NK-3, notamment NKB, Senktide et [MePhe⁷]NKB indiquent la faible proportion ou l'inexistence de ce type de récepteurs sur l'estomac et la vessie de souris respectivement. Les réponses induites sur l'estomac par NKB, l'agoniste naturel des récepteurs NK-3 sont attribuées à l'activation des récepteurs NK-1 et NK-2. Cela est démontré par la baisse de pD₂ de NKB observée en présence des antagonistes SR 140333 (anti-NK-1) et SR 48968 (anti-NK-2) lors de cette étude. De plus, le fait que les agonistes sélectifs des récepteurs NK-3 soient totalement inactifs (Senktide) ou très faibles ([MePhe⁷]NKB sur l'estomac vient consolider notre hypothèse, à savoir que les récepteurs de type NK-3 sont très faiblement (ou pas du tout) représentés sur l'estomac de souris.

Malgré les recherches faites sur d'autres tissus, la présente étude ne nous a permis d'identifier aucune préparation tissulaire de souris riche en récepteurs NK-3. L'utilisation des agonistes n'a pas permis de faire une distinction du sous-type récepteuriel auquel appartient les récepteurs NK-1 et NK-2 des neurokinines.

La caractérisation des récepteurs de neurokinines chez la souris a été réalisée par la suite selon le deuxième critère de Schild (1947), en évaluant les affinités apparentes d'antagonistes en terme de pA_2 .

Sur les récepteurs de type NK-1, SR 140333 (Emonds-Alt *et al.*, 1993; Oury-Donat *et al.*, 1993) est le composé le plus actif, suivi du RP 67580 (Garret *et al.*, 1991). Ces deux antagonistes ont des valeurs de pA_2 de 2 à 2.5 unités logarithmiques plus élevées que deux autres antagonistes des récepteurs NK-1, le FK 888 (Fujii *et al.*, 1992) (pA_2 6.57) et le CP 99994 (Tattersall *et al.*, 1993) (pA_2 6.06). Cet ordre de puissance des antagonistes des récepteurs NK-1 sur l'estomac rappelle celui du rat et suggère donc que les récepteurs NK-1 de souris sont similaires de ceux du rat (Regoli *et al.*, 1994) et de l'homme (Gerard *et al.*, 1993) et par contre différents de ceux du cobaye et du lapin (Regoli *et al.*, 1994b). D'après les résultats obtenus avec les antagonistes, les récepteurs NK-1 de souris appartiennent donc aux sous-type NK-1r ou NK-1A. Dans la présente étude, les résultats obtenus avec les antagonistes des récepteurs NK-2 indiquent que les composés SR 48968 (Emonds-Alt *et al.*, 1993) et MEN 10627 (Maggi *et al.*, 1994) sont très puissants ($pA_2 > 8.5$) sur l'estomac et la vessie de souris; et en plus, leur affinités respectives sont de 2 à 3 unités logarithmiques plus élevées que celle de R 396 (Dion *et al.*, 1990). La faible affinité de R 396 sur les tissus de souris suggère que les récepteurs NK-2 de souris ont un profil pharmacologique identique à celui des récepteurs NK-2 du lapin et différent de ceux de hamster (Maggi *et al.*, 1990). Ainsi, selon la classification de Maggi (1990), les récepteurs NK-2 de souris appartiennent au sous-type NK-2rb ou NK-2B. L'ordre de puissance des antagonistes des récepteurs NK-2 est identique sur les tissus d'estomac et de vessie. Par conséquent, selon Schild (1947), nous pouvons exclure

une hétérogénéité des récepteurs NK-2 (dont nous avons parlé plus haut) sur les deux tissus analysés dans notre étude. Un fait important que nous voulons ici souligner est l'augmentation des valeurs de pA_2 des antagonistes (spécialement sur l'estomac) lorsque ces derniers sont testés contre l'agoniste sélectif (Ac[Arg⁶, Sar⁹, Met(O₂)¹¹]SP (6-11) pour les récepteurs NK-1 ou [β -Ala⁸]NKA (4-10) pour les récepteurs NK-2). Nous expliquons cela par le fait que la présence des deux sites fonctionnels (NK-1 et NK-2) sur l'estomac peut interférer avec l'évaluation correcte des affinités des antagonistes (surtout si ceux-ci sont sélectifs) sur un système multirécepteuriel (comme l'estomac) lorsque l'on utilise des neurokinines non sélectives (SP, NKA). Dans ces cas, l'utilisation des agonistes sélectifs, qui vont préférentiellement activer leur récepteur respectif, est conseillée pour une meilleure évaluation des affinités apparentes des antagonistes. Il nous est donc permis de rectifier notre interprétation sur la sélectivité de la NKA pour le récepteur NK-2: En fait, NKA n'est pas aussi sélective qu'elle paraît l'être.

L'utilisation des antagonistes (R-486 (Drapeau *et al.*, 1990) et SR 142801 (Emons-Alt *et al.*, 1994) des récepteurs NK-3 des neurokinines confirment la quasi-inexistence de ce type de récepteurs sur les tissus de souris étudiés lors de ce travail.

5- CONCLUSION

Comme énoncé dans l'introduction, l'élaboration de tests pharmacologiques chez la souris est devenue une priorité. Le nombre important de données obtenues *in vivo* sur le rôle des kinines et des neurokinines dans le domaine de l'analgésie et des maladies inflammatoires, de même que le peu d'études publiées sur les kinines et les neurokinines chez la souris *in vitro* et surtout l'introduction d'une nouvelle souche de souris dépourvues de récepteurs de type B₂ des kinines, ont alimenté notre motivation; nous avons donc jugé pertinent de procéder à une exploration systématique des tissus répondant aux kinines et neurokinines, pour, par la suite, procéder à une caractérisation pharmacologique des récepteurs des kinines et neurokinines chez cet animal. De ce fait, l'estomac et la vessie urinaire, de par leur contractions stables, constituent les deux tissus de choix. L'estomac est un système multirécepteuriel. On y trouve les deux types de récepteurs des kinines, B₁ et B₂ ainsi que les récepteurs NK-1 et NK-2 des neurokinines. L'utilisation d'antagonistes et d'agonistes sélectifs disponibles dans notre laboratoires a permis d'étudier les récepteurs séparément. La vessie, système monorécepteuriel, ne contient que les récepteurs B₂ (pas de B₁) des kinines et le récepteur NK-2 (pas de NK-1 ni de NK-3) des neurokinines. La caractérisation des récepteurs chez la souris s'est faite selon les deux critères de Schild, en mesurant l'ordre de puissance des agonistes et en évaluant indirectement l'affinité apparente des antagonistes. Les résultats ainsi obtenus permettent d'identifier le sous-type récepteuriel auquel appartient le récepteur étudié de la souris. La caractérisation avec les agonistes ne nous a pas permis de préciser à quel sous-type de récepteur appartient le NK-1 et NK-2 de la souris, par contre, cela a été possible pour les récepteurs B₁ et B₂ des kinines. Il a été montré que le

récepteur B₂ des kinines appartient au sous-type B_{2A} (sensible au composé [Hyp³]BK, comme le récepteur B₂ de lapin), tandis que le récepteur B₁ est différent de ceux du lapin et de l'homme. Par contre, la caractérisation avec les antagonistes a fourni beaucoup plus d'informations: d'abord, il a été démontré que les antagonistes de première génération des récepteurs B₁ et B₂ des kinines (tels le DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK et le Lys[Leu⁸]desArg⁹BK) utilisables comme antagonistes purs chez d'autres espèces, se comportent chez la souris comme des agonistes partiels et sont donc des outils inadéquats pour la caractérisation des récepteurs des kinines cette espèce. La disponibilité du HOE 140 (pA₂ 8.5) et les récentes découvertes de FR 173657 (pA₂ 8.5) (le premier antagoniste non peptidique du récepteur B₂) et R-715 (pA₂ 7.00) (antagoniste du récepteur B₁) ont permis de faire une caractérisation pharmacologique précise des récepteurs B₂ et B₁ des kinines, caractérisation qui a été décrite et discutée.

Pour ce qui est des antagonistes des récepteurs des neurokinines, nos résultats suggèrent que le récepteur le NK-1 serait du même sous-type que celui du rat, et que le NK-2 ressemblerait beaucoup à celui du lapin.

Les résultats des kinines (ordre de puissance des agonistes et l'affinité apparente des antagonistes) présentés dans ce mémoire sont pour la plupart en accord avec les données déjà parues (B₂ et B₁ de souris clonés par Hess *et al.*, 1993, et Menke *et al.*, 1994 respectivement), à l'exception du composé DArg[Hyp³, DPhe⁷]BK qui est beaucoup moins actif dans notre étude (pA₂ 7.02) que dans celui de Hess *et al.* (1993) (pA₂ 8.68). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les études de liaison (bindings assays) telle celle réalisée par les chercheurs à Merck, ne permettent pas de

détecter les activités agonistes résiduelles de cet antagoniste, lesdites activités pouvant réduire l'affinité apparente de l'antagoniste dans l'essai biologique.

En conclusion, les résultats que nous avons décrits et discutés réaffirment l'utilité de l'approche de pharmacologie classique pour la détection d'agonistes partiels (parmi les antagonistes) et la recherche de composés plus adéquats pour la caractérisation des récepteurs

6- BIBLIOGRAPHIE

- ARIENS, E.J., SIMONS, A.M., VAN ROSSUM, J.M. (1964). Drug-receptor interaction: Interaction of one or more drugs with one receptor system. In: Molecular Pharmacology. Edited by E.J. Ariens. Vol. 1, Academic Press, New York, pp. 548-555.
- AUSTIN, C., FAUSSNER, A., ROBINSON, H., KYLE, D., CHAKTRAVARTY, S., BATHON, J., PROUD, D. (1996). Human kinin B₁ receptor: Ligand binding and fonctionnal characterization . Peptides Receptors. Montréal, p. 30.
- BACHAROV, D.R., ST-JACQUES, E., LARIVÉE, J.F., LÉVESQUE, L., RIOUX, F., DRAPEAU, G., MARCEAU, F. (1995). Cloning and pharmacological characterization of the rabbit bradykinin B₂ receptor. J. Pharmacol. Exp. Ther. **275**: 1623-1630.
- BASCAND, J.L., GIROLAMI, J.P. (1996). La bradykinine. Médecine sciences **12**: 582-92.
- BASCAND, J.L., PECHER, C., ROUAUD, S., EMOND, C., LEUNG-TACK, J., BASTIE, M.J, BURCH, R., REGOLI, D., GIROLAMI, J.P. (1993). Evidence for existence of two distinct bradykinin receptor on rat mesangial cells. Am J Physiol **264**: F548-56.
- BATHON, JM., MANNING, DC., GOLDMAN, DW., TOWNS, MC., and PROUD, D. (1992). Characterization of kinin receptors on human synovial cells and

upregulation of receptor number by interleukin-1. *J. Pharmac. Exp. Ther.* **260**: 384-392.

BHOOLA, K.D., FIGUEROA, C.D., WORTHY, K. (1992). Biol-regulation of kinins: Kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol Rev* **44**:1-80.

BONNER, T.L., AFFOLTER, H.U., YOUNG, A.C., et YOUNG III, W.S. (1987). A cDNA encoding the precursor of the rat neuropeptide, neuromedin B. *Mol. Brain Research.* **2**: 243-249.

BORKOWSKI, J.A., RANSOM, R.W., SEABROOK, G.R., TRUMBAUER, M., CHEN, H., HILL, R.G., STRADER, C.D., HESS, J.F. (1995). Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J Biol Chem* **270**: 13706-10.

BRISTOW, D.R., CURTIS, N.R., SUMAN-CHAUHAN, N., WATLING, K.J., et WILLIAMS, B.J.(1987). Effects of tachykinins on inositol phospholipid hydrolysis in slices of hamster urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.* **90**: 211-217.

BUCK, S.H., HELKE, C.J., BURCHER, E., SHULTS, C.W., et O'DONOHUE, T.L. (1986). Autoradiographic characterization and autoradiographic distribution of binding sites for iodinated tachykinins in the rat central nervous system. *Peptides.* **7**: 1109-1120.

BUCK, SH., BURCHER, E., SHULTS, C.W., LOVENBERG, W., et O'DONOHUE, T.L. (1984). Novel pharmacology of substance P K-binding sites: A third type of tachykinin receptor. *Science* **226**: 987-989.

- BURCH, R.M., KYLE, D.J., STORMAN, N. (1995). Molecular biology and pharmacology of bradykini receptors. In: Molecular biology intelligence unit. Austin: RG Landes Company, 107.
- BURCHER, E., et BUCK, SH. (1986). Multiple tachykinin binding sites in hamster, rat and guinea pig urinary. *Eur. J. Pharmacol.* **128**: 165-177.
- CAPECCHI, M.R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**: 1288-1292.
- CHRETIEN, M., SIKSTRÖM, R., LAZURE, C., MBIKAY, M., BENJANNET, S., MARCINKIEWICZ, M., et SEIDAH, N.G. (1989). Expression of the diversity of neural and hormonal peptides via the cleavage of precursor molecules. In *Peptides Hormones and prehormones*, ed. by J. Martinex, pp. 1-24, Ellis Horwood, london, U.K.
- CLEMENTS, J.A. (1989). The glandular kallikrein family of enzymes: tissue-specific expression and hormonal regulation. *Endocrine Rev* **10**: 393-419.
- COLLIER, H.O.J. (1964). Analgesics. In: *Evaluation of drug activities: Pharmacometrics*. Edited by D.R. Laurence and A.L. Bacharach. Academic Press, London, pp. 183-203.
- CORVOL, P., ALHENC-GELAS, F., SOUBRIER, F. (1993). L'endothélium, site de production et de métabolisme des peptides vasoactifs. *Médecine/sciences* **9**: 1050-61.

- CUELLO, A.C. (1987). Peptides as neuromodulators in primary sensory neurons. *Neuropharmacol.* **26**: 971-979.
- DAM, T.V., TAKEDA, Y., KRAUSE, J.E., ESCHER, E., et QUIRION, R. (1990b). γ -prepotachykinin-(72-92)-peptide Amide: an endogenous γ -prepotachykinin I gene derived peptide which preferentially binds to neurokinin-2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 246-250.
- DAM, T.V., ESCHER, E., et QUIRION, R. (19990a). Visualization of neurokinin-3 receptor sites in rat brain using highly selective ligand [3 H]senktide. *Brain Res.* **506**: 175-179.
- DEACON, C.F., AGOSTON, D.V., NAU, R., et CONLON, J.M. (1987). Conversion of neuropeptide K to neurokinin A and vesicular colocalization of neurokinin A and substance P in neurons of the guinea pig small intestine. *J. Neurochem.* **48**: 141-146.
- DEBLOIS, D., BOUTHILLIER, J., and MARCEAU, F. (1989). Pharmacological modulation of the up-regulation to desArg⁹-Bradykinin *in vitro* and *in vivo*. *Immunopharmacology.* **17**: 187-198.
- DEBLOIS, D., BOUTHILLIER, J., and MARCEAU, F. (1988). Effects of glucocorticoids, monokines and growth factors on the spontaneously developing responses of the rabbit isolated aorta to desArg⁹-Bradykinin. *Br. J. Pharmacol.* **92** 257-264.

- DINARELLO, C.A. (1988) Endogenous pyrogens. *Methods in Enzymology* **143**: 495-510.
- DION, S., NANTEL, F, JUKIC, D., TELEMAQUE, S., DRAPEAU, G., RHALEB, N.E., ROUISSI, N., TOUSIGNANT, C., REGOLI, D., NALINE, E., ADVENIER, C., ROVERO, P., et MAGGI, C.A. (1990). Structure activity study of neurokinins: antagonists for the neurokinin-2 receptor. *Pharmacology*. **41**: 184-194.
- DIXON, B.S., BRECKON, R., FORTUNE, J., SUTHERLAND, E., SIMON, R.F., ANDERSON, R.J. (1989). Bradykinin activates protein kinase C in cultured rat cortical collecting tubular cells. *Am J Physiol*: **257**: F808-17
- DRAPEAU, G. And REGOLI, D. (1988). Synthesis of bradykinin analogs. *Methods in Enzymol.* **163**: 263-272.
- DRAPEAU, G., D'ORLEANS-JUSTE, P., DION, S., ROUISSI, N., et REGOLI, D. (1987). Selective agonists for substance P and neurokinins. *Neuropeptides*. **10**: 43-45.
- DRAY, A., and PERKINS, M. (1993). Bradykinin and inflammatory pain. *Trends in Neurosciences*. **16** (3): 99-104.
- DORER, E.F., KANH, J.R., LENTZ, K.E., LEVINE, M et SKEGGS, L.T. (1974). Hydrolysis of bradykinin by ACE. *Circulation Research* . Vol **xxxw**: 824-827.

- D'ORLÉANS-JUSTE, P., DeNUCCI, G., and VANE, J.R. (1989). Kinins act on B₁ or B₂ receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmac.* **96**:920-926.
- D'ORLEANS-JUSTE, P., DION, S., DRAPEAU, G., REGOLI, D. (1986). Different receptors are involved in the endothelium-mediated relaxation and the smooth muscle contraction of the rabbit pulmonary artery in the response to substance P and related neurokinins. *Eur. J. Pharmacol.* **125**: 37-44.
- EMOND, C., BASCAND, J.L., PECHER, C., CABOS-BOULOT, G., PRADELLES, P., REGOLI, D., GIROLAMI, JP. (1990). Characterization of a B₂ bradykinin receptor in rat renal mesangial cells. *Eur J Pharmacol* **190**: 381-92.
- EMONDS-ALT, X., BICHON, D., DUCOUX, J.P., HEAULME, H., MILOUX, B., PONCELET, M., PROIETTO, V., VAN BROECK, D., VILAIN, P., NELIAT, G., SOUBRIE, P., LE FUR, G., BRELIERE, J.C. (1994): SR 142801, the first potent non peptide antagonist of the tachykinin NK-3 receptor. *Life Sci.* **56** :27-32.
- EMONDS-ALT, X., DOUTREMEPUICH, J.D., HEAULME, M., NELIAT, G., SANTUCCI, V., STEINBERG, R., VILAIN, P., BICHON, D., DUCOUX, J.P., PROIETTO, V., VAN BROECK, D., SOUBRIE, P., LE FUR, G., et BRELIERE, J.C. (1993): in vitro and in vivo biological activities of SR 140333, a novel non potent nonpeptide tachykinin NK-1 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **250**: 403-413.

- EMONDS-ALT, X., GOULAOUIC, P., NELIAT, G., ADVENIER, C., NALINE, E., VILAIN, P., PROIETTO, V., VAN BROECK, D., LE FUR, G., et BRELIERE, J.C. (1992): Apotent and selective non peptide antagonist of the neurokinin A (NK-2) receptor. *Life Sci.* **50**: PL101-PL106.
- ERDÖS, E.G., et SKIDGEL, R.A. (1986). The unusual substrate specificity and the distribution of human angiotensine I converting enzyme. *Hypertension* **8**: 34-37.
- FOSBRAEY, P., FEATHERSTONE, R.L., et MORTON, I.K.M. (1984). Comparaison of potency of substance P and related peptides on [³H]-acetylcholine release, and contractile actions in the guinea pig ileum. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **326**: 111-115.
- FUJI, T., MURAI, M., MORIMOTO, M., MAEDA, Y., YAMAOKA, M., HAGIWARA, D., MIYAKE, H., IKARI, N., et MATSUO, M. (1992). Pharmacological profile of a high affinity dipeptide NK-1 receptor antagonist, FK 888. *Br. J. Pharmacol.* **107**: 785-789.
- FURCHGOTT, R.F. (1981). The requirement for endothelail cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some others vasodilatators. *Trends Pharmacol. Sci.* **3**: 173-175.
- GABBIANI, G., BADONNEL, M.C., and MAINO, G. (1970). Intra-arterial injections of histamine, serotonin or bradykinin: A topographic study of vascular leakage. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **135**: 447-452.

- GARRET, C., CARRUETTE, A., FARDIN, V., MOUSSAOUI, S., PEYRONEL, J.F., BLANCHARD, J.C., et LADURON, P.M. (1991). Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:10208-10212.
- GAUTHIER, F., GUTMAN, N., MOREAU, T., ELMOUJAHED, A. (1988). Possible relationship between the restricted biological function of rat T-kininogen (thiostatin) and its behaviour as an acute phase reactant. *Hoppe-Seylers Z Biol Chem* **369**: 251-5.
- GERARD, P., BAO, L., PING, H. X., and GERARD, C. (1993). Molecular aspects of the tachykinin receptors. *Regul. Pept.* **43**: 21-35.
- GIULIANI, S., BARBANTI, G., TURINI, D., QUARTARA, L., ROVERO, P., GIACHETTI, A., et MAGGI, A. (1991). NK-2 tachykinin receptors and contraction of circular muscle of the human colon: characterization of the NK-2 receptor subtype. *Eur. J. Pharmacol.* **203**: 365-370.
- GOBEIL, F., PHENG, L.H., BADINI, I., NGUYEN-LE, X.K., PIZARD, A., RIZZI, A., BLOUIN, D. and REGOLI, D. (1996a). Receptors for kinins in human isolated umbilical vein. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 289-294.
- GOBEIL, F., NEUGEBAUER, W., FILTEAU, C., NSA ALLOGHO, S., JUKIC, D., De MAN, F., PHENG, L.H., BLOUIN, D. and REGOLI, D. (1996b). Structure-activity of B₁ receptor antagonists. *Hypertension.* **28**; 833-839.
- GOBEIL, F., DE MAN, F., FILTEAU, C., PHENG, L.H., REGOLI, D. (1996c). Pharmacological and biochemical description of a novel BK-B₁ receptor

- antagonist, the R-715. Abstract, 5th International Symposium on Resistance Arteries, Cambridge, UK. *J. Vascul. Res* 33 (suppl. 2): 30
- GOBEIL, F. and REGOLI, D. (1994). Characterization of kinin receptors by bioassays. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27: 1781-1791.
- GOBEIL, F. Différenciation des sous-types du récepteur B₂ de la bradykinine chez diverses espèces animales. Mémoire. Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec. Canada.
- GOLSTEIN, R.H., and WALL, M. (1984). Activation of protein formation and cell division by bradykinin and desArg⁹-Bradykinin. *J. Biol.Chem.* 259:9263-92687.
- GUARD, S., WATLING, K.J., et WATSON, S.P. (1989). NK₃ tachykinin receptors are linked to inositol phospholipid hydrolysis in the guinea pig ileum longitudinal muscle-myenteric plexus preparation. *Br. J. Pharmacol.* 94: 148-154.
- HALL, J.M. (1992). Bradykinin receptor: pharmacological proprieties and biological roles. *Pharmacol ther* 56: 131-90.
- HASAN, A.A.K., CINES, D.B., ZHANG, J., SCHMAIER, A.H. (1994). The carboxyl terminus of bradykinin and amino terminus of the light chain of kininogens comprise an endothelial cell binding domain. *J Biol Chem* 269: 31822-30.

- HENRY, J.L. Discussion of nomenclature for tachykinins and tachykinin receptor.
Dans: Substance P and neurokinins Montreal 1986. ed. HENRY, J.L.,
COUTURE, R., CUELLO, A.C., PELLETIER, G., QUIRION, R., REGOLI,
D. Eds. Springer-Verlag, New York, 1987.
- HENRY, J.L. (1982). Relation of substance P to pain transmission:
neurophysiological evidence. Dans substance P in the Nervous system: Ciba
Foundation Symposium 91. Pitman, London. p. 206-217.
- HESS, J.F., DERRICK, A.W., MACNEIL, T., BORKOWSKI, J.A. (1996). The
agonist selectivity of a mouse B1 bradykinin receptor differs from human and
rabbit B1 receptors. *Immunopharmacology*.**33**:1-8.
- HESS, J.F., BORKOWSKI, J.A., MACNEIL, T., STONESIFER, G.Y., FRAHER,
J., STRADER, C.D. and RANSOM, R.W. (1993). Differential pharmacology
of cloned human and mouse B₂ bradykinin receptors. *Mol. Pharmacol.* **45**: 1-
8.
- HESS, J.F., BORKOWSKI, J.A., YOUNG, G.S., STRADER, C.D., RANSOM,
R.W. (1992). Cloning and pharmacological characterization of human
bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **184**: 260-8.
- HOCK, F.J., WIRTH, K., ALBUS, U., et al., (1991). HOE 140, a new potent and
long acting bradykinin antagonist: in vitro studies . *Br. J. Pharmacol.* **102**:
785-787.

- INAMURA, N., ASANO, M., KAYAKIRI, H., HATORI, C., OKU, T., and HAKAHARA, K. 1996. Characterization of FR 173657, a novel non-peptide B₂ antagonist; *in vitro* and *in vivo* studies. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* This issue.
- INOKUCHI, J.I., et NAGAMATSU, A. (1981). Tripeptidyl carboxypeptidase activity of kininase II (Angiotensin- converting enzyme). *Biochem. Biophys. Acta.* **662**: 300-307.
- JACQUES, L., COUTURE, R., DRAPEAU, G., et REGOLI, D. (1989). Cappillary permeability induced by intravenous neurokinins: receptor characterization and mechanism of action . *Naunym- Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **340**: 170-179.
- JASPARD, E., WEI, L., ALHENC-GELAS, F. (1993). Differences in the proprieties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensine I-converting enzyme (kininase II). *J Biol Chem* **268**:9496-503.
- JESSEL, S.J., et IVERSEN, L.L. (1977). Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus. *Nature.* **268**: 433-434.
- KENAKIN, J.P. (1984). The classification of drugs receptors in isolated tissues. *Pharmacol. Rev.* **36**: 165-222.
- KENAKIN, J.P. (1982). The Schild regression in the process of receptor classification. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* **60**:249-265.

- KENNY, A.J., et MAROUX, S. (1984). Topology of microvillar membrane hydrolase of kidney and intestine. *Physiol. Rev.* **62**: 91-128.
- KOTANI, H., HOSHIMARO, M., NAWA, H., et NAKANISHI, S. (1986). Structure and gene organisation of bovine neuromedine K precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 7074-7078.
- KRAUSE, J.E., CARTER, M.S., XU, Z.S., et MACDONALD, M.R. Structure, expression and regulation of rat prepotachykinin I gene. Dans: Substance P and neurokinins. HENRY, J.L., COUTURE, R., CUELLO, A.C., PELLETIER, G., QUIRION, R., et REGOLI, D (eds). Springer-Verlag, New York, 5-7, 1987.
- LEFKOWITZ, R.J., CARON, M.J. (1988). Adrenergic receptors: models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J. Biol. Chem.*; **263**: 4993-4996.
- LEMBECK, F., Folkers, K., Donnerer, J. (1981). Analgesic effect of antagonists of substance P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103**: 1318-1321.
- LEMBECK, F., and HOLZER, P. (1979). Substance P sa neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **310**- 175-183.
- LINZ, W., WIEMER, G., GHOLKE, P., UNGER, T., SCHOLKENS, B.A. (1995). Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* **47**: 25-49.

- LORTIE, M., REGOLI, D., RHALEB, N.E., PLANTE, G.E. (1992). The role of B₁ and B₂ kinin receptors in the renal tubular and hemodynamic response to bradykinin. *Am. Physio. Soc.* R72-R76
- LOVETT, D.H., STERZEL, R.B., RYAN, J.L. and ATKINS, E. (1985). Production of an endogenous pyrogen by glomerular mesangial cells. *J. Immunol.* **134**: 670-672.
- MACNEIL, T., BIERILO, K.K, MENKE, J.G., HESS, J.F. (1995). Cloning and pharmacological of a rabbit bradykinin B₁ receptor . *Biochem. Biophysiol. Acta.* **1264**: 223-228.
- MAGGI, C.A., ASTOLFI, M., GIULIANI, S., GOSO, C., MANZINI, S., MEINI, S., PATACCHINI, R., PAVONE, V., PEDONE, C., QUARTARA, L., RENZETTI, A.R., GIACHETTI, A. (1994). MEN 10,627, a novel polycyclic peptide antagonist for tachykinin NK₂ receptors. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* **271**:1489-1500.
- MAGGI, C.A., PATACCHINI, R., GIULIANI, S., ROVERO, P., DION, S., REGOLI, D., GIACHETTI, A., MELI, A. (1990). Competitive antagonists discriminate between NK-2 tachykinin receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.* **100**: 588-592.
- MANTYH, P.W., GATES, T.S., MANTYH, C.R., MAGGIO, J.E. (1998). Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues. *J. Neurosci.* **9**: 258-279.

- MANTYH, P.W., PINNOCK, R.D., DOWNES, C.P., GOEDERT, M., HUNT, S.P. (1984). Substance P receptors: correlation with substance P induced inositol phospholipid hydrolysis in the rat central nervous system. *Nature (London)*. **309**: 795-797.
- MARCEAU, F. (1995). Kinin B1 receptors: A review. *Immunopharmacology*. **30**: 1-26.
- MARCEAU, F., LUSSIER, A., REGOLI, D., and GIROUD, J.P. (1983). Pharmacology of kinins: Their relevance to tissue injury and inflammation. *Gen. Pharmacol.* **14**: 209-229.
- MARCEAU, F., BARABÉ, J., ST-PIERRE, S. and REGOLI, D. (1980). Kinin receptors in experimental inflammation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **58**: 536-542.
- MARCINKIEWICZ, M., SEIDAH, N.G., et CHRETIEN, M. (1993). Les convertases des prohormones et le systèmes nerveux. *Médecine/Sciences*. **9**: 553-561.
- MARLEY, P., et LIVETT, B.G. (1985). Neuropeptides in autonomic nervous system. *Crit. Rev. Clin. Neurobiol.* **1**: 201-283.
- MASTRANGELO, D., MATHISON, R., HUGGEL, H.J., DION, S., D'ORLÉANS-JUSTE, P., RHALEB, N-E., DRAPEAU, G., ROVERO, P., et REGOLI, D. (1987). The rat isolated portal vein: a preparation sensitive to neurokinins particularly neurokinin B. *Eur. J. Pharmacol.* **134**: 321-326.

- MASU, Y., NKAYAMA, K., TAMAKI, H., HARADA, Y., KUNO, M., et NAKANISHI, S. (1987). CDNA cloning of bivariate substance K receptor through oocyte expression system. *Nature*. **329**: 836-838.
- MATHIS, S.A., CRISCIMAGNA, N.L., LEEB-LUNDBERG, F. (1996): B₁ and B₂ kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacol.* **50**: 128-139.
- MEINI, S., LECCI, A., MAGGI, C.A. (1996). The longitudinal muscle of the rat ileum as a sensitive monoreceptor assay for bradykinin B₁ receptors. *Br. J. Pharmacol.* **17**: 1619-1624.
- McEACHERN, A.E., SHELTON, E.R., BHAKA, S., OBERNOLTE, R., BACH, C., ZUPPAN, P., FUJISAKI, J., ALDRICH, R.W., JARNAGIN, K. (1991). Expression cloning of a rat B₂ bradykinin receptor. 1991 *Proc Natl Acad Sci USA*. **88**: 7724-8.
- McKNIGHT, A.T., MAGGUIRE, J.J., WILLIAMS, B.J., FOSTER, A.C., TRIDGETT, R., et IVRESEN, L.L. (1988). Pharmacological specificity of synthetic peptide antagonists at tachykinin receptors. *Regul. Pept.* **22**: 127.
- MENKE, J.G., BORKOWSKI, J.A., BIERILO, K.K., MAC NEIL, T., DERRICK, A.W., SCHNECK, K.A., RAN, J.F. (1994). Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. *J Biol Chem* **269**: 21583-6.

- MOMBOULI, J.V., VANHOUTE, P.M. (1995). Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**: 679-705.
- NAKANISHI, S. (1987). Substance P precursor and kininogene: their structure gene, organisation and regulation. *Physiol. Rev.* **67**: 1117-1142.
- NAKANISHI, S. (1986). Structure and regulation of the prepotachykinin gene. *Tin.* **9**: 41-44.
- NAKANISHI, S. (1991). Mammalian tachykinin receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* **14**: 123-136.
- NGUYEN-LE, X.K., NGUYEN, Q.T., GOBEIL, F., PHENG, L.H., EMONDS-ALT, X., BRELIERE, J.C., REGOLI, D. (1996). Pharmacological characterization of SR-142801: a new non-peptide antagonist of the neurokinin NK-3 receptor. *Pharmacology* **52**: 283-291.
- NSA ALLOGHO, S., GOBEIL, F., PERRON, S.I., HESS, J.F., REGOLI, D. (1998). Effects of kinins on isolated stomachs of control and transgenic knockout B₂ receptor in mice. *N.S.Arch of pharmacol.* (**en presse**).
- OHKUBO, H., et NAKANISHI, S. (1991). Characterization of the three tachykinin receptors. Dans Susan E. LEEMAN, James E. KRAUSE et Fred LEMBECK (Eds): Substance P and related peptides: cellular and molecular physiology. New York Academy of Sci. p. 53-62.
- OURY-DONAT, F., LEVEVRE, I.A., EMONDS-ALT, X., LE FUR, G., et SOUBRIE, P. (1993). SR 140333, a novel and potent antagonist of the NK-

- 1 receptor : characterization on the U373 MG cell line. *Neuropeptides*. **24**: 233.
- PERNOW, B. (1983). Substance P. *Pharmacol. Rev.* **35**: 85-147.
- PESQUERO, J.B., LINDSEY, C.J., ZEH, K., PAIVA, A.C.M., GANTEN, D., BADER, M. (1994). Molecular structure and expression of rat bradykinin B2 receptor gene. *J Biol Chem* **269**: 26920-5.
- POWELL, S.J., SLYNN, G., THOMAS, C., HOPKINS, B., BRIGGS, I., RAHAM, A. (1992). Human bradykinin B2 receptor: nucleotide sequence analysis and assignment to chromosome 14. *Genomics* **15**: 435-8.
- RANDALL, L.O. AND SELITTO, J.J. (1957). A method for the measurement of analgesic activity in inflamed tissues. *Arch. Intern. Pharmacodyn.* **111**: 409.
- RAE, A.G., MASS, J., HUIDOBRO-TORO, J.P., CALIXTO, J.B. (1995). Characterization of kinin receptors modulating neurogenic contractions of the mouse isolated vas deferens. *Brit. J. Pharmacol.* **114**: 1471-1477.
- REGOLI, D., RIZZI, A., CALO, G., NSA ALLOGHO, S., GOBEIL, F. (1997). B₁ and B₂ kinin receptors in various species. *Immunopharmacology* **36**: 143-147.
- REGOLI, D., JUKIC, D., et GOBEIL, F. (1995). Antagonistes de récepteurs B₁ et B₂ des kinines et perspectives thérapeutiques. *Thérapie*. **50**: 9-18.
- REGOLI, D., GOBEIL, F., NGUYEN, Q.T. (1994). Bradykinin receptor types and subtype. *Life sci* **50**: 735-49.

- REGOLI, D., GOBEIL, F., NGUYEN, Q.T., JUKIC, D., SEOANE, P.R., SALVINO, J.M. and SAWUTZ, D.G. (1994). Bradykinin receptor types and B₂ subtypes. *Life Sci.* **55**: 735-749.
- REGOLI, D., BOUDON, A., FAUCHERE, J.L. (1994b). Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev* **46**: 551-559.
- REGOLI, D., DRAPEAU, G., DION, S., et COUTURE, R. (1988). New selective for neurokinin receptors: pharmacological tools for receptor characterization. *Trends Pharmacol. Sci.* **9**: 290-295.
- REGOLI, D., DRAPEAU, G., DION, S., et D'ORLÉANS-JUSTE, P. (1987). Receptors for neurokinins in peripheral organs. Dans J.L. Henry, R. Couture, A.C. Cuello, G. Pelletier, Quirion, R. Et D. Regoli (Eds): Substance P and Neurokinins. Springer, N.Y. p. 99-107.
- REGOLI, D. AND BARABE, J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* **32**: 1-46.
- REGOLI, D., MARCEAU, F. and BARABE, J. (1978). *De novo* formation of vascular receptors for bradykinin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **56**: 674-677.
- REGOLI, D., BARABE, J. AND PARK, W.K. (1977). Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **55**: 855-867.

- REGOLI, D., RHALEB, N.E., DION, S. and DRAPEAU, G. New selective bradykinin receptor antagonists and bradykinin B₂ receptor characterization. *TIPS* **11**: 156-161.
- RHALEB, N.E., DRAPEAU, G., JUKIC, D., ROUISSI, N. and REGOLI, D. (1990). Structure-activity studies of bradykinin and related peptides. Agonists. *Br. J. Pharmacol.* **99**: 445-448.
- RHALEB, N.E., TELEMAQUE, S., ROUISSI, N., DION, S., JUKIC, D., DRAPEAU, G. and REGOLI, D. (1991a). Structure-activity studies of bradykinin and related peptides. B₂ receptor antagonists. *Hypertension (Dallas)* **17**: 107-115.
- RIOUX, F., PARK, W.K. and REGOLI, D. (1973). Application of drug-receptor theories to angiotensin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **51**: 665-672.
- RITTER, J.M., DOKTOR, H.S., CRAGOE, E.J. (1989). Actions of bradykinin and related peptides on rabbit coeliac artery rings. *BR. J. Pharmacol.* **96**: 23-28.
- RIZZI, A., GOBEIL, F., BOGONI, G., CALO, G., COMPOBASSO, C., INAMURA, N., ET REGOLI, D. (1997). Antagonistic effects of FR 173657 on human, pig, rabbit, and guinea pig kinin receptors: an *in vitro* study. *Can. J. Pharmacol.* **75**: 000-000.
- ROCHA E SILVA, M. (1970). Kinin hormones. C.C. Thomas, Springfield, Ill., U.S.A.

ROUISSI, N., NANTEL, F., DRAPEAU, G., RHALEB, N.E., DION, S. and REGOLI, D. (1990). Inhibitors of peptidases: how they influence the biological activities of substance P, neurokinins, bradykinin and angiotensins in guinea pig, hamster and rat urinary bladders. *Pharmacology* **40**: 196-204.

ROUISSI, N., NANTEL, F., DRAPEAU, G., RHALEB, N.E., DION, S. and REGOLI, D. (1990). Inhibitors of peptidases: how they influence the biological activities of substance P, neurokinins, kinins and angiotensins in isolated vessels. *Pharmacology* **40**: 185-195.

ROVERO, P., PESTELINI, V., RHALEB, N-E., DION, S., ROUISSI, N., TOUSIGNANT, C., TELEMAQUE, S, DRAPEAU, G., et REGOLI, D. (1989). Structure-activity studies of neurokinin A. *Neuropeptides*. **13**: 263-270.

SAWUTZ, D.G., SALVINO, J., DOLLE, R.E. et al. (1993). Discovery and in vitro biological activity of the non peptide bradykinin receptor antagonist, WIN 64338. *The pharmacologist*. **35**:142.

SCHILD, H.O. (1973). Receptor classification with special reference to beta-adrenergic receptors. Dans: *Drug Receptor*; ed. Par Rang HP, pp. 29-36, University Park Press, Baltimore.

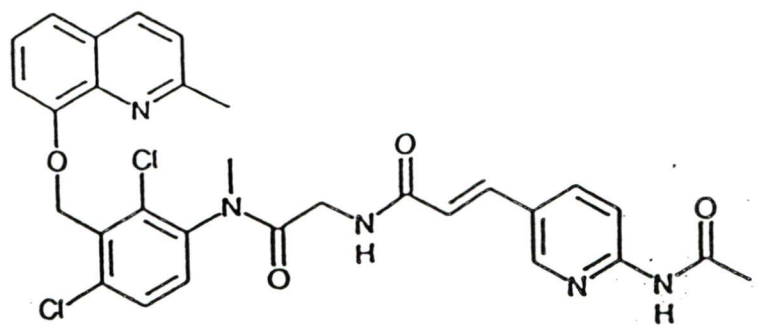
SCHILD, H.O. (1947). pA_x , a new scale for the measurement of drug antagonism. *Br. J. Pharmacol.* **2**: 189-202.

- SHIGEMOTO, R., YOKOTA, Y., TSUCHIDA, K., et NAKANISHI, S. (1990). Cloning and expression of a rat neuromedin K receptor cDNA. *J. Biol. Chem.* **265**: 623-628.
- SMITH, J.A.M., WEBB, C., HOLFORD, J., BURGESS, G.M. (1995): Signal transduction pathways for B₁ and B₂ bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Mol Pharmacol.* **47**: 525-534.
- SNIDER, R.M., LONGO, K.P., DROZDA, S.e., LOWE III, J.A., et LEEMEN, S.E. (1991). Effect of CP 96345, a nonpeptide substance P receptor antagonist, on salivation in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 10042-10044.
- STEINER, D.F., SMEEKENS, S.P., OHAGI, S., et CHAN, S.J. (1992). The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J. Biol. Chem.* **267**: 23435-23438.
- STERANKA, L.R., MANNING, D.C., DEHAAS, C.J., FERKANY, J.W., BOROSKY, S.A., CONNOR, J.R., VAVRECK, R.J., STEWART, J.M., et SNYDER, S.H. (1988). Bradykinin as a pain mediator: Receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 3245-3249.
- STEWART, J.M. (1995). Bradykinin antagonists: development and applications. *Biopolymers (peptide Science)* **137**: 143-55.

- STEWART, J.M. and VAVREK, R. (1991). Chemistry of peptide B₂ bradykinin antagonists. In: bradykinin antagonists, pp. 51-96, R.M. Burch, Ed., M. Dekker, New York.
- STOESSL, A.J., DOURISH, C.T. et IVERSEN, S.D. (1988). Behavioural evidence for CNS tachykinin-cholinergic interactions, *Regulatory Peptides*. **22**: 178.
- STRATTON, S.C., BERESFORD, I.M., HAGAND, R.M. (1996). Autoradiographic localisation of tachykinin NK-2 receptors in adult rat brain using [³H]SR-48968. *Br. J. Pharmacol.* **117**: 295P
- TALLARIDA, G., BALDONI, F., PERUZZI, G., SEMPRINI, A., et SANGIORGI, M.(1976). Cardiovascular and respiratory reflexes elicited by bradykinin acting on receptor sites (K and P) in the muscular circulatory are. In *Kinins* ed. By F. Sicuteri, N. Back, and G.L. Haberland, pp. 301-314, Plenum Press, New York.
- TATTERSALL, F.D., RYCROFT, W., HARGREAVES, R.J., et NORHEIM, I. (1993). The tachykinin NK-1 receptor antagonist CP 99994 alternates ciplastin-induced emesis in the ferret. *Eur. J. Pharmacol.* **250**: R5-R6.
- TIFFANY, C.W., and BURCH, R.M. (1989). Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett.* **247**: 189-192.
- TODA, N., BAIN, K., AKIDA, T., and OKAMURA, T. (1987). Heterogeneity of bradykinin action in canine isolated arterial vessels. *Eur. J. Pharmac.* **162**: 419-427.

- TOUSIGNANT, C. Effets des neuropeptides sur le système nerveux autonome. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.
- TOUSIGNANT, C., DION, S., DRAPEAU, G., et REGOLI, D. (1987). Characterization of pre and post junctional receptors for neurokinins and kinins in the rat vas deferens. *Neuropeptides*. **9**: 333-343.
- VAN DER POEG, L.H.T, FEIGHNER, S., HESS, J.F., RANSOM, R.W., SEABROOK, G.R., TRUMBAUER, M., CHEN, H., HILL, R.G., MACNEIL, T. 1996. Partial agonists and full antagonists at the human and murine bradykinin B₁ receptors " Peptide Receptors". III 0.2. pp 32. Montréal 1996.
- VANE, J.R. (1957). A sensitive method for the bioassay of 5-hydroxytryptamine. *Br. J. Pharmacol.* **43**: 351-359.
- VON EULER, U.S., et GADDUM, J.H. (1931). An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol.* **72**: 74-87.
- WALKERS, K., PERKINS, M., DRAY, A. (1995). Kinins and kinin receptor in the nervous system. *Neurochem Int* **26**:1-16.
- WATSON, S.P., and DOWNES, C.P. (1983). Substance P-induced hydrolysis of inositol phospholipids in the guinea pig ileum and rat hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* **93**: 245-253.

- WATSON, S.P. (1984). Are the proposed substance P receptors substance P receptors? *Life Sci.* **35**: 797-809.
- WEINTRAUB, W.H., NEGULESCU, P.A., MACHEN, T.E. (1992). Calcium signaling in endothelia: cellular heterogeneity and receptor internalization. The American Physiological Society. C1030- C1039.
- WORMSER, U., LAUFER, R., HART, Y., CHOREV, M., GILON, C., et SELIGER, Z. (1986). Highly selective agonists for substance P receptor subtypes. *EMBO J.* **5**: 2805-2808.
- YASHPAL, K., DAM, T.V., et QUIRION, R. (1990). Quantitative autoradiographic distribution of multiple neurokinin binding sites in the rat spinal cord. *Brain Res.* **506**: 259-266.
- YASPHAL, K., GAUTHIER, S., et HENRY, J.L. (1987). Substance P given intrathecally at the spinal T9 level increases arterial pressure and heart rate in the rat. *J. Autonomic Nervous System* **18**: 93-103.
- YOKOTA, Y., SASAI, Y., TANAKA, K., FUJIWARA, T., TSUCHIDA, K., SHIGEMOTO, R., KAKIZUKA, A., OHKUBO, H., NAKANISHI S. (1989). Molecular characterization of a functional cDNA for rat substance P receptor. *J. Biol. Chem.* **264** (30): 17649-17652.
- ZERARI, F., DION, S., KARPISTIY, V., KRAUSE, J., COUTURE, R.(1996). Immunocytochemical localisation of tachykinin NK-2 receptors (NK-2R) in the rat central nervous system (CNS). *Peptide Receptor Symposium*, Montréal, Que. Abstr.VI.0.5



Structure chimique du FR 173657