

**UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

**IMPLICATION DES KININES DANS L'INFLAMMATION PULMONAIRE  
ET RÉACTIVITÉ DES VOIES AÉRIENNES DE COBAYES À L'AGONISTE  
DU RÉCEPTEUR B<sub>1</sub>**

par

**MARIE-SOLEIL PERRON**

**Département de pharmacologie**

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M.Sc.)**

**Août 1999**

# IMPLICATION DES KININES DANS L'INFLAMMATION PULMONAIRE ET RÉACTIVITÉ DES VOIES AÉRIENNES DE COBAYES À L'AGONISTE DU RÉCEPTEUR B<sub>1</sub>.

par

MARIE-SOLEIL PERRON

Mémoire présenté au département de pharmacologie en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.). Faculté de médecine, Université de Sherbrooke.

## RÉSUMÉ

L'asthme est un syndrome respiratoire caractérisé par une hyperréactivité bronchique (HRB) un œdème de la paroi bronchique, une hypersécrétion de mucus ainsi qu'une infiltration permanente des voies aériennes par des cellules inflammatoires. L'asthme est considéré comme un désordre inflammatoire des voies aériennes. Les médiateurs inflammatoires peuvent attirer et activer les leucocytes polymorphonucléaires, lesquels vont relâcher une quantité phénoménale de médiateurs qui vont servir à amplifier et à prolonger la réponse inflammatoire. Plusieurs médiateurs semblent impliqués dans la physiopathologie de l'asthme mais le rôle individuel de ces médiateurs devient apparent seulement avec l'utilisation d'antagonistes puissants et sélectifs des récepteurs de ces médiateurs. L'objectif de cette étude est donc de déterminer si les kinines sont impliqués dans l'inflammation pulmonaire via l'activation des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>. Nous avons utilisé un modèle d'inflammation pulmonaire induit par l'injection intraveineuse de billes de sephadex chez le cobaye conscient. Comme le récepteur B<sub>1</sub> n'a jamais été caractérisé chez le cobaye, nous avons également étudié la réactivité de la trachée, des bronche supérieures et inférieures à l'agoniste du récepteur B<sub>1</sub>. Nos résultats suggèrent que les antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> ont une activité anti-inflammatoire sur le recrutement de leucocytes induit par l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye. Le récepteur B<sub>1</sub> serait impliqué dans le recrutement des éosinophiles (via la relâche de NO), tandis que le récepteur B<sub>2</sub> serait impliqué dans le recrutement des éosinophiles et des neutrophiles. De plus, nos résultats démontrent que les agonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> sont capables d'induire une réponse inflammatoire pulmonaire, caractérisée par une infiltration cellulaire pulmonaire, une augmentation de la perméabilité bronchoalvéolaire et une hyperréactivité bronchique, caractéristiques retrouvées dans la physiopathologie de l'asthme. Notre étude *in vitro* suggèrent que la trachée et la bronche supérieure de cobayes témoins contractent de façon significative à la desArg<sup>9</sup>-BK (DBK) et démontrent une hyperréactivité à la DBK 24 h après l'injection des billes de Sephadex. Cependant, aucun des trois antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> utilisés (R 715, B 9858, [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK) n'a inhibé la réponse contractile à la DBK au niveau de la trachée et de la bronche supérieure de cobaye sain. Par contre, les trois antagonistes ont complètement inhibé la réponse contractile à la desArg<sup>9</sup>-BK au niveau de l'aorte de lapin. Cela soulève l'hypothèse de l'existence d'un sous-type de récepteur des kinines au niveau des voies aériennes de cobayes. L'ensemble de nos résultats suggère que les kinines endogènes, BK et DBK, seraient impliquées dans le recrutement de leucocytes dans notre modèle d'inflammation pulmonaire induit par le Sephadex, et ce via l'activation des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>. L'induction d'une réponse inflammatoire par les agonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>, suggère un rôle potentiel de ces récepteurs dans l'initiation de la réponse inflammatoire au niveau des voies aériennes de cobayes.

## TABLE DES MATIÈRES

### INTRODUCTION

1. ASTHME.....	1
1.1 Définition.....	1
1.2 Cellules inflammatoires.....	1
1.3 Médiateurs inflammatoires.....	6
2. HISTORIQUE DU SYSTÈME KININE-KALLICRÉINE.....	7
2.1 Découverte de la kallibréine.....	7
2.2 Découverte de la bradykinine.....	7
2.3 Précurseur de la bradykinine : bradykininogène.....	8
2.4 Inactivateurs des kinines : kininogénases.....	8
2.5 Découverte des récepteurs des kinines.....	8
3. BIORÉGULATION DES KININES.....	11
3.1 Kallibréines.....	11
3.2 Kininogènes.....	13
3.3 Kininases.....	14
3.3.1 Kininase II (ECA).....	14
3.3.2 Endopeptidase neutre 24.11 (NEP).....	16
3.3.3 Kininase I (CPN, CPM).....	17
3.3.4 Aminopeptidase P.....	18
4. EFFETS BIOLOGIQUES DES KININES.....	19
4.1 Récepteurs des kinines.....	24
4.2 Kinines et infiltration cellulaire.....	30

4.3	Génération des kinines dans l'asthme.....	32
4.4	Antagonistes des récepteurs des kinines: modèles animaux d'asthme .....	33
4.5	Modèle d'inflammation pulmonaire .....	35
MATÉRIEL ET MÉTHODES		
5.	MODÈLE D'INFLAMMATION PULMONAIRE.....	37
5.1	Injection des billes de Sephadex G-50.....	37
5.2	Lavage bronchoalvéolaire.....	37
5.2.1	Populations cellulaires totales récoltées dans les liquides du LBA.....	38
5.2.2	Décompte différentiel des cellules du lavage bronchoalvéolaire .....	39
6.	EXPÉRIENCES <i>IN VIVO</i> .....	39
6.1	Utilisation des antagonistes des RB <sub>1</sub> et RB <sub>2</sub> (modèle Sephadex) .....	39
6.2	Dosage colorimétrique de l'EPO .....	42
6.3	Induction d'une réponse inflammatoire par les agonistes des RB <sub>1</sub> et RB <sub>2</sub> ...	42
6.4	Dosage biochimique de l'albumine .....	44
6.5	Mesure de la pression sanguine et de la PIP .....	45
7.	EXPÉRIENCES <i>IN VITRO</i> .....	46
7.1	Préparation des tissus : trachée, bronches supérieures et inférieures.....	46
7.2	Système de bains classiques.....	46
8.	STATISTIQUES.....	47
RÉSULTATS		
9.	ÉTUDES <i>IN VIVO</i> .....	48
9.1	Induction de l'influx cellulaire pulmonaire par l'injection de Sephadex .....	48
9.2	Effets des antagonistes des RB <sub>1</sub> et RB <sub>2</sub> des kinines.....	51
9.2.1	Effet du [Leu <sup>8</sup> ]desArg <sup>9</sup> -BK et du HOE 140 sur l'infiltration cellulaire .....	51

9.2.2	Effet du B 9858 et du B 9430 sur l'infiltration cellulaire .....	55
9.3	Activité EPO totale dans les LBA.....	58
9.3.1	Activité EPO des cobayes traités avec le [Leu <sup>8</sup> ]desArg <sup>9</sup> -BK/HOE 140 ....	58
9.3.2	Activité EPO des cobayes traités avec le B 9858 / B 9430.....	59
9.4	Infiltration cellulaire pulmonaire induite par les agonistes des RB <sub>1</sub> / B <sub>2</sub> .....	59
9.4.1	Effet de l'injection i.t. de BK sur l'infiltration cellulaire.....	61
9.4.2	Effet de l'injection i.t. de DBK sur l'infiltration cellulaire.....	64
9.4.3	Effet du [Leu <sup>8</sup> ]desArg <sup>9</sup> -BK sur l'infiltration induite par la DBK.....	67
9.4.4	Effet du L-NAME / indométacine sur l'infiltration induite par la DBK ...	70
9.5	Effet de la BK et de la DBK sur la perméabilité bronchoalvéolaire.....	73
9.6	Effet vasodépresseur des kinines .....	76
9.6.1	Effet de la BK / DBK sur la PA des cobayes (témoins / Sephadex) .....	76
9.7	Effet des kinines sur la PIP .....	77
9.7.1	Effet de la BK / DBK sur la PIP cobayes (témoins / Sephadex).....	77
10.	ÉTUDES <i>IN VITRO</i> .....	82
10.1	Réactivité de la T, BS et BI de cobayes témoins à la DBK .....	82
10.2	Réactivité de la T, BS et BI de cobayes Sephadex à la DBK.....	83
10.3	Effets des antagonistes du RB <sub>1</sub> sur la réactivité des tissus à la DBK .....	89
10.3.1	Effet du [Leu <sup>8</sup> ]desArg <sup>9</sup> -BK, du R 715 et du B 9858 .....	89
DISCUSSION		
11.	MODÈLE D'INFLAMMATION PULMONAIRE.....	92
11.1	Influx de cellules inflammatoires par l'injection de billes de Sephadex .....	94
11.2	Effets des antagonistes des RB <sub>1</sub> et des RB <sub>2</sub> sur l'infiltration cellulaire.....	96
11.3	Effets de la BK sur l'infiltration cellulaire pulmonaire .....	101

11.4 Effets de la BK sur la perméabilité bronchoalvéolaire .....	102
11.5 Induction d'une réponse inflammatoire par la DBK.....	103
11.5.1 Effet du L-NAME / Indo sur l'influx cellulaire induit par la DBK.....	105
11.6 Effet vasodépresseur des kinines .....	107
11.7 Effets des kinines sur la PIP.....	108
11.8 Réactivité des tissus pulmonaires de cobayes à l'agoniste du RB <sub>1</sub> .....	109

CONCLUSION

REMERCIEMENTS

BIBLIOGRAPHIE

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1:</b> Diapédèse des leucocytes .....	5
<b>Figure 2:</b> Métabolisme des kinines .....	15
<b>Figure 3:</b> Système kinine-kallicréine .....	20
<b>Figure 4:</b> Voies de signalisations intracellulaires .....	28
<b>Figure 5:</b> Micro-pompe osmotique ALZET.....	41
<b>Figure 6:</b> Influx de cellules inflammatoires par l'injection de billes de Sephadex.....	50
<b>Figure 7:</b> Effet du [Leu <sup>8</sup> ]desArg <sup>9</sup> -BK et du HOE 140 sur l'infiltration cellulaire induite par le Sephadex.....	54
<b>Figure 8:</b> Effet du B 9858 et du B 9430 sur l'infiltration cellulaire pulmonaire induite par le Sephadex.....	57
<b>Figure 9:</b> Effet de l'injection intratrachéale de BK sur l'infiltration cellulaire .....	63
<b>Figure 10:</b> Effet de l'injection intratrachéale de DBK sur l'infiltration cellulaire .....	66
<b>Figure 11:</b> Effet du [Leu <sup>8</sup> ]desArg <sup>9</sup> -BK sur les populations cellulaires pulmonaires récoltées dans le LBA 5 h après l'injection intratrachéale de DBK .....	69
<b>Figure 12:</b> Effet du L-NAME et de l'indométacine sur l'infiltration cellulaire pulmonaire induite par la DBK.....	72
<b>Figure 13:</b> Effet de la BK et de la DBK sur la perméabilité bronchoalvéolaire.....	75
<b>Figure 14:</b> Effet de la BK et de la DBK sur la pression artérielle des cobayes témoins et des cobayes injectés avec les billes de Sephadex .....	79
<b>Figure 15:</b> Effet de la BK et de la DBK sur la pression d'insufflation pulmonaire des cobayes témoins et injectés avec les billes de Sephadex .....	81

- Figure 16:** Réactivité de la trachée, des bronches supérieures et inférieures de cobayes témoins à la DBK..... 85
- Figure 17:** Réactivité de la trachée, des bronches supérieures et inférieures de cobayes injectés avec les billes de Sephadex à la DBK..... 88
- Figure 18:** Effet du [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK, du R 715 et du B 9858 sur l'effet contractile à la DBK de la trachée et les bronches supérieures de cobayes témoins..... 91



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Événements qui ont marqué l'histoire de la bradykinine.....	9
Tableau II. Identification des rôles physiologiques du système kinine-kallicréine .....	10
Tableau III. Classification des récepteurs B <sub>1</sub> et B <sub>2</sub> des kinines.....	25
Tableau IV. Activité EPO totale des cobayes infusés avec le [Leu <sup>8</sup> ]DBK ou le HOE 140 .....	60
Tableau V. Activité EPO totale des cobayes traités avec le B 9858 ou le B 9430 .....	60

## LISTE DE PUBLICATION

**Perron, M-S., Gobeil, F., Regoli, D., et Sirois, P. (1999)** Involvement of bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in pulmonary leukocyte accumulation induced by Sephadex beads in guinea pigs. *European journal of Pharmacology* (sous presse).

## LISTE DE COMMUNICATIONS

**Perron, M-S., Battistini, B., Pelletier, S., Neugebauer, W., Regoli, D. et Sirois, P. (1997)** Effets des antagonistes B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> de la bradykinine sur la migration des leucocytes dans l'inflammation pulmonaire induite par le Sephadex chez le cobaye., 2<sup>ième</sup> mini-symposium du sous-réseau "Endothélium", Montréal, Poster.

**Perron, M-S., Battistini, B., Pelletier, S., Neugebauer, W., Regoli, D. et Sirois, P. (1997)** Effects of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> antagonists on the migration of leukocytes in sephadex-induced pulmonary inflammation in guinea pigs. Annual general Meeting of Inspiraplex (Respiratory Health Network of Centres of Excellence), Montréal, Abstracts book Po22.

**Perron, M-S., Gobeil, F., Neugebauer, W., Regoli, D., et Sirois, P. (1997)** Inhibition de l'infiltration cellulaire pulmonaire chez le cobaye par des antagonistes B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> de la bradykinine., *CRCQ, Medecine/Sciences, Supplément N°2, volume 13, p.37.*

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>BK</b>	Bradykinine
<b>CPM</b>	Carboxypeptidase M
<b>CPN</b>	Carboxypeptidase N
<b>DBK</b>	DesArg <sup>9</sup> -BK
<b>ECA</b>	Enzyme de conversion de l'angiotensine
<b>EPO</b>	Eosinophil peroxidase
<b>HRB</b>	Hyperréactivité bronchique
<b>KD</b>	Kallidine
<b>KFPM</b>	Kininogène de faible poids moléculaire
<b>KHPM</b>	Kininogène de haut poids moléculaire
<b>LBA</b>	Lavage bronchoalvéolaire
<b>LDBK</b>	Lysyl-desArg <sup>9</sup> -BK
<b>MBP</b>	Major basic protein
<b>MPO</b>	Myeloperoxidase
<b>NEP</b>	Endopeptidase neutre
<b>NO</b>	Oxide nitrique
<b>PAF</b>	Facteur activateur des plaquettes
<b>PIP</b>	Pression insufflation pulmonaire
<b>RB<sub>1</sub></b>	Récepteur B <sub>1</sub>
<b>RB<sub>2</sub></b>	Récepteur B <sub>2</sub>

## **INTRODUCTION**

### **1. ASTHME**

#### **1.1 Définition**

L'asthme est un syndrome respiratoire caractérisé par une obstruction variable et réversible des voies aériennes, une hyperréactivité bronchique (HRB), un œdème de la paroi bronchique, une hypersécrétion de mucus ainsi qu'une infiltration permanente des voies aériennes par des cellules inflammatoires (DJUKANOVIC, 1994). Bien que la contraction du muscle lisse soit un mécanisme important impliqué dans l'obstruction des voies aériennes, plusieurs études cliniques et fondamentales mettent en évidence la présence d'un état inflammatoire pulmonaire chez les sujets asthmatiques. L'asthme est maintenant reconnu comme étant un désordre inflammatoire de type subaigu et/ou chronique (BARNES, 1989).

#### **1.2 Cellules inflammatoires**

Les cellules inflammatoires retrouvées au niveau des voies aériennes des sujets asthmatiques, tels les éosinophiles, les neutrophiles et les macrophages, sont capables de libérer une panoplie de médiateurs inflammatoires qui, à leur tour, vont interagir de façon complexe pour induire les changements inflammatoires pulmonaires.

Les éosinophiles semblent tenir un rôle important dans la physiopathologie de l'asthme du fait de leur présence dans les voies aériennes des sujets asthmatiques et de leur capacité à libérer un nombre considérable de médiateurs pro-inflammatoires, comme les leucotriènes et le PAF (Platelet Activating Factor), et cytotoxiques, comme

la MBP (Major Basic Protein). L'éosinophilie pulmonaire est une caractéristique importante de l'asthme qui différencie l'asthme des autres conditions inflammatoires des voies aériennes. Les éosinophiles sont des granulocytes caractérisés morphologiquement par un noyau bilobé et par la présence de différents types de granules de sécrétion dans leur cytoplasme. Les éosinophiles contiennent des granules nommés secondaires dont la matrice est composée principalement de MBP et est entourée par d'autres protéines basiques, comme l'EPO (Eosinophil Peroxidase). Les éosinophiles expriment à leur surface des récepteurs pour des médiateurs lipidiques (leucotriènes, PAF), des cytokines (IL-3, IL-5, GM-CSF), des immunoglobulines (IgE et IgA) et des molécules d'adhésion. La liaison de ces divers médiateurs à la surface des éosinophiles entraîne une activation de ces cellules qui se traduit par la libération de plusieurs médiateurs préformés (MBP, EPO) et néoformés (prostaglandines  $E_2$ ,  $D_2$  et  $F_{2\alpha}$ , tromboxane  $A_2$ , leucotriènes  $B_4$  et  $C_4$ , PAF). L'EPO possède des propriétés cytotoxiques car elle provoque une desquamation de l'épithélium bronchique (FRIGAS *et al.*, 1991). Des taux élevés de MBP sont détectés dans les poumons des patients asthmatiques, et ces taux semblent corrélés avec le degré des dommages épithéliaux et la sévérité de l'HRB (LEFORT *et al.*, 1996).

Les neutrophiles sont aussi retrouvés dans les voies aériennes des sujets asthmatiques et peuvent relâcher des médiateurs comme les leucotriènes, les prostaglandines, le PAF et l'adénosine. Dans divers modèles animaux d'asthme, les neutrophiles semblent impliqués mais leur rôle au niveau des voies aériennes des sujets asthmatiques est moins défini que pour les éosinophiles. Les neutrophiles, comme les éosinophiles, sont des granulocytes qui originent des cellules souches localisées dans la moelle osseuse. Le

temps de transition nécessaire pour la maturation complète du neutrophile à partir de la cellule souche prend environ dix jours. Ensuite, le neutrophile est retenu dans la moelle osseuse environ cinq jours avant de migrer dans la circulation, dans les tissus extracellulaires ou dans les liquides biologiques (sécrétions bronchoalvéolaires, salive, urine). Il existe au moins trois sortes de granules dans le cytoplasme des neutrophiles. Les granules primaires, riches en MPO (myeloperoxydase), élastase, cathepsine B, D et G et probablement en kalllicréines tissulaires; les granules secondaires riches en lysosymes, lactoferrine et collagénase et les granules tertiaires riches en phosphatases alcalines et autres protéines transloquées à la membrane plasmique durant l'exocytose. Les neutrophiles sont les cellules inflammatoires les plus mobiles.

Les macrophages sont abondants dans l'arbre trachéobronchique et peuvent être activés par des mécanismes dépendant des IgE, ce qui suggère leur implication dans l'inflammation allergique. Les macrophages des patients asthmatiques relâchent un bon nombre de médiateurs, comme le tromboxane, les prostaglandines et le PAF. Les macrophages sont capables de libérer certaines cytokines, comme l'interleukine-1, TNF (Tumor Necrosis Factor) et GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) (LOHMANN-MATTHES *et al.*, 1994), qui ont pour effet d'augmenter les fonctions pro-inflammatoires des éosinophiles. Les macrophages libèrent aussi le MIP-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein), un facteur chimiotactique des éosinophiles (ROT *et al.*, 1992). Le rôle des macrophages dans la pathogénèse de l'asthme est difficile à élucider car ces cellules relâchent des médiateurs inflammatoires qui sont communs à plusieurs autres types cellulaires.

Les populations d'éosinophiles, de neutrophiles et de macrophages augmentent dans les liquides bronchoalvéolaire suite à l'exposition des sujets asthmatiques à l'allergène. Ces cellules ont la capacité de moduler et d'amplifier la réaction inflammatoire au niveau des voies aériennes des sujets asthmatiques. Pour exercer leur fonction, les cellules inflammatoires doivent migrer de la circulation sanguine au site d'inflammation et cette migration suit les mécanismes communs à toute migration cellulaire et peut se résumer en sept étapes : 1) contact des leucocytes avec les cellules endothéliales, 2) roulement des leucocytes sur la paroi endothéliale, 3) adhésion réversible des leucocytes sur les cellules endothéliales exprimant des molécules d'adhésion du type E- et P-sélectines, 4) induction de l'expression et augmentation de l'affinité des intégrines présentes à la surface des leucocytes par les facteurs chimiotactiques et les médiateurs inflammatoires libérés par les cellules endothéliales, épithéliales et inflammatoires, 5) adhésion plus importante des leucocytes par liaison avec les sélectines et intégrines présentes à sa surface, 6) migration transendothéliale des leucocytes et 7) migration des leucocytes dans la sous-muqueuse et la muqueuse des voies aériennes puis dans la lumière bronchique (CARLOS et HARLAN, 1994) (figure 1). Les leucocytes sont attirés au site d'inflammation par les facteurs chimiotactiques formés dans la phase initiale de la réaction inflammatoire. Ces facteurs initient la migration cellulaire en aidant l'adhésion des leucocytes à l'endothélium des capillaires, favorisant ainsi leur diapédèse à travers les jonctions endothéliales. Les ions de calcium sont essentiels à l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales, possiblement en agissant comme un pont pour prévenir la charge négative des membranes des deux types cellulaires impliqués. L'orientation et la migration des leucocytes sont régulées par les gradients de concentration des facteurs chimiotactiques dans le liquide interstielle entre le site

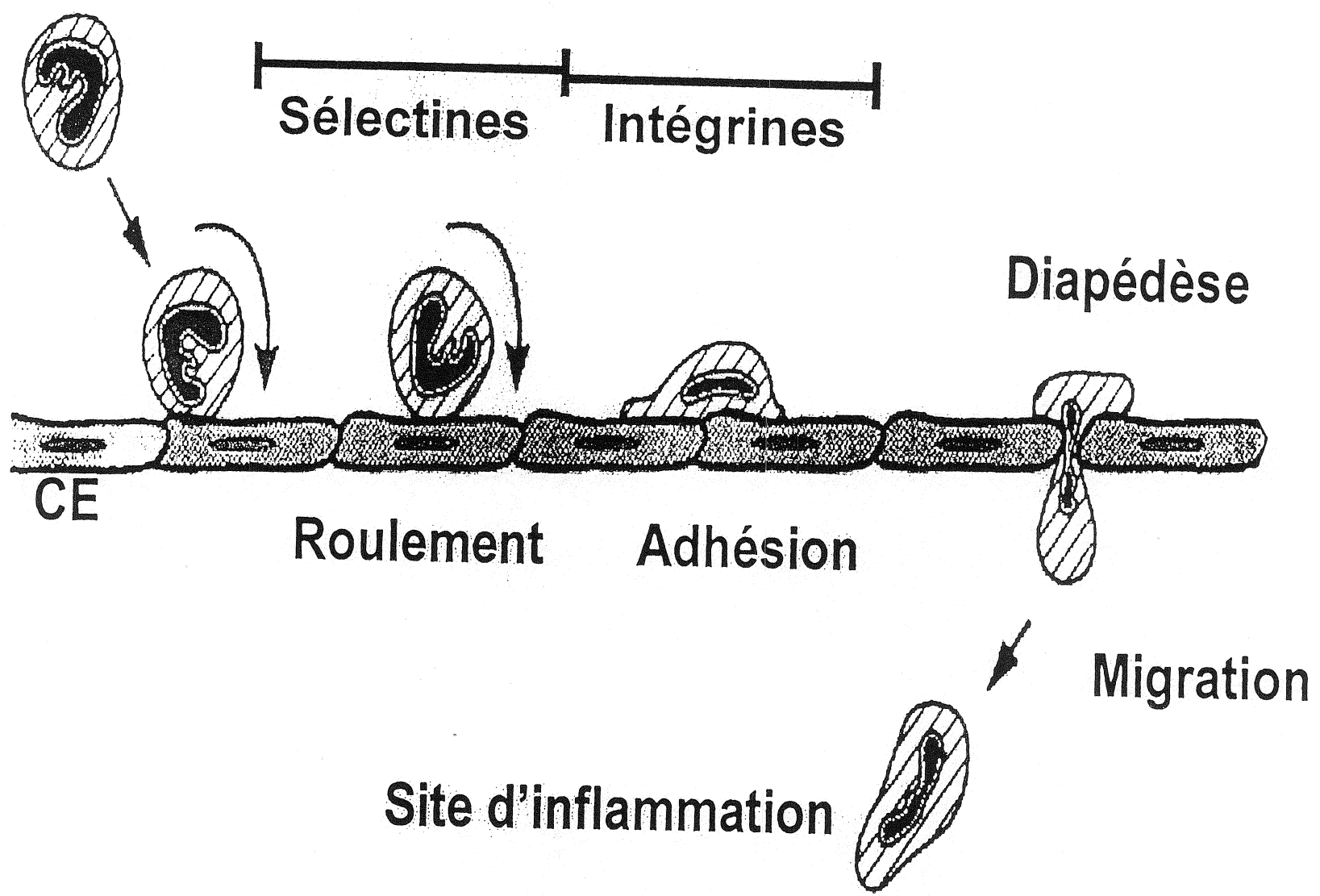


Figure 1 : Diapédèse des leucocytes aux sites d'inflammation



inflammatoire et la lumière des capillaires. Il existe plusieurs substances chimiotactiques, dont les leucotriènes, l'éotaxin, RANTES, l'interleukine-8 et le fragment C5a du complément (SMITH *et al.*, 1994; YAMASAWA et KITAMURA, 1999; GRAZIANO *et al.*, 1999; KOYAMA *et al.*, 1999)

### 1.3 Médiateurs inflammatoires

Les médiateurs relâchés par les cellules inflammatoires exercent plusieurs effets sur les cellules cibles des voies aériennes. Ces médiateurs peuvent être impliqués dans la contraction du muscle lisse bronchique (bronchoconstriction), directement ou indirectement via la relâche de médiateurs secondaires ou par l'activation de mécanismes neuronaux. Ils peuvent aussi augmenter la sécrétion des glandes sous-muqueuses pulmonaires augmentant ainsi le transport des fluides à travers l'épithélium bronchique et la perméabilité microvasculaire. Cette augmentation de perméabilité favorise la formation d'œdème et l'extravasation des constituants plasmatiques au niveau des voies aériennes. Les médiateurs inflammatoires peuvent attirer et activer les leucocytes polymorphonucléaires, lesquels vont relâcher une quantité phénoménale de médiateurs qui vont servir à amplifier et à prolonger la réponse inflammatoire. Plusieurs médiateurs semblent impliqués dans la physiopathologie de l'asthme mais le rôle individuel de ces médiateurs devient apparent seulement avec l'utilisation d'antagonistes puissants et sélectifs des récepteurs de ces médiateurs. Depuis la première démonstration de l'induction d'un bronchospasme par l'inhalation de bradykinine chez les patients asthmatiques, la bradykinine est considérée comme un médiateur important impliqué dans la physiopathologie de l'asthme.

## 2. HISTORIQUE DU SYSTÈME KININE-KALLICRÉINE

### 2. i Découverte de la kallibréine

L'histoire du système kinine-kallibréine a débuté en 1909 lorsque deux physiologistes toulousains, Abelous et Bardier, rapportèrent que l'injection intraveineuse d'urine humaine entraînait, chez le chien, une importante chute de la pression sanguine (ABELOUS et BARDIER, 1909). Suite à ces observations, le groupe de WERLE *et al.*, (1930) isola des quantités importantes de cette substance hypotensive à partir d'extraits de pancréas et la désigna du nom de «kallibréine» (du grec *kallikreas*, pancréas) et suggéra qu'il s'agissait d'une hormone synthétisée par le pancréas et éliminée dans l'urine. L'hypothèse fut abandonnée avec la découverte des enzymes tissulaires et plasmatiques.

### 2.2 Découverte de la bradykinine

Ce n'est qu'en 1949 que le groupe brésilien de Rocha e Silva découvrit la bradykinine (tableau I). En effet, ces chercheurs ont constaté que le venin du serpent *Bothrops jararaca* causait une forte hypotension lorsque injecté chez le chien et chez d'autres espèces, y compris l'homme (ROCHA e SILVA *et al.*, 1949). Pour comprendre le mécanisme qui médiait cet effet hypotenseur, ils ont prélevé du sang d'un chien traité avec le venin du serpent et l'ont appliqué sur un segment d'iléon de cobaye suspendu dans un bain contenant une solution de Tyrode, un antihistaminique et de l'atropine. À leur grande surprise, ils ont observé un effet contractile sur le muscle lisse isolé. Les contractions produites par l'agent actif étaient lentes comparées aux contractions

induites par l'histamine ou l'acétylcholine. Rocha e Silva et ses collaborateurs ont donc nommé l'agent actif bradykinine; brady pour lent et kinine pour mouvement.

### 2.3 Précurseur de la bradykinine : bradykininogène

ROCHA e SILVA *et al.*, (1949) ont donné le nom de bradykininogène au précurseur de la bradykinine, inspiré de la nomenclature proposé par Braun-Menendez pour le précurseur de l'hypertensine, l'hypertensinogène (i.e. angiotensine/angiotensinogène). En 1963, Habermann découvrit qu'il existait des kininogènes de faible poids moléculaire et des kininogènes de haut poids moléculaire (HABERMANN, 1963).

### 2.4 Inactivateurs des kinines : kininogénases

ERDÖS (1961) isola à partir du plasma humain une carboxypeptidase N (kininase I), laquelle clive l'arginine en C-terminale de la bradykinine. Six ans plus tard, Yang et Erdős isolèrent la kininase II (YANG et ERDÖS, 1967), laquelle clive le lien peptidique entre la Pro<sup>7</sup> et la Phe<sup>8</sup> de la bradykinine. En 1979, Erdős démontra que la kininase II est la même enzyme que l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ERDÖS, 1979).

### 2.5 Découverte des récepteurs des kinines

Vers la fin des années 1970, REGOLI *et al.* proposaient, sur des bases exclusivement pharmacologiques, l'existence de deux sous-types de récepteurs des kinines: le récepteur B<sub>1</sub> et le récepteur B<sub>2</sub> (REGOLI et BARABÉ, 1980).

Tableau I. Événements qui ont marqué l'histoire de la bradykinine (BK)

Année	Événement	Auteurs
1949	Relâche de la BK par le venin de serpent	Rocha e Silva <i>et al.</i>
1950	Essais de purification de la BK par chromatographie	Prado <i>et al.</i>
1956	Purification de la BK: chromatographie échangeuse ion	Andrade <i>et al.</i>
1959	Isolation et purification de la BK : octapeptide	Elliot <i>et al.</i>
1960	BK:Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	Boissonnas <i>et al.</i>

Tableau II. Identification des rôles physiologiques du système kinine-kallicréine

Année	Effet physiologique	Auteurs
1926	Hypotension induite par la kallicréine	Frey
1936	Stimulation du muscle lisse par la kallicréine	Werle
1949	Hypotension et stimulation du muscle lisse par la BK	Rocha e Silva <i>et al.</i>
1952	Stimulation de la douleur	Armstrong <i>et al.</i>
1956	Vasodilatation des glandes	Hilton et Lewis
1959	Effet sur le système nerveux central	Chapman et Wolff
1959	Augmentation de la perméabilité vasculaire	Elliot <i>et al.</i>
1960	Bronchoconstriction	Collier <i>et al.</i>
1964	Rôle dans l'inflammation	Lewis <i>et al.</i>
1973	Prolifération cellulaire et régénération tissulaire	Rixon et Whitfield

### 3. BIORÉGULATION DES KININES

#### 3.1 Kallibréines

Les kallibréines sont un groupe de protéases à sérine impliquées dans le clivage post-traductionnelle des précurseurs polypeptidiques des kinines, les kininogènes. Dans le système kinine-kallibréine, il existe deux types de kallibréines : les kallibréines plasmatiques et les kallibréines tissulaires.

La kallibréine plasmatique est codée par un seul gène et est synthétisée uniquement au niveau du foie. Elle est sécrétée par les hépatocytes sous forme d'une molécule inactive, la prékallibréine, et circule dans le plasma sous forme d'un complexe hétérodimérique avec le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) (MANDLE *et al.*, 1976). La kallibréine plasmatique relâche la bradykinine (BK) à partir du KHPM par l'hydrolyse des liens peptidiques Lys-Arg et Arg-Ser, formant ainsi un nanopeptide ayant une arginine en N et C-terminales. Il est intéressant de noter que même si le kininogène de faible poids moléculaire (KFPM) est un substrat de faible affinité pour la kallibréine plasmatique, celle-ci formera de la BK à partir du KFPM en présence de l'élastase de neutrophile (SATO et NAGASAWA, 1988). L'élastase relâchée par le neutrophile est capable de cliver un fragment du KFPM et la kallibréine plasmatique relâche la BK à partir de ce fragment. Un tel mécanisme doit exister *in vivo* pour la génération de BK à partir du KFPM car ce précurseur a été localisé sur la membrane externe des neutrophiles (FIGUEROA *et al.*, 1992). La kallibréine plasmatique pourrait exercer un effet important sur les leucocytes polymorphonucléaires, cellules impliquées

dans la réponse inflammatoire, car KAPLAN *et al.*, (1972), ont rapporté que cet enzyme possède une activité chimiotactique pour les leucocytes polymorphonucléaires.

Les kallicroéines tissulaires appartiennent à une famille multigénique (SWIFT *et al.*, 1982) et sont principalement synthétisées au niveau du rein, du pancréas, de l'intestin, du cerveau ainsi que plusieurs glandes (salivaires, sudoripares, glandes sécrétoires nasales et glandes sous-muqueuses pulmonaires). Récemment, des kallicroéines tissulaires ont été identifiées chez le neutrophile humain (FIGUEROA *et al.*, 1989). L'utilisation de radioimmunoessais a révélé la présence de ces enzymes dans plusieurs fluides biologiques; tels la salive, l'urine, le plasma, les liquides bronchoalvéolaires de patients asthmatiques et les sécrétions nasales de patients atteints de rhinite allergique (BAUMGARTEN *et al.*, 1986; 1989; CHRISTIANSEN *et al.*, 1987). Ces enzymes sont relâchés sous forme active et clivent les liens peptidiques entre la Met-Lys et l'Arg-Ser du KFPM pour libérer le décapeptide Lysyl-bradykinine (kallidine, KD). Il existe un inhibiteur endogène des kallicroéines tissulaires: la kallistatine, exprimée principalement au niveau du foie (CHAO *et al.*, 1986). Cet inhibiteur endogène pourrait jouer un rôle dans la régulation du système kinine-kallicroéine dans l'inflammation car les taux d'ARN<sub>m</sub> de kallistatine sont significativement réduits suite à un état inflammatoire aigu (CHAO *et al.*, 1990), probablement pour permettre une bonne activité du système kinine-kallicroéine.

### 3.2 Kininogènes

Une fois synthétisées, les kallibréines vont cliver les précurseurs des kinines (kininogènes), afin que celles-ci puissent exercer ses fonctions biologiques. Les kininogènes sont des glycoprotéines synthétisées par les hépatocytes possédant une chaîne lourde en N-terminal et une chaîne légère en C-terminal. Les acides aminés codant pour les kinines sont situés entre les deux chaînes peptidiques reliées par un pont disulfure. Il existe deux types de kininogènes : les KHPM et les KFPM. Ils diffèrent au niveau de leur structure, de leur taille et de leur susceptibilité à être clivé par les kallibréines tissulaires ou plasmatiques. Rappelons que le KHPM est le substrat préférentiel pour la kallibréine plasmatique (forme la BK) tandis que le KFPM a une meilleure affinité pour la kallibréine tissulaire (forme la KD).

Chaque kininogène contient des domaines ayant des fonctions distinctes. Le KHPM possède six domaines (D1 à D6) tandis que le KFPM en possède cinq (D1 à D5). La chaîne lourde du KHPM contient les domaines D1 à D3 et la chaîne légère contient les domaines D5 et D6. Le domaine D5 est capable de lier le KHPM aux surfaces endothéliales endommagées chargées négativement. Le domaine D6 est un site de liaison spécifique et de haute affinité pour la prékallibréine plasmatique et le facteur de coagulation XII (facteur de Hageman) (SUGO *et al.*, 1980). Le KHPM est donc associé avec le facteur de Hageman et la prékallibréine plasmatique (KELLERMANN *et al.*, 1986). Des essais de liaison ont démontré la présence de récepteurs spécifiques pour le KHPM sur la membrane cellulaire des plaquettes (stimulées ou non), des cellules endothéliales et des neutrophiles humains (GRENNGARD et GRIFFIN, 1984;



SCHMAIER *et al.*, 1988; GUSTAFSON *et al.*, 1989). Le domaine D6 du KHPM sert de protéine d'ancrage pour la liaison de la prékallicréine plasmatique à la surface membranaire des neutrophiles. La présence de kallicréines et de kininogènes sur la membrane externe des neutrophiles permettent la formation de kinines à la surface de ces cellules, leur donnant ainsi une importance physiologique considérable.

### 3.3 Kininases

Les kallicréines ont donc pour rôle de libérer les kinines à partir de leurs précurseurs : le KHPM et le KFPM. Une fois libérées, les kinines sont rapidement inactivées par l'action enzymatique de peptidases que l'on nomme kininases. Il existe deux classes de kininases : kininases I et kininases II.

#### 3.3.1 Kininase II (ECA)

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA, kininase II) est un métalloenzyme hautement glycosylé dont le site actif possède un site de liaison pour les atomes de zinc (ERDŐS, 1979). La BK est clivée par l'ECA pour former le dipeptide Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup> et la BK<sub>1-5</sub> (figure 2). L'ECA peut également relâcher un tripeptide à partir de la desArg<sup>9</sup>-BK (INOKUCHI et NAGAMATSU, 1981). Cet enzyme est principalement localisé au niveau de l'endothélium vasculaire, lié à la membrane plasmique des cellules endothéliales, où il clive la BK circulante (IGIC *et al.*, 1972). Le poumon est un organe hautement vascularisé et est spécialement riche en ECA donc la BK circulante est principalement inactivée durant son passage dans la circulation pulmonaire. On retrouve aussi une forte activité de cet enzyme au niveau du cerveau, du petit intestin et du



placenta (SKIDGEL et ERDÖS, 1987; NAGAE *et al.*, 1993). Bien que l'ECA soit un enzyme fortement lié aux membranes plasmiques, il existe aussi sous forme soluble dans le plasma (ALHENC-GELAS *et al.*, 1983), l'urine, le liquide amniotique, le liquide céphalorachidien et les fluides pulmonaires. Comme la plupart de l'ECA soluble proviendraient des cellules endothéliales vasculaires, une inflammation pulmonaire peut affecter les taux circulants de l'ECA. La potentialisation des effets induits par la BK *in vivo* et *in vitro* par des inhibiteurs de l'ECA est due à l'augmentation du temps de demi-vie de ce peptide qui, en condition normale, est rapidement hydrolysé.

### 3.3.2 Endopeptidase neutre 24.11 (NEP)

L'endopeptidase neutre (NEP) est une métallopeptidase qui migre après sa synthèse vers la membrane plasmique et s'ancre à la surface externe des cellules pour ensuite être sécrétée dans les fluides biologiques. La NEP, comme l'ECA, relâche le dipeptide Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup> en C-terminal de la BK (Figure 2) (GAFFORD *et al.*, 1983). La NEP est largement distribuée, mais contrairement à l'ECA, son expression au niveau des cellules endothéliales vasculaires est faible. Par contre, les cellules épithéliales et les structures riches en microvillosités sont riches en NEP. La NEP est présente sur la membrane cellulaire des neutrophiles humains (CONNELLY *et al.*, 1985). Une action importante de la NEP est l'hydrolyse du N-fMLP, un peptide qui stimule le chimiotactisme. L'activation des neutrophiles déclenche l'internalisation de la NEP causant une perte rapide de son activité et cette perte d'activité aurait un effet important sur la migration des neutrophiles aux sites d'inflammation.

### 3.3.3 Kininase I (CPN, CPM)

La carboxypeptidase N (CPN) est un enzyme soluble ayant deux hétérodimères, chacun possédant une sous-unité catalytique et une sous-unité non-catalytique (LEVIN *et al.*, 1982). La CPN est synthétisée au niveau du foie et est relâchée immédiatement après sa synthèse dans la circulation. La CPN clive l'arginine en C-terminale de la BK ou de la KD, libérant ainsi la desArg<sup>9</sup>-BK (DBK) ou la Lys-desArg<sup>9</sup>-BK (LDBK), deux agonistes endogènes du récepteur B<sub>1</sub> (Figure 2). La carboxypeptidase M (CPM) possède une seule chaîne peptidique et est fortement liée à la membrane cellulaire. La CPM, comme la CPN, clive l'arginine en C-terminal de la BK et de la KD, formant elle aussi de la DBK et de la LDBK. Il existe des taux élevés de CPM dans les poumons, les reins, les fibroblastes et les cellules endothéliales pulmonaires (NAGAE *et al.*, 1993). La CPM aurait des fonctions importantes à jouer au niveau du poumon car on retrouve une forte activité de cet enzyme dans les fractions membranaires provenant de poumons de bovins, de cobayes, de chats, de chiens et d'humain (CHODIMELLA *et al.*, 1991; NAGAE *et al.*, 1993). Des études chez le cobaye révèlent qu'une enzyme de type CPM existe au niveau des voies aériennes de cobayes et son inhibition par le MGTA potentialise la réponse bronchoconstrictrice à la capsaïcine et à la stimulation du nerf vague (DESMAZES *et al.*, 1992). De plus, une étude a démontré que la CPM était absente au niveau des monocytes sanguins mais fortement exprimée après leur différenciation en macrophages (REHLI *et al.*, 1995). Cet enzyme existe aussi sous forme soluble dans plusieurs fluides biologiques tels l'urine, le liquide amniotique et les liquides bronchoalvéolaires (SKIDGEL *et al.*, 1988). Étant donné que la CPM est principalement localisée sur la membrane plasmique d'une grande variété de cellules et

de tissus, là où les récepteurs des kinines sont également localisés, cet enzyme peut réguler l'action locale des kinines. La CPM peut donc former de la DBK à l'extérieur de la circulation, par exemple au site d'inflammation, là où le récepteur B<sub>1</sub> peut être induit. Donc, la conversion de la BK/ KD en DBK/ LDBK par la CPM/CPN joue un rôle important dans les réponses inflammatoires médiées par le récepteur de type B<sub>1</sub> en régulant l'activité des kinines.

#### 3.3.4 Aminopeptidase P

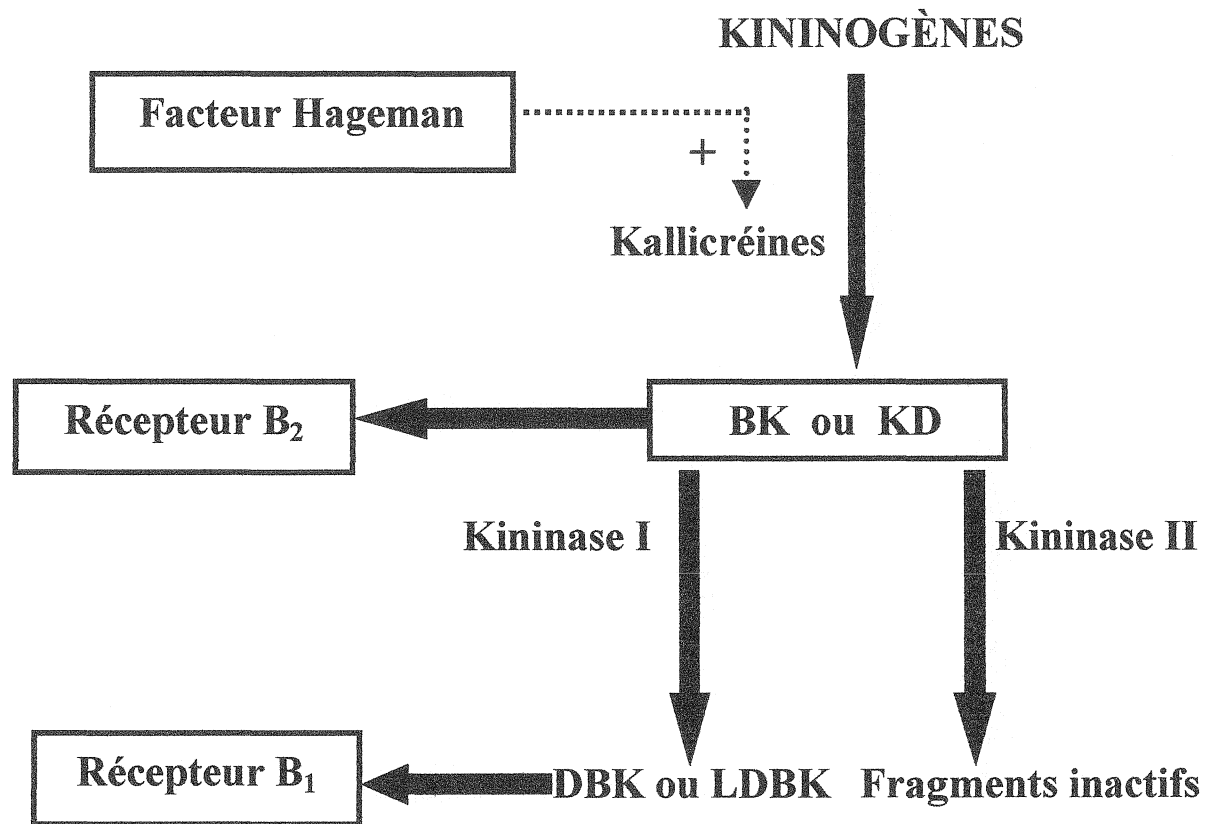
L'aminopeptidase P est une glycoprotéine membranaire capable d'inactiver la BK et la DBK en clivant la proline en position 2 (Figure 2). Les aminopeptidases peuvent aussi participer à la relâche de BK en clivant l'arginine en position 1 de la KD, bien que cette dernière puisse être directement inactivée par l'ECA, sans être préalablement convertie en BK. Au niveau du poumon, la forme liée à la membrane est localisée sur les cellules endothéliales vasculaires pulmonaires et a donc accès à la BK circulante.

#### 4. EFFETS BIOLOGIQUES DES KININES

Rappelons que les kinines sont les peptides bioactifs chargés positivement formés par l'action enzymatique des kalllicréines sur les kininogènes. Une fois relâchées dans les fluides biologiques, les kinines sont rapidement dégradées par l'action enzymatique des kininases (figure 3). Le temps de demi-vie de la BK est estimé à environ trente secondes (FERREIRA et VANE, 1967), ce qui laisse supposer que les kinines ont une action locale de type autocrine ou paracrine, d'où l'importance d'avoir une régulation locale de ses activités par les enzymes présents à la surface cellulaire. Chez l'homme, le taux circulant de kinines est principalement régulé par la CPN, mais sur les surfaces endothéliales, particulièrement au niveau du lit vasculaire pulmonaire, par l'ECA. Les kinines sont retrouvées dans le plasma, l'urine, les liquides du lavage bronchoalvéolaire, les fluides nasales et synoviales (SCICLI *et al.*, 1984 ; CHRISTIANSEN *et al.*, 1987).

La BK fut d'abord reconnue pour son effet vasodépresseur sur le système cardiovasculaire. Les récepteurs B<sub>1</sub> (RB<sub>1</sub>) et les récepteurs B<sub>2</sub> (RB<sub>2</sub>) sont présents sur l'endothélium vasculaire et le muscle lisse des gros vaisseaux sanguins et l'effet hypotenseur médié par la production de substances vasodilatatrices (NO, prostanoïdes) est le résultat de l'activation de ces deux types de récepteurs. Ces vasodilatateurs vont, par diffusion, relaxer la cellule musculaire lisse sous-jacente.

Figure 3 : Système kinine-kallicréine



ELLIOT *et al.* (1960) furent les premiers à avoir accès à la BK synthétique et ont démontré que ce peptide est capable de reproduire les signes cardinaux de l'inflammation lorsque injecté chez les animaux. En effet, l'injection de BK dans les tissus sains produit une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une augmentation de la perception de la douleur. La BK est donc un médiateur impliqué dans les changements de perméabilité vasculaire. La relaxation des artères et la constriction des veinules par les kinines augmentent la différence de pression à travers les capillaires et favorisent l'extravasation des protéines plasmatiques au niveau des veinules post-capillaires. Cette action contractile directe sur les cellules endothéliales permet d'augmenter la perméabilité des capillaires et explique le rôle de ce peptide dans la formation d'œdème. L'augmentation de perméabilité et l'œdème provoqué par les kinines résultent de l'activation du  $RB_2$ , bien que sous certaines conditions, le  $RB_1$  peut aussi être impliqué. Par exemple, l'injection de BK dans la patte de rat cause un œdème aigu et est médié par le  $RB_2$ . Cependant, un traitement systémique avec de faibles doses de LPS durant 24 heures, sensibilise la patte de rat à l'effet inflammatoire de la BK exogène, avec une diminution de la stimulation du  $RB_2$  (CAMPOS *et al.*, 1996). Il y a donc une induction du  $RB_1$  dans ce modèle d'inflammation chez le rat.

En condition inflammatoire, les kallibréines sont inactivées plus lentement que les kinines et la dégradation de ces peptides est réduite par la diminution du pH par les fluides oedémateux. La production de kinines peut donc être prolongée et ces peptides peuvent participer non seulement à la phase initiale mais aussi à la phase intermédiaire et finale du processus inflammatoire. Les kinines sont donc parmi les premiers agents à



être produits au site d'inflammation et jouent un rôle critique dans l'organisation et le maintien de la réponse inflammatoire.

La BK produit la douleur par une stimulation directe des fibres afférentes sensorielles de type C et A $\delta$ . Il existe deux types de fibres afférentes : somatiques (innerve la peau, jonction musculaire, muscle) et viscérales (innerve les tissus cardiovasculaires, tissus respiratoires, tractus gastro-intestinal, rein, système reproducteur). L'implication des fibres sensorielles dans l'inflammation est connue sous le nom d'inflammation neurogénique. L'activation directe des fibres sensorielles par la BK est fortement soutenue par les expériences *in vivo* impliquant l'injection intraartérielle (i.a.) de ce peptide. Cette voie d'administration évite les effets secondaires dus à la stimulation des autres tissus par la BK, mais induit une augmentation rapide de l'activité des fibres afférentes et initie les réflexes pseudo-moteur, ce qui indique une production de douleur. L'activation directe des nocicepteurs par la BK se fait via l'activation du récepteur de type B<sub>2</sub>. La BK peut aussi induire une sensibilisation indirecte des fibres en stimulant la relâche de cytokines (IL-1, TNF) (TIFFANY et BURCH, 1989), de médiateurs lipidiques (prostaglandines, leucotriènes) et de neuropeptides (SP, CGRP) dans une grande variété de tissus et peut devenir une source importante de DBK.

Des études faites chez les animaux suggèrent que les kinines exercent des effets directs et indirects au niveau des voies aériennes. En voici quelques-uns : 1) inflammation neurogénique via la stimulation des fibres sensorielles ; 2) dilatation artérielle, veinoconstriction et extravasation des protéines plasmatiques, menant à la formation d'œdème et à la congestion (KIMURA *et al.*, 1992) ; 3) contraction du

muscle lisse, contribuant à la bronchoconstriction (SCHMIDT *et al.*, 1996) ; 4) relâche de médiateurs inflammatoires comme les cytokines (HAYASHI *et al.*, 1998) et les métabolites de l'acide arachidonique (PANG et KNOX, 1997). Tous ces effets peuvent mener à une hypersécrétion de mucus, à la formation d'œdème, à la bronchoconstriction et à l'accumulation de leucocytes au niveau des voies aériennes, principales caractéristiques retrouvées dans l'asthme (BARNES, 1992).

En 1961, HERXHEIMER et STRESEMANN ont observé que l'inhalation de BK, sous forme d'aérosol, est un puissant bronchoconstricteur chez les patients asthmatiques mais est essentiellement inactif chez les sujets sains. La bronchoconstriction induite par la BK chez l'homme est inhibée par un antagoniste du récepteur muscarinique et n'est pas affectée par les inhibiteurs de la cycloxygénase ou les antagonistes du récepteurs H<sub>1</sub> (FULLER *et al.*, 1987), indiquant que l'effet est médié par le réflexe vagal et non par la relâche de prostaglandines ou d'histamine. Une autre étude démontre que la BK agit via un mécanisme neuronal car un antagoniste des récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> de la neurokinine, le FK 224, inhibe la bronchoconstriction induite par la BK chez les asthmatiques (ICHINOSE *et al.*, 1992). Donc, l'effet de la BK sur le calibre des voies aériennes chez les asthmatiques implique la stimulation des fibres sensorielles pulmonaires, lesquelles initient le réflexe de bronchoconstriction via la relâche d'acétylcholine et de tachykinines des fibres parasympathiques. Rappelons que la BK est un des stimulants les plus puissants des fibres afférentes de types C (GEPPETTI, 1993 ; DRAY et PERKINS, 1993). La relâche locale de tachykinine induite par la BK, en plus de provoquer le bronchospasme, peut contribuer à l'inflammation neurogénique des voies aériennes.

#### 4.1 Récepteurs des kinines

Regoli et coll. ont défini sur des bases exclusivement pharmacologiques, deux sous-types de récepteurs des kinines : le récepteur B<sub>1</sub> et le récepteur B<sub>2</sub> (DROUIN *et al.*, 1979). Trois critères pharmacologiques furent utilisés pour définir ces deux types de récepteurs : la comparaison de l'ordre de puissance des agonistes, l'estimation de l'affinité des antagonistes compétitifs et la classification par la désensibilisation (Tableau III). Le RB<sub>1</sub> est sensible aux métabolites des kinines dépourvus de l'arginine en C-terminale (DBK, LDBK) et le RB<sub>2</sub> est sensible à la BK et à la KD. Le RB<sub>1</sub> et le RB<sub>2</sub> sont membres de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G.

Bien que le RB<sub>1</sub> et le RB<sub>2</sub> coexiste dans le génome humain, l'homologie de séquence en acides aminés entre ces deux récepteurs est seulement de 36%. Les kinines sont capables d'activer plusieurs voies de signalisation suite à la liaison et l'activation de leurs récepteurs. Par exemple, l'activation directe de la phospholipase C (PLC) par la protéine G<sub>q</sub> entraîne la formation d'inositoltriphosphates et de diacylglycérol ce qui permet une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (SMITH *et al.*, 1995). Le Ca<sup>2+</sup> mobilisé peut activer la NOS, responsable de la production d'oxyde nitrique (NO). À son tour, le NO peut stimuler la guanylate cyclase soluble (GCs) et augmenter le GMP<sub>c</sub> intracellulaire (HERNANZ *et al.*, 1999). D'un autre côté, l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> induit la formation de prostaglandines et suite à l'activation de leurs récepteurs couplés à une protéine G<sub>s</sub>, les prostaglandines peuvent induire une augmentation d'AMP<sub>c</sub> (KENNEDY *et al.*, 1996). La BK pourrait également stimuler directement l'adénylate cyclase (AC) via une protéine G<sub>s</sub>, et ainsi augmenter les taux d'AMP<sub>c</sub> (LIEBMANN *et al.*, 1996). La production d'AMP<sub>c</sub> et de GMP<sub>c</sub> permet la phosphorylation de protéines cytoplasmiques ou membranaires et de certains enzymes clés, conduisant à l'effet biologique (figure 4).

Tableau III. Classification des sous-types de récepteurs des kinines : RB<sub>1</sub> et RB<sub>2</sub>

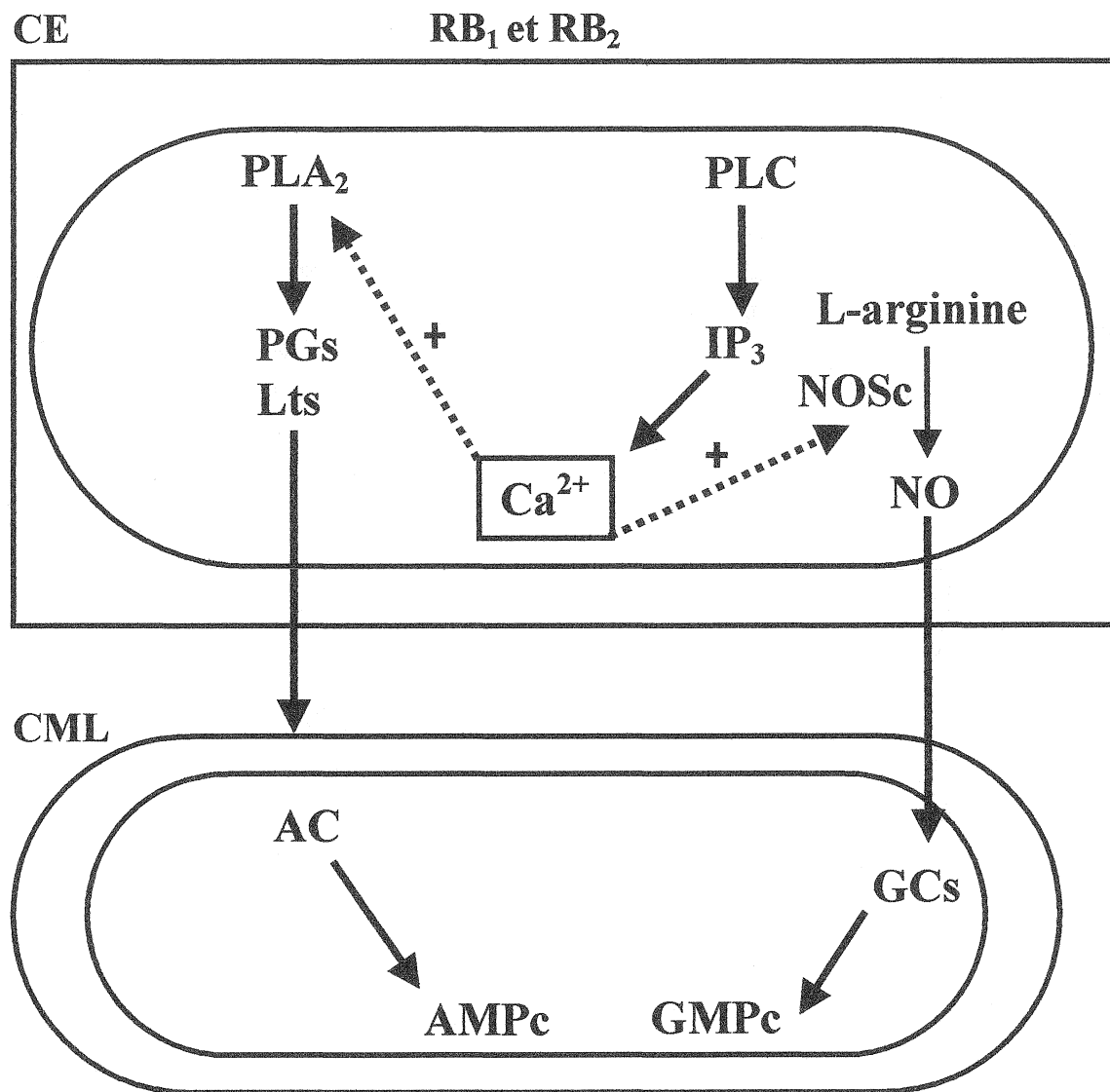
<b>CRITÈRES</b>	<b>RÉCEPTEUR B<sub>1</sub></b>	<b>RÉCEPTEUR B<sub>2</sub></b>
<b>1. Puissance des agonistes</b>	DBK > BK LDBK > KD	BK > DBK KD > LDBK
<b>2. Affinité des antagonistes</b>	[Leu <sup>8</sup> ]desArg <sup>9</sup> -BK Lys[Leu <sup>8</sup> ]desArg <sup>9</sup> -BK	HOE 140 FR 173657
<b>3. Séquence acides aminés</b>	RB <sub>1</sub> humain: 36% homologie avec RB <sub>2</sub>	RB <sub>2</sub> : hautement homologue avec souris, rat, lapin
<b>4. Seconds messagers</b>	PLC ↑ de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> soutenu	PLC ↑ de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> transitoire
<b>5. Type d'expression</b>	Absent des tissus normaux mais rapidement inductible	Préformé dans plusieurs types cellulaires (constitutif)

Les kinines stimulent la formation de NO au niveau de l'endothélium vasculaire, effet similaire décrit dans plusieurs autres types cellulaires, incluant les cellules épithéliales de l'arbre trachéobronchique, les neurones, les neutrophiles et les macrophages. Le mécanisme est incertain, mais il est possible que la relâche de l'arginine en C-terminale de la BK par la CPN/CPM près des cellules endothéliales ou des fentes synaptiques puisse fournir le substrat nécessaire à la formation du NO par la NOS.

Les populations de récepteurs ne sont pas des entités statiques et leur expression peut être affectée par des facteurs physiologiques. Le  $RB_1$  est particulièrement intéressant car il est induit lors de certaines conditions pathologiques. Ce récepteur est généralement absent des tissus sains mais rapidement inductible suite à une blessure ou un état inflammatoire. À l'inverse, le  $RB_2$  est préformé dans plusieurs types cellulaires et est considéré comme un récepteur de type constitutif. Cependant, il existe de nombreuses exceptions où le  $RB_1$  est exprimé de façon constitutive. Par exemple, le  $RB_1$  médie la réponse cardiovasculaire de la DBK chez les chiens et les chats sains, n'ayant aucune pathologie apparente (LORTIE *et al.*, 1992 ; NAKHOSTINE *et al.*, 1993). Une natriurèse et une vasodilatation rénale sont aussi des réponses observées chez les chiens normaux injectés avec de la DBK. Des tissus isolés de chien démontrent une réponse immédiate et stable à l'agoniste du  $RB_1$ . Un effet hémodynamique complexe est aussi produit par la DBK au niveau de la circulation pulmonaire des félins (DeWITT *et al.*, 1994). Une faible réponse hypertensive à la DBK a été observée *in vivo* chez le rat (MADEDDU *et al.*, 1997). De plus, chez le porc et le rat, des études suggèrent un effet hémodynamique de la DBK exogène (SIEBECK *et al.*, 1989). Des coupes d'estomac provenant de souris normales, exhibent une réponse contractile immédiate et constante

aux agonistes du  $RB_1$  (NSA ALLOGHO *et al.*, 1998). Aussi, le  $[Leu^8]desArg^9-BK$  diminue le taux de filtration glomérulaire et la concentration d'urine chez les rats normaux (FENOY et ROMAN, 1992). Donc, nous ne pouvons exclure la présence d'un  $RB_1$  de type constitutif chez certaines espèces.

Figure 4 : Voies de signalisation intracellulaires



Le récepteur B<sub>1</sub> (RB<sub>1</sub>) fut défini initialement comme étant le récepteur responsable de l'effet contractile de la DBK au niveau de l'aorte isolé de lapin (DROUIN *et al.*, 1979). L'induction de la réponse cardiovasculaire médiée par le RB<sub>1</sub> par un traitement au LPS chez les lapins et autres espèces comme le rat (TOKUMASU *et al.*, 1995) et le cochon (SIEBECK *et al.*, 1996), a largement été étudiée. Les lapins injectés avec une dose sub létale de LPS démontrent une réponse hypotensive dose-dépendante à l'injection intraartérielle de DBK (REGOLI *et al.*, 1981) ou de LDBK (DRAPEAU *et al.*, 1991) cinq heures après le traitement. À l'inverse, les animaux non traités au LPS ne répondent pas à la DBK ou la LDBK. Le prétraitement au LPS ne modifie pas la réponse hypotensive à la BK, médiée par le RB<sub>2</sub>. De plus, les aortes prélevées des lapins traités au LPS exhibent une réponse fonctionnelle aux agonistes du RB<sub>1</sub> dès la première heure d'incubation *in vitro*, suggérant l'induction *in vivo* du RB<sub>1</sub> avant le sacrifice des animaux. Le LPS provient des bactéries Gram négatives et est capable d'induire la synthèse de cytokines (IL-1) dans les leucocytes et autres types cellulaires. Les analyses immunologiques de l'induction du RB<sub>1</sub> *in vivo* et *in vitro*, indiquent que les cytokines inflammatoires jouent un rôle important dans l'activation de la transcription des gènes impliqués, avec un rôle prédominant pour l'IL-1. Les mécanismes par lesquels le RB<sub>1</sub> participe à la réponse inflammatoire sont uniques car ils sont induits en réponse à un dommage tissulaire, à une inflammation ou par les cytokines. La DBK est capable d'activer les RB<sub>1</sub> nouvellement exprimés suite à cet état inflammatoire. L'IL-1 est une des substances endogènes responsable de l'induction du RB<sub>1</sub> et donc un des médiateurs qui augmente les effets de la DBK dans l'inflammation (AHLUWALIA et PERRETTI, 1996).



Plusieurs inhibiteurs métaboliques affectent les contractions médiées par l'activation du  $RB_1$ . Par exemple ; la cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique), l'actinomycine D (inhibiteur de la synthèse d'ARN), la brefeldine A (inhibiteur de la translocation des protéines car elle bloque le transport des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi et bloque la sécrétion ou le transport vers la membrane des protéines ayant un peptide signal) et la tunicamycine (inhibiteur de la glycosylation). Donc, la synthèse de novo des  $RB_1$  suite à une blessure requiert l'activation transcriptionnelle de un ou de plusieurs gènes, l'expression d'ARN<sub>m</sub>, la traduction au niveau des ribosomes et le processing à travers le RE et l'appareil de Golgi pour avoir les sites de glycosylations. Toutes les composantes nécessaires à l'induction des  $RB_1$  sont présentes dans l'aorte isolée de lapin.

#### 4.2 Kinines et infiltration cellulaire

Les leucocytes sont des effecteurs inflammatoires et immunologiques de première importance possédant diverses fonctions. Des études de liaison démontrent que les voies aériennes de plusieurs espèces possèdent des  $RB_2$  mais ne possèdent pas de  $RB_1$  (FIELD *et al.*, 1992; TRIFILIEFF *et al.*, 1991). La distribution des  $RB_2$  au niveau du poumon de cobaye et humain, suggère que la BK exercerait une action directe sur les muscles lisses des voies aériennes périphériques et une action indirecte sur les voies aériennes centrales (proximales) (MAK et BARNES, 1991). Donc la plupart des effets biologiques des kinines au niveau pulmonaire semblent médiés par l'activation du  $RB_2$ . Aucun rôle n'a encore été attribué aux  $RB_1$  dans les maladies des voies aériennes. Cependant, récemment, le  $RB_1$  a été cloné par expression dans des fibroblastes pulmonaires humains (MENKE *et al.*, 1994), les cellules musculaires lisses de la

trachée (MARSH et HILL, 1994) peuvent aussi exprimer le  $RB_1$ . De plus, des observations *in vitro* suggèrent que le  $RB_1$  est exprimé sur les cellules phagocytaires et les lymphocytes. CARL *et al.* (1996) ont observé que les neutrophiles humains fraîchement isolés, répondent à la BK et la LDBK par une sécrétion d'élastase, effet médié par le  $RB_2$  et le  $RB_1$ , respectivement. La sécrétion de protéase induite par la LDBK est capable d'augmenter la perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales *in vitro*, et ce seulement en présence de neutrophiles. Le  $RB_1$  peut contribuer au recrutement de leucocytes *in vivo* via un mécanisme indirect. Par exemple, les leucocytes PMN sont recrutés dans un modèle d'"air-pouch" chez la souris traitée avec l'IL-1 $\beta$  et cette accumulation de leucocytes est inhibée par le [leu<sup>8</sup>desArg<sup>9</sup>]-BK et non par le HOE 140. À l'inverse, la DBK induit une migration de leucocytes chez les souris traitées avec IL-1 $\beta$  et l'effet de la DBK sur l'accumulation de leucocytes est aussi inhibé par des antagonistes de la SP et du CGRP, indiquant que la DBK stimule les fibres afférentes sensorielles afin de relâcher les neuropeptides responsables de la réponse chimiotactique (AHLUWALIA et PERRETTI, 1996). La DBK provoque une réponse inflammatoire, caractérisée par une augmentation de la perméabilité vasculaire et une infiltration importante de neutrophiles et de monocytes, lorsque administrée de façon intrathoracique dans un modèle de pleurisie chez la souris (VIANNA et CALIXTO, 1998). La réponse inflammatoire induite par la DBK dans ce modèle de pleurisie est médiée par un  $RB_1$  constitutif. FARMER *et al.* (1992) ont démontré que la [leu<sup>8</sup>desArg<sup>9</sup>]-BK est capable d'inhiber la neutrophilie pulmonaire induite par une sensibilisation des cobayes à l'ovalbumine. Toutes ces études mettent en évidence le rôle potentiel du  $RB_1$  dans le recrutement des leucocytes aux sites d'inflammation.

De plus, un site spécifique et réversible de liaison pour le KHPM a été démontré chez les neutrophiles humains par GUSTAFSON *et al.* (1989) et en 1992, FIGUEROA *et al.* a démontré que le KHPM et le KFPM se retrouvent strictement au niveau de la membrane cellulaire des neutrophiles, absent des granules intracellulaires. HENDERSON *et al.* (1992) a démontré la présence de la kallicréine plasmatique sur la membrane externe des neutrophiles et la kallicréine tissulaire a été identifiée chez le neutrophile humain et dans la moelle osseuse, spécifiquement chez le neutrophile mature et immature (BHOOLA *et al.*, 1992). Les neutrophiles ont des récepteurs capables de capter le complexe KHPM-prékallicréine. Donc, la protéolyse des KHPM et des KFPM à la surface membranaire des neutrophiles par les kallicréines activées, permet la formation des kinines à la surface du neutrophile, lesquelles stimulent la diapédèse locale des neutrophiles et l'extravasation des constituants plasmatiques en ouvrant la jonction entre les cellules endothéliales. L'attachement du KHPM, de la prékallicréine plasmatique et du KFPM à la surface membranaire des neutrophiles, permet d'impliquer les kinines dans la diapédèse des neutrophiles et leur participation dans les processus inflammatoires. L'IL-1 permettrait aux cellules endothéliales de devenir hyperadhésive pour les neutrophiles et les monocytes. Comme les kinines relâchent de l'IL-1 des monocytes, elles pourraient contribuer indirectement à leur adhérence.

#### 4.3 Génération des kinines dans l'asthme

Des taux élevés de kinines sont détectés dans le plasma des asthmatiques et il y a une corrélation entre les taux circulants de kinines et la sévérité des symptômes (ABE *et al.*, 1967 ; CHRISTIANSEN *et al.*, 1987). L'activité des kallicréines tissulaires est

augmentée dans le LBA des sujets asthmatiques après un challenge avec l'allergène. AVERILL *et al.* (1992), ont rapporté que les taux de BK, de PGE<sub>2</sub>, de PGF<sub>2α</sub> et les produits des éosinophiles augmentent dans le LBA des sujets asthmatiques. Ils suggèrent que la relâche de prostaglandines par les plaquettes activées jouerait un rôle important dans l'obstruction des voies aériennes, et la BK endogène permettrait la relâche de prostaglandines par les cellules endothéliales, lesquelles activeraient les plaquettes. Ces données obtenues chez l'homme fournissent certaines évidences: la production de kinines se produit autant dans la phase aiguë d'une crise d'asthme que durant l'aspect inflammatoire prolongé de la maladie. Ceci, avec les études faites chez les animaux, démontrent que le système kinine-kallicréine est impliqué dans la pathogénèse de l'asthme car les enzymes et les substrats nécessaires à la formation des kinines sont disponibles dans l'arbre trachéobronchique.

#### 4.4 Antagoniste des récepteurs des kinines dans divers modèles animaux d'asthme

Chez les moutons ayant une hypersensibilité à *Ascaris suum*, l'inhalation d'extraits de ce nématode produit une bronchoconstriction sévère associée avec une augmentation de l'hyperréactivité bronchique (HRB) et une infiltration des voies aériennes par des éosinophiles et des neutrophiles (ABRAHAM *et al.*, 1991). Le prétraitement de ces animaux avec l'antagoniste du RB<sub>2</sub>, NPC 567, abolit cette HRB et réduit l'inflammation des voies aériennes (SOLER *et al.*, 1990). L'inhalation de l'antigène augmente aussi les taux de BK, prostaglandine E<sub>2</sub>, de thromboxanes, de leucotriènes B<sub>4</sub> et D<sub>4</sub> dans le lavage bronchoalvéolaire. Le NPC 567 diminue la quantité des médiateurs inflammatoires et diminue la sévérité de l'infiltration des voies aériennes par les

granulocytes (ABRAHAM *et al.*, 1991). Donc, la production pulmonaire de kinines chez le mouton allergique, stimule la synthèse et la relâche d'écosanoïdes, qui à leur tour, contribuent à la genèse de l'inflammation des voies aériennes et de l'HRB.

Chez le cobaye conscient, l'inhalation de BK cause une bronchoconstriction dose-dépendante chez les animaux prétraités avec des inhibiteurs de la dégradation de la BK. Similaire aux observations faites chez les sujets asthmatiques, la bronchoconstriction induite par la BK chez le cobaye est inhibée par l'atropine mais non par l'indométacine. Le cobaye exposé plusieurs fois à l'antigène démontre une HRB à l'acétylcholine et une infiltration pulmonaire d'éosinophiles (ISHIDA *et al.*, 1989). Le "challenge" avec l'antigène augmente l'activité des kallibréines pulmonaires et les taux circulants de kinines chez le cobaye (JONASSON et BECKER, 1966). Après un "challenge" intratrachéale de l'allergène, l'activité des kallibréines est augmentée pour une période de six heures dans le lavage bronchoalvéolaire, et cela peut être relié à la bronchoconstriction soutenue chez cet animal (FEATHERSTONE *et al.*, 1996). L'inhalation d'antagoniste du  $RB_2$  chez les cobayes sensibilisés, prévient l'HRB et diminue dramatiquement l'éosinophilie (FARMER *et al.*, 1992). L'habileté des antagonistes des kinines à inhiber l'HRB et l'éosinophilie, indique un rôle important des kinines endogènes dans ce modèle. De plus, l'inhibition de l'infiltration des éosinophiles par les antagonistes du  $RB_2$  et l'inhibition de la neutrophilie par l'antagoniste du  $RB_1$ , suggèrent que les kinines auraient une fonction importante dans le maintien de l'inflammation allergique dans les voies aériennes de cobayes. De plus, l'extravasation des protéines plasmatiques dans les voies aériennes suite à une sensibilisation des cobayes, est diminuée par le HOE 140 et le CP 96 345 (antagoniste

du récepteur de la substance P) (BERTRAND *et al.*, 1993). Le HOE 140 et le CP 96 345 inhibent aussi l'augmentation de perméabilité vasculaire pulmonaire induite par l'inhalation de BK, qui à son tour, stimule les fibres sensorielles à relâcher la SP. D'autres ont démontré que l'augmentation de perméabilité vasculaire induite par la BK est inhibée par un antagoniste du récepteur  $NK_1$  (SAKAMOTO *et al.*, 1993). L'extravasation plasmatique induite par l'antigène est médiée par la BK endogène qui agit soit directement ou via la relâche de médiateurs, causant ainsi une inflammation neurogéniques (GEPPETTI, 1993). La bronchoconstriction induite par l'inhalation de BK est médiée presque entièrement par des mécanismes neuronaux impliquant les neuropeptides sensorielles et la relâche d'acétylcholine des fibres parasympathiques chez le cobaye.

#### 4.5 Modèle d'inflammation pulmonaire

Il existe donc divers modèles animaux d'asthme expérimental ; chacun de ces modèles expérimentaux est unique par son propre protocole de sensibilisation. Dans cette étude, nous avons choisi comme modèle animal le cobaye injecté aux billes de Sephadex G-50 car nous avons récemment démontré que cette injection induit rapidement un recrutement important d'éosinophiles et de neutrophiles dans les poumons (MAGHNI *et al.*, 1993). De plus, les expériences réalisées *ex vivo* sur la réactivité des voies aériennes indiquent que cette injection induit une HRB chez cet animal (NOGUEIRA de FRANCISCHI *et al.*, 1993). Nos résultats préliminaires suggèrent aussi que l'injection intraveineuse des billes de Sephadex chez le cobaye induit une augmentation de l'extravasation plasmatique au niveau pulmonaire. Toutes ces caractéristiques sont retrouvées dans l'asthme.

Les objectifs de la première partie de l'étude sont de déterminer:

- Si les  $RB_1$  et les  $RB_2$  des kinines sont impliqués dans l'infiltration cellulaire pulmonaire induite par l'injection intraveineuse de billes de Sephadex chez le cobaye
- Si les éosinophiles présents dans les liquides du LBA sont activés et l'effet des antagonistes sur leur état d'activation.

Les objectifs de la deuxième partie de l'étude sont de déterminer :

- Si les agonistes des  $RB_1$  et des  $RB_2$  sont capables d'induire une réponse inflammatoire chez le cobaye caractérisée par :
  - une infiltration cellulaire pulmonaire
  - une augmentation de la perméabilité bronchoalvéolaire
  - une vasodilatation
  - une hyperréactivité bronchique
- Si l'oxyde nitrique et les métabolites de l'acide arachidonique sont des seconds messagers impliqués dans l'infiltration cellulaire induite par l'agoniste du  $RB_1$

Les objectifs de la troisième partie de l'étude sont de déterminer :

- Si le  $RB_1$  est présent sur le muscle lisse de la trachée, des bronches supérieures et inférieures de cobayes témoins.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 5 MODÈLE D'INFLAMMATION PULMONAIRE

#### 5.1 Injection des billes de Sephadex G-50

WALLS et BEESON (1972) furent les premiers à décrire l'induction d'une inflammation pulmonaire suite à l'injection de billes de Sephadex chez le rat. Un modèle d'inflammation pulmonaire a été développé chez le cobaye dans notre laboratoire par MAGHNI *et al.*, (1993). Des cobayes Dunkin Hartley (250-300 g; Charles River, St-Constant, PQ, Canada) sont injectés avec des billes de Sephadex (Superfine; Pharmacia, Uppsala, Suède) mises en suspension dans de la saline stérile (40 mg/ml) immédiatement avant l'injection. Les billes de Sephadex G-50 (200  $\mu$ l, 24 mg Kg<sup>-1</sup>) sont injectées chez le cobaye conscient via une veine de l'oreille (anesthésie locale avec une solution de Xylocaine 2%). La dose de Sephadex (24 mg Kg<sup>-1</sup>) est la dose maximale non-létale pouvant être injectée chez le cobaye conscient (MAGHNI *et al.*, 1996). De plus, à cette dose, l'infiltration d'éosinophiles, de neutrophiles et de macrophages au niveau du poumon de cobaye est maximale.

#### 5.2 Lavage bronchoalvéolaire

Suite à l'injection des billes de Sephadex ou à l'injection de saline dans le cas des cobayes témoins, le nombre de cellules inflammatoires retrouvées au niveau du poumon de cobaye est mesuré dans le liquide du lavage bronchoalvéolaire (LBA). Brièvement, après le sacrifice de l'animal par dislocation cervicale et exsanguination par la coupure



de la veine cave inférieure, la trachée est canulée avec un cathéter joint à deux seringues (60 ml) par une valve à trois voies. Un tampon phosphate salin, préalablement réchauffé à 37°C, est introduit dans la lumière pulmonaire par aliquots de 10 ml (pour un volume total de 50 ml) et réaspiré avec la seconde seringue après un léger massage des poumons. Les dix premiers ml sont récupérés et centrifugés (360 g, 10 min., 20°C) et le surnageant est échantillonné en aliquots de 1 ml. Les aliquots sont conservés à -80°C pour des dosages biochimiques ultérieurs. Les cellules récupérées dans le reste du LBA sont ensuite centrifugées (360 g, 10 min., 20°C) et resuspendues avec les cellules récupérées lors de la première centrifugation dans 10 ml de tampon phosphate salin.

#### 5.2.1 Populations cellulaires totales récoltées dans les liquides du LBA

Les cellules inflammatoires pulmonaires récoltées dans le LBA des cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex sont comptées à l'aide d'un hématimètre selon l'équation suivante :

$$N = 3000 \times C \times V_s$$

Où **N** : nombre de cellules totales récoltées dans le LBA.

**3000** : facteur constant tenant compte de la dimension des chambres de l'hématimètre, du volume de la suspension cellulaire (100 µl) et du volume de la solution de bleu de Trypan (20 µl)

**C** : nombre de cellules comptées dans les quatre chambres de l'hématimètre

**V<sub>s</sub>** : volume total de la suspension cellulaire

### 5.2.2 Décompte différentiel des cellules du lavage bronchoalvéolaire

Les différents types cellulaires retrouvés dans le LBA (macrophages, éosinophiles et neutrophiles) sont identifiés sur des préparations cytologiques (cytospin) par coloration au Wright. Brièvement, les lames de cytospins sont incubées 3 minutes avec le colorant de Wright et lavées délicatement avec de l'eau distillée.

## 6. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL POUR LES EXPÉRIENCES *IN VIVO*

### 6.1 Première partie de l'étude: antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>

#### 6.1.1 Infusion intraveineuse des antagonistes

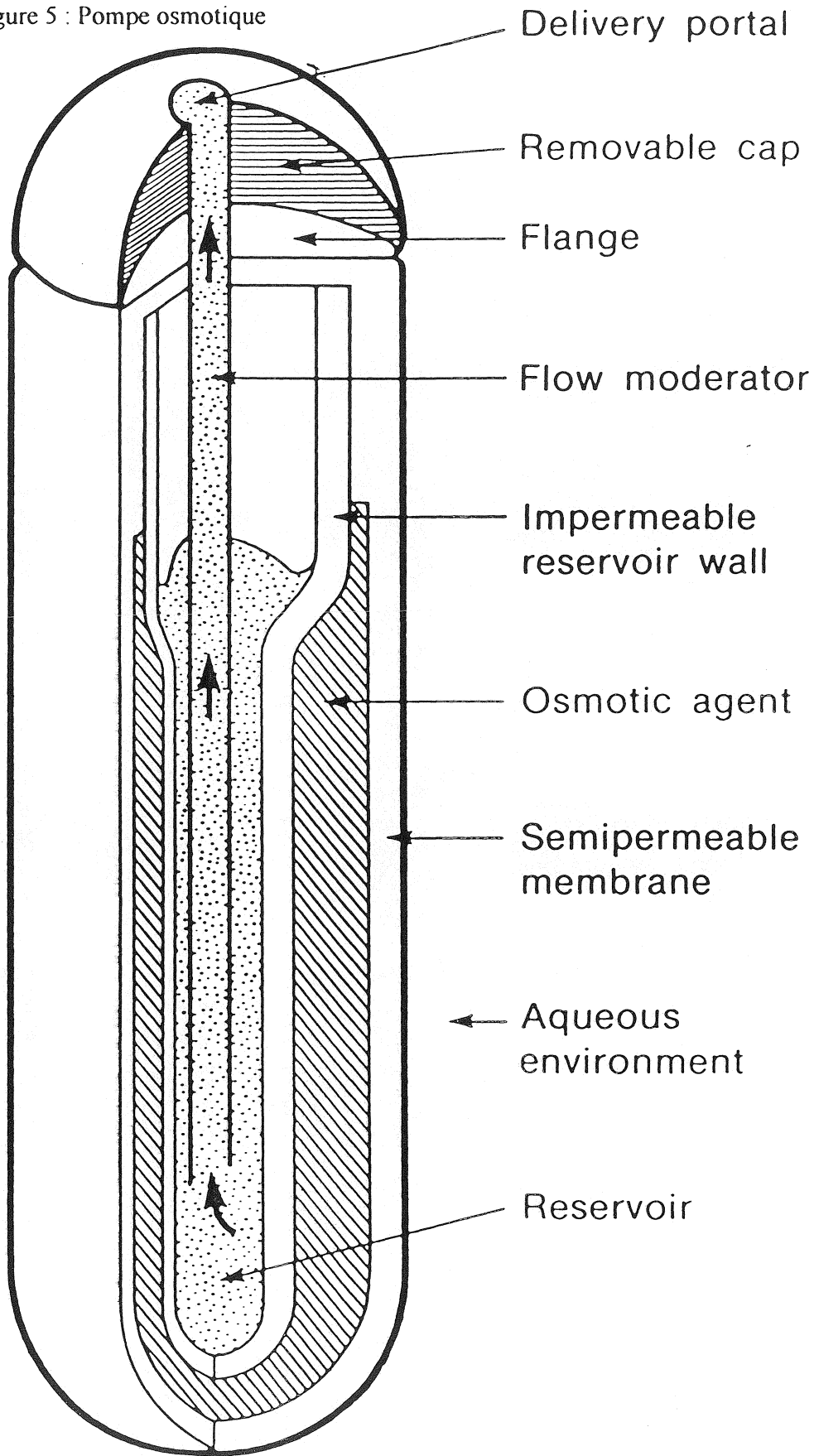
Nous avons utilisé les pompes osmotiques ALZET (ALZET Osmotic Pumps, modèle 2001 D, ALZA Corporation, Californie) pour l'infusion intraveineuse de l'antagoniste du récepteur B<sub>1</sub> ([Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK ; 40 mg Kg<sup>-1</sup>/24 h) et de l'antagoniste du récepteur B<sub>2</sub> (HOE 140 ; 4 mg Kg<sup>-1</sup>/24 h) des kinines. La pompe osmotique possède trois couches concentriques : 1) le réservoir contenant l'antagoniste en solution ; 2) la pochette osmotique contenant l'agent osmotique et 3) la membrane semi-perméable contrôlant le débit (Figure 5). Nous avons utilisé le modèle 2001 D (pompe osmotique de 3 cm ayant un volume total de 200 µl et un taux de pompage de 8µl/h pour une période de 24 h). Le réservoir est situé au centre de la pompe et ses parois sont imperméables. La pochette osmotique est située à l'extérieur des parois imperméables du réservoir et renferme une forte concentration de chlorure de sodium (agent osmotique). La différence de pression osmotique entre la pochette et l'environnement aqueux au site d'implantation dirige la

vitesse de distribution de l'antagoniste. Le taux de distribution de la pompe (8 $\mu$ l/h) est donc indépendant de la nature de l'antagoniste contenu dans le réservoir. Dans cette série d'expériences, le réservoir des pompes osmotiques est rempli avec le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK ou le HOE 140 solubilisé dans 200  $\mu$ l de saline stérile. Pour les cobayes témoins, le réservoir des pompes est rempli avec de la saline stérile seulement. Après une période d'équilibration de 4 h à 37°C, les pompes sont implantées au niveau dorsal des cobayes anesthésiés avec une injection intramusculaire de kétamine/xylozine (rapport poids/volume 1:1). Chaque pompe est reliée à un cathéter (PE 60) qui, après implantation de la pompe, est canulé directement dans la veine jugulaire pour permettre l'infusion intraveineuse des antagonistes à un taux de 8  $\mu$ l/h et ce durant 24 h. Les pompes remplies de saline stérile sont implantées aux cobayes témoins, i.e. ayant reçu 200  $\mu$ l de saline via une veine de l'oreille, tandis que les pompes remplies avec les antagonistes, sont implantées chez les cobayes injectés avec les billes de Sephadex. L'injection de Sephadex ou de saline dans la veine de l'oreille se fait après l'implantation des pompes osmotiques, chez le cobaye conscient.

#### 6.1.2 Injection intrapéritonéale des antagonistes

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons injecté de façon intrapéritonéale un antagoniste du récepteur B<sub>1</sub> (B 9858, 1 mg Kg<sup>-1</sup>) et un antagoniste non-sélectif des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> (B 9430, 1 mg Kg<sup>-1</sup>) des kinines. Les antagonistes sont injectés une heure après l'injection intraveineuse des billes de Sephadex chez le cobaye conscient. Les antagonistes sont solubilisés dans de la saline stérile et sont injectés dans un volume final de 700  $\mu$ l.

Figure 5 : Pompe osmotique



## 6.2 Dosage colorimétrique de l'EPO

L'activation des éosinophiles est déterminée par la mesure de l'activité EPO (éosinophile peroxydase) retrouvée dans les échantillons du liquide du LBA (50  $\mu$ l) par un essai colorimétrique. L'activité EPO est mesurée par l'utilisation du o-phenylènediamine dihydrochlorure (OPD; un substrat non hydrolysé par la myéloperoxidase) comme substrat de la EPO tel que décrit par STRATH *et al.* (1985). Brièvement, la solution de substrat (75  $\mu$ l) est un mélange de 0.1 mM d'OPD (Sigma Chemicals Inc., St-Louis, MO) dissout dans 0.05 mM Tris-HCL avec 0.1 % de Triton X-100 et 1 mM de peroxyde d'hydrogène (Sigma Chemicals Inc., St-Louis, MO). La solution de substrat est mise en présence du liquide du LBA (50  $\mu$ l) durant 15 min à 20 °C. La réaction est arrêtée par l'addition de 50  $\mu$ l d'une solution d'acide sulfurique 4 M. L'activité EPO contenue dans les échantillons du LBA est mesurée par spectrophotométrie (longueur d'onde  $\lambda = 595$  nm). Le blanc de l'essai correspond à 50 $\mu$ l de tampon phosphate salin soumis aux même étapes décrites pour les échantillons du LBA.

## 6.3 Deuxième partie de l'étude : Induction d'une réponse inflammatoire

### 6.3.1 Injection intratrachéale des agonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>

Les cobayes sont anesthésiés avec une injection intramusculaire de Kétamine/Xylazine (rapport poids/volume 1 :1). Les poils du cou sont rasés et la région est désinfectée avec de la Stanhexidine. Une incision est alors faite au niveau du cou pour permettre le dégagement de la trachée. L'injection de l'agent pharmacologique se

fait par l'introduction d'une aiguille 26G, reliée à une seringue de 1cc, directement dans la trachée. Au moment de l'injection, l'animal est tenu en position verticale pour permettre une bonne distribution de l'agoniste dans les poumons (100 µl au total).

Les agents pharmacologiques utilisés pour cette série d'expériences sont les suivants: un agoniste du récepteur B<sub>1</sub> (desArg<sup>9</sup>-BK, 10 µg Kg<sup>-1</sup>), un agoniste du récepteur B<sub>2</sub> (bradykinine, 1 µg Kg<sup>-1</sup>), un antagoniste du récepteur B<sub>1</sub> ([Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK; 10 et 100 µg Kg<sup>-1</sup>) et un antagoniste du récepteur B<sub>2</sub> (HOE 140; 1 et 10 µg Kg<sup>-1</sup>). Tous les agents pharmacologiques utilisés sont solubilisés dans de la saline stérile. L'injection des agonistes et/ou des antagonistes se fait dans un volume final d'injection de 100 µl. Par contre, lorsque l'antagoniste est utilisé de façon concomitante avec l'agoniste, les cobayes reçoivent l'antagoniste (50 µl) dix minutes avant l'injection de l'agoniste (50 µl), pour une injection totale de 100 µl. Les cobayes témoins reçoivent une injection intratrachéale de 100µl de saline. Les LBA sont effectués 3 h après l'injection intratrachéale de la bradykinine et 1, 3, 6 et 24 h après l'injection intratrachéale de la desArg<sup>9</sup>-BK.

### 6.3.2 Injection intraveineuse de l'inhibiteur de la NOS

Un groupe de cobayes est préalablement traité avec un inhibiteur de la NOS (nitric oxyde synthase), le L-NAME, une demi-heure avant l'injection intratrachéale de la desArg<sup>9</sup>-BK (10 µg Kg<sup>-1</sup>). Pour ce faire, le cobaye conscient reçoit une injection intraveineuse de L-NAME (200 µl; 10 mg Kg<sup>-1</sup>) via une veine de l'oreille. Les LBA sont effectués 5 h après l'instillation intratrachéale de la desArg<sup>9</sup>-BK. Les cobayes

témoins, i.e. ayant reçu une instillation intratrachéale de 100  $\mu$ l de saline, sont prétraités avec le L-NAME afin de vérifier l'effet de l'inhibiteur seul. Le L-NAME est solubilisé dans de la saline stérile.

### 6.3.3 Injection intrapéritonéale de l'inhibiteur de la COX

Un autre groupe de cobayes est préalablement traité avec un inhibiteur de la cyclooxygénase (COX), l'indométacine, une heure avant l'injection intratrachéale de la desArg<sup>9</sup>-BK (10  $\mu$ g Kg<sup>-1</sup>). Pour ce faire, le cobaye conscient reçoit une injection intrapéritonéale d'indométacine (600  $\mu$ l; 5 mg Kg<sup>-1</sup>). Les LBA sont effectués 5 h après l'instillation intratrachéale de la desArg<sup>9</sup>-BK. L'indométacine est dissoute dans un volume minimal d'éthanol et dilué à la concentration voulue avec de l'eau nanopure contenant 10% de bicarbonate. Les cobayes injectés avec la desArg<sup>9</sup>-BK reçoivent 700  $\mu$ l du véhicule (éthanol/bicarbonate) de façon intrapéritonéale, pour s'assurer que le véhicule n'exerce aucun effet. Les cobayes témoins, i.e. ayant reçu une instillation intratrachéale de 100  $\mu$ l de saline, sont traités avec l'indométacine afin de vérifier l'effet de l'inhibiteur seul.

### 6.4 Dosage biochimique de l'albumine

La perméabilité bronchoalvéolaire est déterminée en mesurant, par spectrophotométrie d'absorption, la quantité d'albumine contenue dans les échantillons du LBA des cobayes témoins, injectés avec la desAg<sup>9</sup>-BK et injectés avec la bradykinine. La mesure de l'albumine contenue dans ces échantillons est basée sur la

méthode du vert de bromocrésol décrite par DOUMAS *et al.* (1971). Cette méthode est sélective pour l'albumine, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de réactivité croisée avec la  $\gamma$  globuline ou autres protéines. Brièvement, le liquide du LBA (80  $\mu$ l) est incubé avec 120  $\mu$ l du réactif de vert de bromocrésol (composition : 1 volume d'une solution mère de vert de bromocrésol (0.6 mM) dilué dans 3 volumes d'un tampon de succinate de sodium (0.1 M; pH 4.0) additionné de 4 ml d'une solution à 30 % de Brij-35 par litre de réactif) pendant 10 minutes à 20 °C (incubation directe dans la plaque). L'albumine contenue dans les échantillons du LBA est mesurée par spectrophotométrie (longueur d'onde  $\lambda = 595$  nm) et quantifiée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée avec diverses concentrations d'albumine (0.05 à 0.5 mg/ml) dans les mêmes conditions décrites ci-dessus. Le blanc de l'essai correspond à 80 $\mu$ l de tampon phosphate salin soumis aux même étapes décrites pour les échantillons du LBA.

#### 6.5 Mesure de la pression sanguine et de la pression d'insufflation pulmonaire

Les cobayes sont anesthésiés avec une solution de kétamine/xylazine (rapport poids/volume 1 :1) pour permettre l'isolation et la canulation des deux artères carotides. La canule (PE-60) reliée à une des deux artères carotides est ensuite connectée à un transducteur de pression Statham Gould (modèle P23 ID) pour les injections intraartérielles. La canule reliée à l'autre artère carotide est aussi connectée à un transducteur de pression du même type pour permettre le suivi de la pression artérielle. Une troisième canule est implantée dans la trachée et est reliée à un ventilateur mécanique Harvard Apparatus (modèle 687) pour la ventilation mécanique du cobaye et l'enregistrement de la pression d'insufflation pulmonaire. Les cobayes sont ventilés à



une fréquence de 60 respirations par minute et à un volume forcé de  $10 \text{ ml Kg}^{-1}$ . Après la période de stabilisation de 15 minutes, les agonistes sont administrés de façon intraartérielle et la pression d'insufflation pulmonaire (PIP) et la pression artérielle sont enregistrées sur un physiographe Grass (modèle 7D). Un temps d'attente de 10 minutes est respecté entre chaque dose d'agoniste.

## 7. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL POUR LES EXPÉRIENCES *IN VITRO*

### 7.1 Préparation des tissus : trachée, bronches supérieures et inférieures

Des cobayes sont sacrifiés par dislocation cervicale et exsanguinés suite à la coupure de la veine cave inférieure. Le système cardio-pulmonaire est ensuite prélevé délicatement afin d'éviter les dommages tissulaires. Le cœur est disséqué afin de libérer l'arbre trachéobronchique et les lobes pulmonaires. Le système pulmonaire est alors immédiatement plongé dans une solution physiologique de Krebs. Les tissus adipeux et conjonctifs sont ensuite enlevés afin de mieux visualiser la trachée et les bronches. La trachée, les bronches supérieures et inférieures du lobe de parenchyme pulmonaire droit sont isolés et nettoyés de tout tissu conjonctif et adipeux restant. Les trois tissus sont ensuite taillés en spirale à 45 degrés et installés dans les bains à organes isolés.

### 7.2 Système de bains classiques

Le système de bains classiques utilisés est constitué de 6 bains à organes isolés montés en parallèle et ayant des doubles parois entre lesquelles circule de l'eau maintenue à  $37^{\circ}\text{C}$ , permettant ainsi de maintenir les tissus le plus près possible de la

physiologie normale. Chaque bain est rempli avec 5 ml d'une solution physiologique de Krebs oxygénée avec un mélange d'oxygène et de gaz carbonique (95% : 5%) et ayant la composition (mM) suivante : NaCl, 118.07; KCl, 4.7; MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 1.18; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18; glucose, 11.1; NaHCO<sub>3</sub>, 25; CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O, 2.51. Chaque bain est oxygéné de façon indépendante. Les tissus montés dans les bains sont reliés à des transducteurs de force Grass (modèle FT09C) qui transforment le mouvement mécanique du tissu en courant électrique permettant ainsi l'enregistrement des contractions isométriques induites par les divers agonistes. La réponse contractile est amplifiée et enregistrée par un physiographe de marque Grass (modèle 7D). Une période d'équilibration de 60 minutes avec une tension initiale des tissus de 2 grammes est effectuée à chaque début d'expérience. Des lavages des tissus sont effectués aux 15 minutes durant cette période. Une fois l'équilibration terminée, la réactivité des tissus est évaluée par l'injection d'une substance référence, le carbachol (4 µM). Un tissu qui ne répond pas adéquatement au carbachol est immédiatement rejeté de l'expérience. Les agonistes ou les antagonistes sont injectés directement dans les bains et lorsque le plateau de contraction est atteint, le tissu est lavé avec la solution physiologique de Krebs.

## 8. STATISTIQUES

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyennes plus ou moins l'erreur-type (SEM). La significativité statistique des résultats est évaluée par le test T de Student. Lorsque la probabilité est inférieure à 0.05 ( $P < 0.05$ ) le résultat est considéré significativement différent. \* :  $P < 0.05$  ; \*\* :  $P < 0.01$  ; \*\*\* :  $P < 0.001$

## RÉSULTATS

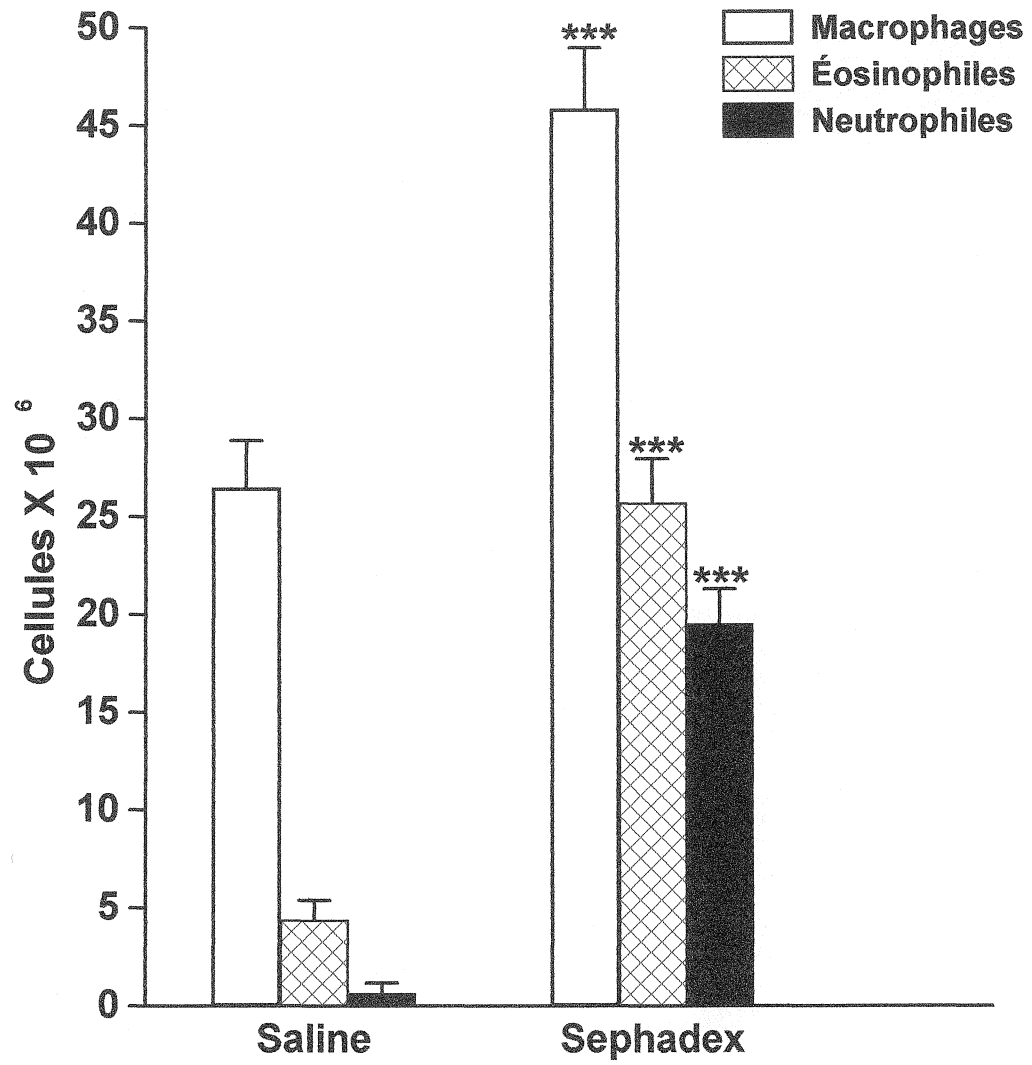
### 9. PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDES *IN VIVO*

#### 9.1 Induction de l'influx de cellules inflammatoires par l'injection de billes de Sephadex

En premier lieu, nous avons comparé l'influx cellulaire pulmonaire des cobayes injectés avec les billes de Sephadex aux cobayes témoins (injectés avec de la saline) (Figure 6). L'injection intraveineuse de saline via une veine de l'oreille n'a aucun effet sur le nombre de chacune des populations cellulaires retrouvées dans le LBA (macrophages, éosinophiles et neutrophiles), comparé aux animaux n'ayant pas reçu de saline (résultats non montrés).

Nous observons une augmentation de 2.9 fois (de 31.45 à 91.02 x 10<sup>6</sup> cellules) dans le nombre de cellules totales récoltées dans les liquides du LBA, 24 h après l'injection des billes de Sephadex G-50 (24 mg Kg<sup>-1</sup>) en comparaison des animaux témoins. Les décomptes différentiels démontrent une augmentation du nombre de macrophages (de 26.45 à 45.82 x 10<sup>6</sup> cellules), d'éosinophiles (4.36 à 25.69 x 10<sup>6</sup> cellules) et de neutrophiles (de 0.64 à 19.51 x 10<sup>6</sup> cellules) de 1.7, 5.9 et 30.5 fois, respectivement, 24 h après l'injection des billes de Sephadex (figure 6). Le liquide du LBA des cobayes témoins contient 16% de leucocytes polymorphonucléaires (2% de neutrophiles et 14% d'éosinophiles) et 84% de leucocytes mononucléaires (macrophages) comparé à 49% (21% de neutrophiles et 28% d'éosinophiles) et 51%, respectivement, dans les liquides du LBA des cobayes injectés avec les billes de Sephadex.

Figure 6 : Macrophages (colonnes vides), éosinophiles (colonnes hachurées en x) et neutrophiles (colonnes pleines) retrouvés dans le LBA des cobayes témoins (Saline) et injectés au Sephadex (Sephadex). Les cellules du LBA sont récoltées 24 h après l'injection intraveineuse des billes de Sephadex. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreurs-type de 10 à 13 observations. \*\*\* :  $P < 0.001$  comparé aux cobayes témoins (Saline)



## 9.2 Effets des antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines sur l'infiltration cellulaire pulmonaire induite par le Sephadex

Suite à l'étude sur l'induction de l'infiltration cellulaire pulmonaire par l'injection intraveineuse de billes de Sephadex, nous avons tenté d'inhiber l'infiltration cellulaire pulmonaire avec des antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines. Dans cette série d'expériences, l'effet net du Sephadex sur le nombre de leucocytes, i.e. dont le nombre de leucocytes récoltés dans le LBA des cobayes témoins a été soustrait, est considéré comme étant le 100%. L'inhibition de l'influx d'éosinophiles, de neutrophiles et de macrophages par les antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> est donc calculée à partir des décomptes cellulaires différentiels dont le nombre basal de leucocytes a été soustrait.

### 9.2.1 Effet inhibiteur de l'infusion intraveineuse du [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK et du HOE 140 sur l'infiltration cellulaire pulmonaire induite par le Sephadex

Dans cette série d'expériences, les cobayes injectés avec les billes de Sephadex ont reçu une infusion intraveineuse de saline ou de l'antagoniste ([Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK / HOE 140). Les cobayes témoins ont reçu une infusion intraveineuse de saline. Pour chacun des antagonistes utilisés dans cette étude, nous avons préalablement vérifié l'effet de ces derniers sur les populations cellulaires basales, c'est-à-dire celles retrouvées chez les cobayes témoins saline. Aucun des antagonistes utilisés n'a eu d'effet sur le nombre basal de leucocytes récoltés.

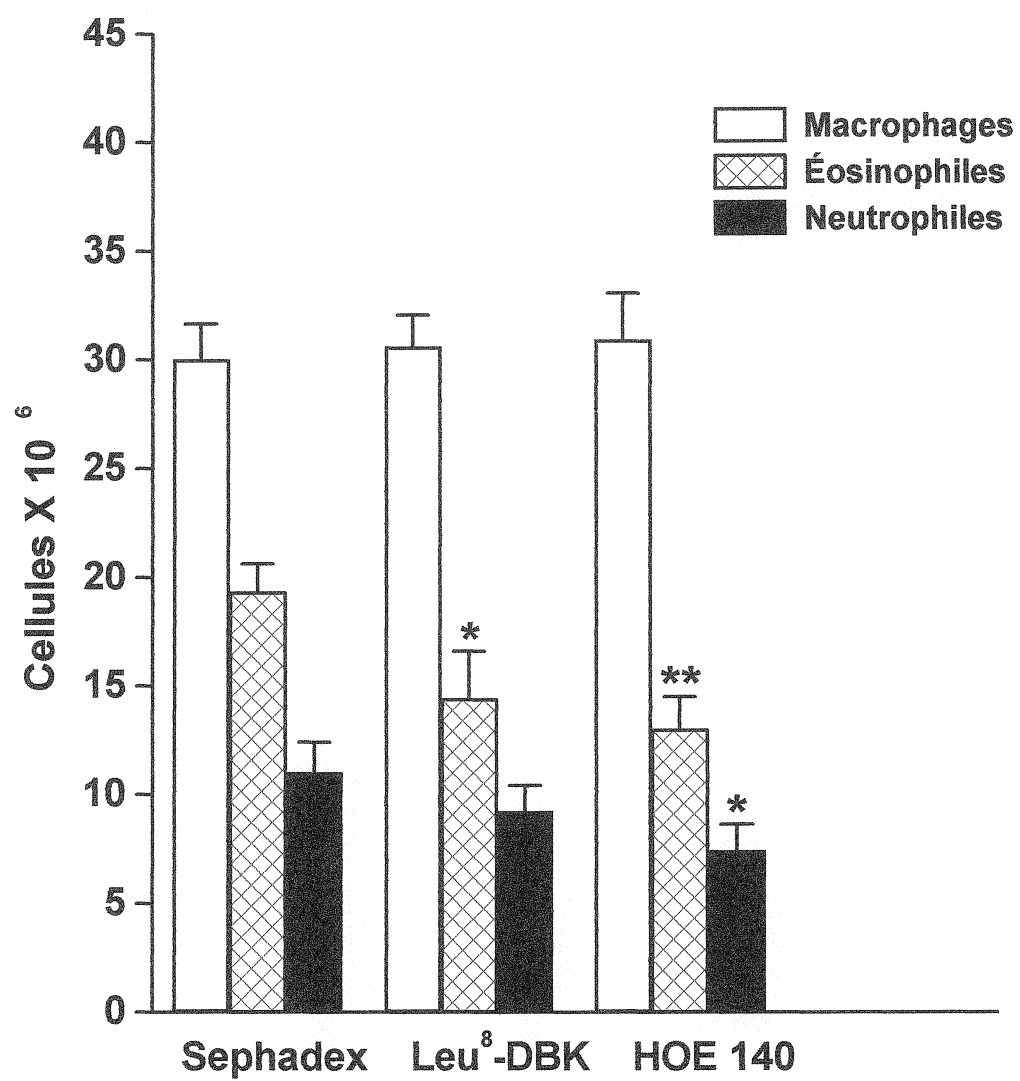
Nous observons une augmentation de 1.9 fois (de 31.45 à 60.33 x 10<sup>6</sup> cellules) dans le nombre de cellules totales récoltées dans les liquides du LBA, 24 h après l'injection

des billes de Sephadex en comparaison des animaux témoins. Les décomptes différentiels démontrent que le nombre de macrophages (de 26.45 à 30.00 x 10<sup>6</sup> cellules), d'éosinophiles (4.36 à 19.32 x 10<sup>6</sup> cellules) et de neutrophiles (0.64 à 11.01 x 10<sup>6</sup> cellules) augmente de 1.13, 4.4 et 17.2 fois, respectivement, 24 h après l'injection du Sephadex comparés aux animaux témoins (résultats non montrés). L'infusion intraveineuse de saline chez les cobayes injectés avec le Sephadex n'affecte pas le pourcentage de leucocytes polymorphonucléaires et mononucléaires retrouvés dans les liquides du LBA comparés aux animaux injectés au Sephadex seulement (Figure 6, 7).

L'antagoniste du récepteur B<sub>1</sub>, le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK (40 mg Kg<sup>-1</sup>/24 h), administré de façon intraveineuse par des pompes osmotiques à un taux de 8 µl/h diminue de 33% le nombre d'éosinophiles (de 14.96 à 10.06 x 10<sup>6</sup> cellules) récolté dans le LBA comparé au nombre observé chez les animaux injectés avec les billes de Sephadex ayant reçu une infusion intraveineuse de saline (Figure 7). Cet antagoniste n'affecte pas le nombre de macrophages et de neutrophiles. L'antagoniste du récepteur B<sub>2</sub>, le HOE 140 (4 mg Kg<sup>-1</sup>/24 h), administré lui aussi par des pompes osmotiques à un taux de 8 µl/h diminue de 42% le nombre d'éosinophiles (de 14.96 à 8.65 x 10<sup>6</sup> cellules) et de 35% le nombre de neutrophiles (de 10.37 à 6.79 x 10<sup>6</sup> cellules) récoltés dans le LBA comparé au nombre observé chez les cobayes injectés au Sephadex ayant reçu une infusion intraveineuse de saline (Figure 7). Cet antagoniste n'affecte pas le nombre de macrophages récoltés dans le LBA 24 h après l'injection du Sephadex.

Figure 7 : Effet inhibiteur du [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK (40 mg Kg<sup>-1</sup>/24 h) et du HOE 140 (4 mg Kg<sup>-1</sup>/24 h), sur l'infiltration cellulaire induite par l'injection intraveineuse de billes de Sephadex (24 mg Kg<sup>-1</sup>). Les deux antagonistes sont délivrés de façon intraveineuse par des pompes osmotiques ALZET à un taux de 8 µl/h pour une période de 24 h. Les cobayes injectés au Sephadex (Sephadex) ont reçu une infusion intraveineuse de saline. Les macrophages (colonnes vides), les éosinophiles (colonnes hachurées en x) et les neutrophiles (colonnes pleines) du LBA sont récoltés 24 h après l'injection des billes de Sephadex. Les valeurs sont des moyennes ± erreurs-type de 10 à 15 observations. \* : P < 0.05 comparé aux cobayes traités au Sephadex (Sephadex); \*\* : P < 0.01 comparé aux cobayes traités au Sephadex (Sephadex)



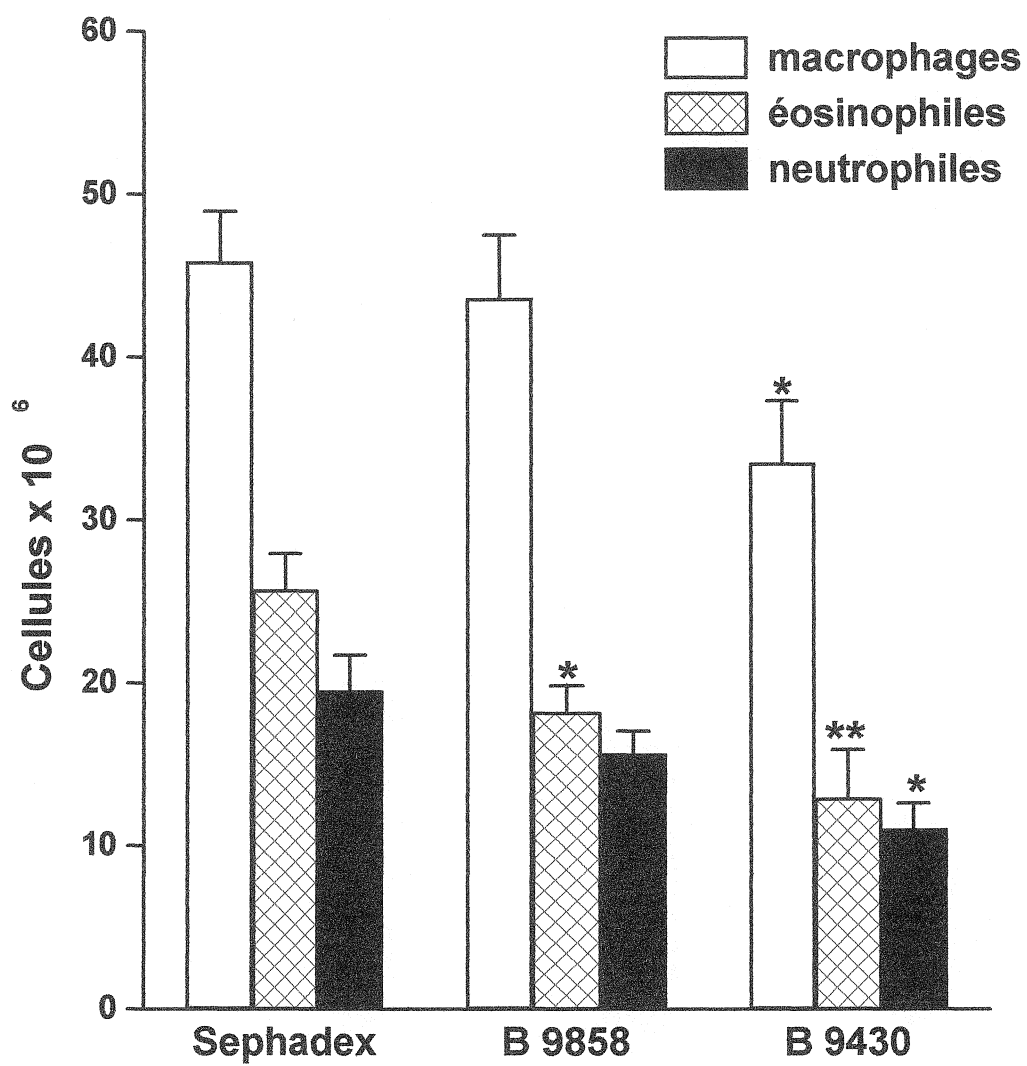


### 9.2.2 Effets inhibiteurs du B 9858 et du B 9430 sur l'infiltration cellulaire pulmonaire induite par l'injection de billes de Sephadex

Dans cette série d'expériences, les antagonistes (B 9858 et B 9430) sont administrés de façon intrapéritonéale 1 h après l'injection des billes de Sephadex. L'injection du véhicule (600 µl de saline; i.p.) 1 h après l'injection du Sephadex n'a aucun effet sur les populations cellulaires du LBA comparées aux populations retrouvées chez les animaux injectés avec les billes de Sephadex n'ayant pas reçu le véhicule (résultats non montrés).

L'antagoniste du récepteur B<sub>1</sub>, le B 9858 (1 mg Kg<sup>-1</sup>; i.p.) diminue de 35% l'éosinophilie pulmonaire (de 21.33 à 13.846 x 10<sup>6</sup> cellules) (Figure 8) et n'affecte pas le nombre de macrophages et de neutrophiles récoltés dans le LBA. L'antagoniste non-sélectif des récepteurs B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub>, le B 9430 (1 mg Kg<sup>-1</sup>; i.p.), diminue de 64% le nombre de macrophages (19.37 à 7.00 x 10<sup>6</sup> cellules), de 60% le nombre d'éosinophiles (de 21.33 à 8.55 x 10<sup>6</sup> cellules) et de 45% le nombre de neutrophiles (de 18.87 à 10.397 x 10<sup>6</sup> cellules) récoltés dans le LBA des cobayes injectés au Sephadex (Figure 8).

Figure 8 : Effet inhibiteur du B 9858 ( $1 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) et du B 9430 ( $1 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) sur l'infiltration cellulaire pulmonaire induite par l'injection intraveineuse de billes de Sephadex ( $24 \text{ mg Kg}^{-1}$ ). Les deux antagonistes sont injectés de façon intrapéritonéale 1 h après l'injection des billes de Sephadex. Les macrophages (colonnes vides), les éosinophiles (colonnes hachurées en x) et les neutrophiles (colonnes pleines) du LBA sont récoltés 24 h après l'injection de Sephadex. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreurs-type de 4 à 10 observations. \* :  $P < 0.05$  comparé aux cobayes traités au Sephadex (Sephadex); \*\* :  $P < 0.01$  comparé aux cobayes traités au Sephadex (Sephadex)



### 9.3 Activité EPO totale retrouvée dans le LBA

Le dosage de l'activité EPO présente dans le surnageant du LBA, dans les 3 séries d'expériences (Figure 6, 7 et 8), nous permet de déterminer le degré d'activation des éosinophiles présents dans le LBA et de corrélérer cette activité avec le nombre d'éosinophiles récoltés. Pour déterminer l'activité EPO, nous avons utilisé une courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de l'activité de la peroxydase de type I de raifort (nombre d'unités de raifort en mU/ml). Encore une fois, pour le calcul du pourcentage d'inhibition, nous avons tenu compte de l'activité EPO totale basale, i.e. l'activité EPO retrouvée dans le LBA des cobayes témoins.

#### 9.3.1 Diminution de l'activité EPO totale dans les LBA des cobayes infusés avec le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK ou le HOE 140

L'activité EPO totale retrouvée dans le LBA augmente de 3 fois, 24 h après l'injection des billes de Sephadex en comparaison avec l'activité EPO retrouvée dans le LBA des animaux témoins (Tableau I). Cette augmentation de l'activité EPO correspond à l'augmentation du nombre d'éosinophiles (5.9 fois) dans le LBA 24 h après l'injection des billes de Sephadex (Figure 6). L'infusion intraveineuse du [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK (40 mg Kg<sup>-1</sup>/24 h) et du HOE 140 (4 mg Kg<sup>-1</sup>/24 h) diminue l'activité EPO de 48 et 38%, respectivement, en comparaison de l'activité EPO retrouvée dans les liquides du LBA des animaux injectés au Sephadex (Tableau I). Cette diminution de l'activité EPO correspond à la diminution du nombre d'éosinophiles par le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK (33%) et le HOE 140 (42%).

### 9.3.2 Diminution de l'activité EPO totale dans les LBA des animaux traités avec le B 9858 (1 mg Kg<sup>-1</sup>) ou le B 9430 (1 mg Kg<sup>-1</sup>)

Le B 9858 et le B 9430 diminuent l'activité EPO de 63 et 66%, respectivement, en comparaison de l'activité EPO retrouvée dans le surnageant du LBA des animaux injectés au Sephadex (Tableau II). Cette diminution de l'activité EPO correspond à la diminution du nombre d'éosinophiles par le B 9858 (35%) et le B 9430 (60%).

### 9.4 Induction d'une infiltration cellulaire pulmonaire par les agonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines

Suite à l'étude portant sur l'inhibition de l'infiltration cellulaire pulmonaire par un antagoniste du récepteur B<sub>2</sub> (HOE 140), deux antagonistes du récepteur B<sub>1</sub> ([Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK et B 9858) et un antagoniste non-sélectif des récepteurs B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub> (B 9430), nous avons évalué l'habileté d'un agoniste du récepteur B<sub>2</sub> (bradykinine) et d'un agoniste du récepteur B<sub>1</sub> (desArg<sup>9</sup>-BK) à induire une infiltration cellulaire pulmonaire chez le cobaye. Pour cette série d'expériences, nous avons tenu compte dans nos calculs du nombre basal de leucocytes, i.e. le nombre de leucocytes récoltés dans le LBA des cobayes témoins, et l'effet net des agonistes sur le nombre de leucocytes est considéré comme étant le 100 %.

Tableau IV : Activité EPO totale retrouvée dans le LBA provenant de cobayes témoins, injectés au Sephadex et infusés avec le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK ou le HOE 140

	Témoins	Sephadex	[Leu <sup>8</sup> ]desArg <sup>9</sup> -BK	HOE 140
Activité				
Peroxydase totale (mU)	2.40 ± 0.39	7.02 ± 0.72	4.80 ± 0.56	5.28 ± 0.65

Les valeurs (mU) représentent la moyenne ± erreurs-type de 10 à 15 observations.

Tableau V : Activité EPO totale retrouvée dans le LBA provenant de cobayes témoins, injectés au Sephadex et traités avec le B 9858 ou le B 9430

	Témoins	Sephadex	B 9858	B 9430
Activité				
Peroxydase totale (mU)	2.40 ± 0.39	9.92 ± 1.77	5.19 ± 0.77	4.96 ± 0.65

Les valeurs (mU) représentent la moyenne ± erreurs-type de 4 à 13 observations.

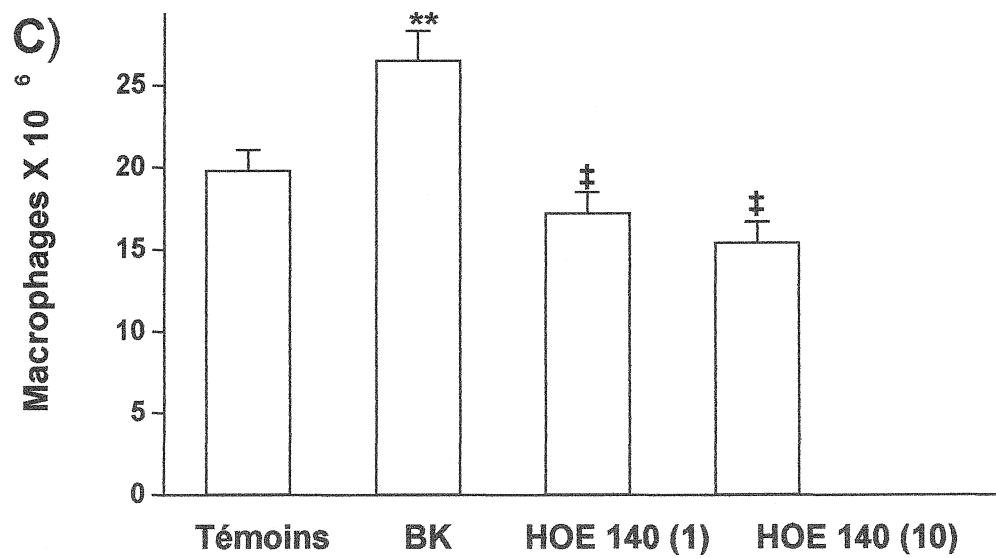
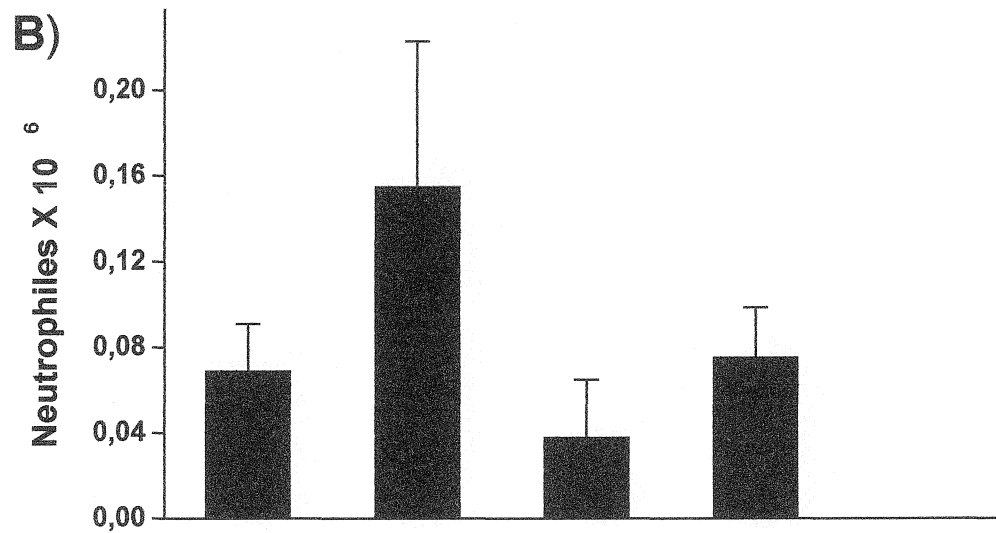
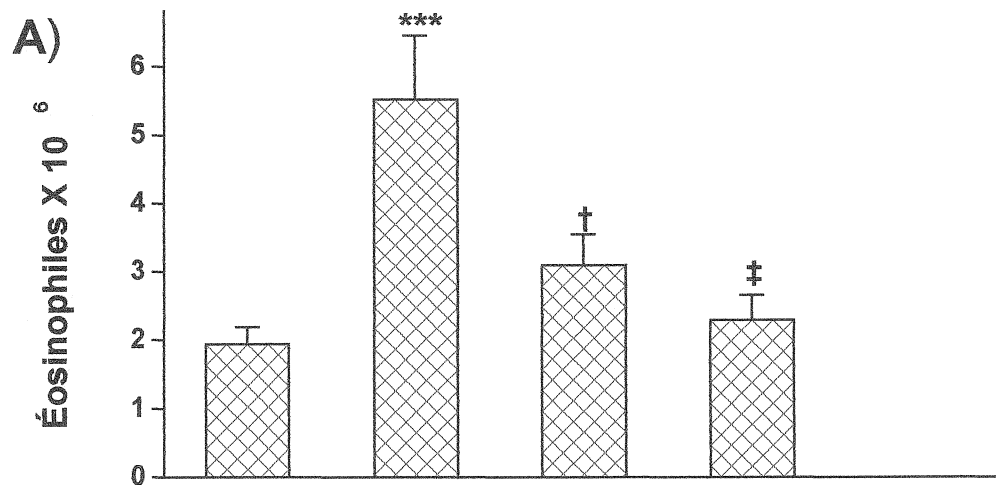
#### 9.4.1 Effet de l'injection intratrachéale de bradykinine sur l'infiltration cellulaire

L'injection intratrachéale de bradykinine (BK) ( $100 \mu\text{l}$ ;  $1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) augmente significativement de 2.8 fois le nombre d'éosinophiles (de  $1.94$  à  $5.53 \times 10^6$  cellules) et de 1.3 fois le nombre de macrophages (de  $19.84$  à  $26.57 \times 10^6$  cellules) récoltés dans le LBA, 3 h après l'injection de la BK (Figure 9 a, c). La BK augmente aussi de 2.2 fois le nombre de neutrophiles (de  $0.07$  à  $0.16 \times 10^6$  cellules), mais cette augmentation n'est pas considérée significative (Figure 9b). L'influx pulmonaire d'éosinophiles et de macrophages est inhibé de façon dose-dépendante par l'injection intratrachéale de l'antagoniste du récepteur  $B_2$ , HOE 140 ( $50 \mu\text{l}$ ;  $1$  et  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) 10 minutes avant l'injection de la BK ( $50 \mu\text{l}$ ;  $1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) (Figure 9a, c). Notons que même si l'augmentation de neutrophiles n'est pas considérée significative (Figure 9b), le HOE 140 ramène le nombre de neutrophiles au niveau basal. Chez les cobayes témoins, l'injection intratrachéale de saline ( $100\mu\text{l}$ ) n'affecte pas le nombre basal de chacune des populations cellulaires récoltées dans le LBA. De plus, l'injection intratrachéale du HOE 140 ( $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ), n'a aucun effet sur les populations cellulaires récoltées dans le LBA 3 h après l'injection (résultats non montrés).

Nos résultats démontrent que l'injection intratrachéale de BK ( $1\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) induit un influx d'éosinophiles et de macrophages dans la lumière pulmonaire des cobayes sains 3 h après l'injection, et cette infiltration cellulaire est totalement inhibée par l'antagoniste du récepteur  $B_2$ , le HOE 140.



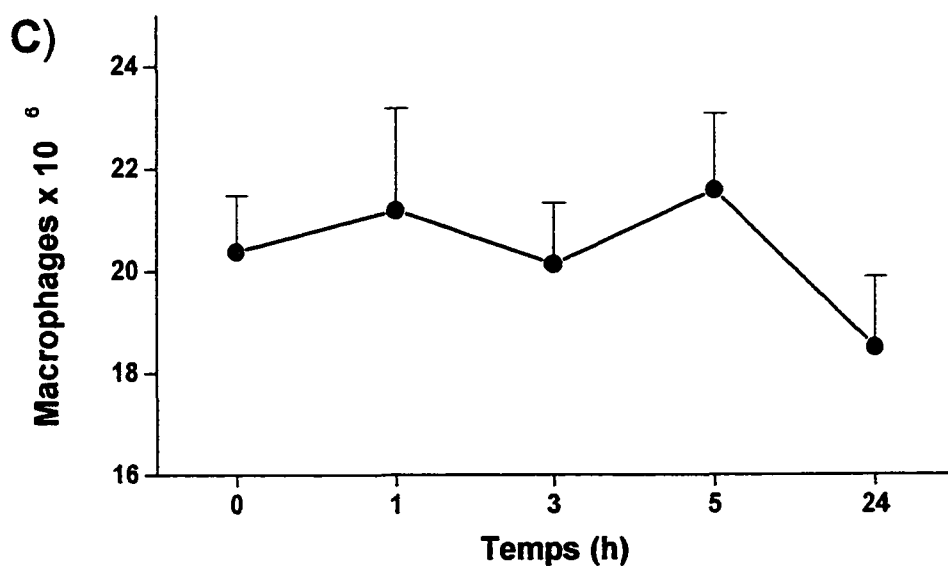
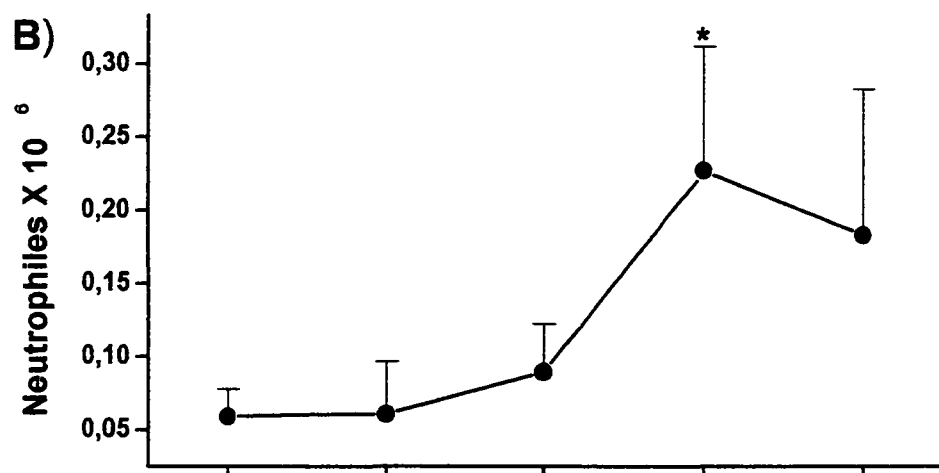
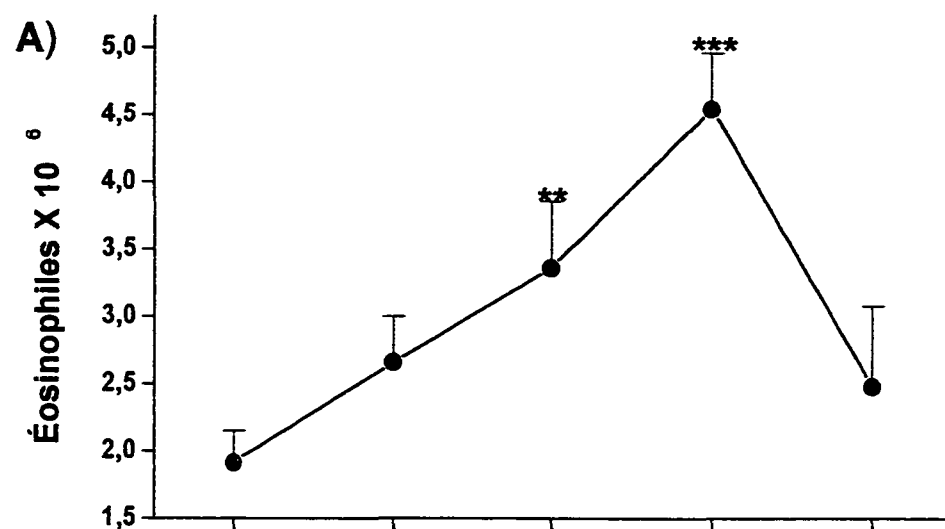
Figure 9 : Effet de l'injection intratrachéale de BK ( $1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) sur le nombre d'éosinophiles (A), de neutrophiles (B) et de macrophages (C) récoltés dans le LBA 3 h après l'injection de la BK. L'antagoniste (HOE 140 ; 1 et  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) fut administré 10 minutes avant l'injection de la BK. Les cobayes témoins (Saline) ont reçu une injection intratrachéale de saline stérile ( $100 \mu\text{l}$ ). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreurs-type de 8 à 21 observations. \*\* :  $P < 0.01$  comparé aux cobayes témoins (Témoins); \*\*\* :  $P < 0.001$  comparé aux cobayes témoins (Témoins); † :  $P < 0.05$  comparé aux traités (BK); ‡ :  $P < 0.01$  comparé aux traités (BK).



#### 9.4.2 Effet de l'injection intratrachéale de desArg<sup>9</sup>-BK sur les populations cellulaires récoltées dans le LBA 1, 3, 5 et 24 h après l'injection de l'agoniste

L'injection intratrachéale de desArg<sup>9</sup>-BK (DBK; 10 µg Kg<sup>-1</sup>) augmente de 1.7 et de 2.4 fois le nombre d'éosinophiles récoltés dans les liquides bronchoalvéolaires 3 et 5 h après l'injection, respectivement (Figure 10a). L'éosinophilie pulmonaire est maximale à 5 h (4.46 x 10<sup>6</sup> cellules) et tend à revenir au niveau basal 24 h (2.48 x 10<sup>6</sup> cellules) après l'injection de l'agoniste. La DBK augmente aussi de 3.8 fois le nombre de neutrophiles (de 0.06 à 0.23 x 10<sup>6</sup> cellules) récoltés 5 h après l'injection de l'agoniste (Figure 10b). La neutrophilie est maximale à 5 h et est soutenue 24 h après l'injection de DBK. La DBK n'exerce aucun effet sur le nombre de macrophages récoltés dans les liquides bronchoalvéolaires 1, 3, 5 et 24 h après l'injection (Figure 10c).

Figure 10 : Effet de l'injection intratrachéale de DBK ( $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) sur le nombre d'éosinophiles (A), de neutrophiles (B) et de macrophages (C) récoltés dans le LBA 1, 3, 5 et 24 h après l'injection. Les cobayes témoins ont reçu une injection intratrachéale de saline ( $100 \mu\text{l}$ ). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreurs-type de 5 à 21 observations. \* :  $P < 0.05$  comparé aux témoins (Temps 0 h); \*\* :  $P < 0.01$  comparé aux témoins (Temps 0 h); \*\*\* :  $P < 0.001$  comparé aux témoins (Temps 0 h)

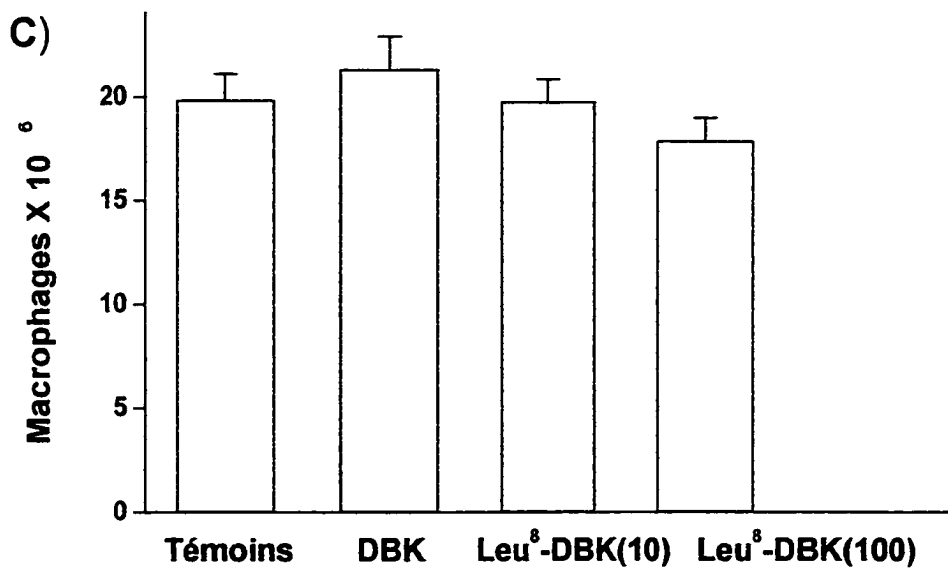
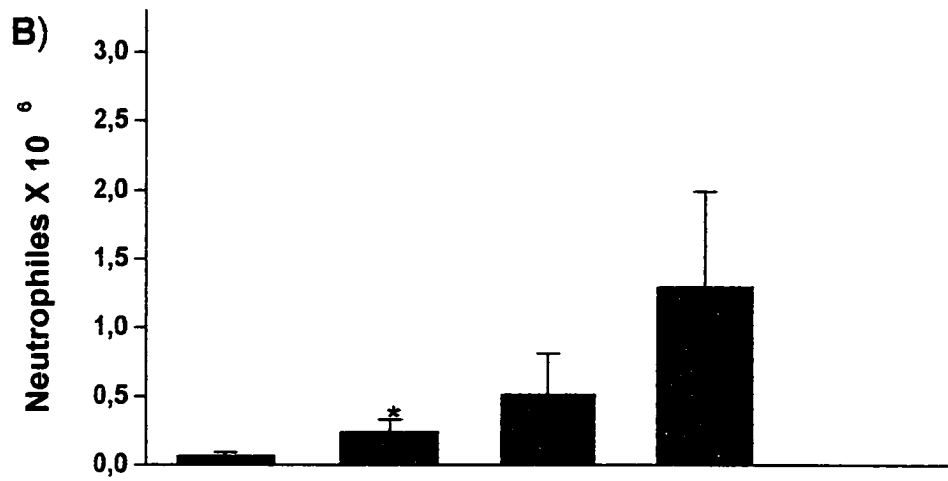
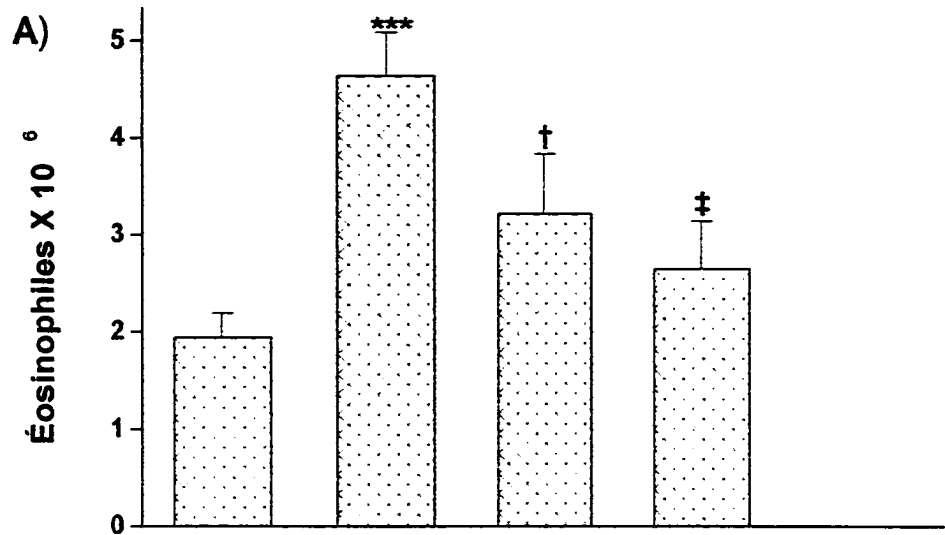


#### 9.4.3 Effet du [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK sur les populations cellulaires pulmonaires récoltées dans le LBA 5 h après l'injection intratrachéale de DBK

L'infiltration d'éosinophiles et de neutrophiles dans les poumons de cobayes étant maximale 5 h après l'injection de DBK (Figure 10 a,b), nous avons tenté de bloquer cette infiltration cellulaire par l'antagoniste du récepteur B<sub>1</sub>, le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK. L'antagoniste est administré de façon intratrachéale, 10 minutes avant la DBK, et le LBA est effectué 5 h après l'injection de l'agoniste.

L'éosinophilie induite par la DBK (10 µg Kg<sup>-1</sup>) est inhibée de façon dose-dépendante par le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK (10 µg Kg<sup>-1</sup> et 100 µg Kg<sup>-1</sup>) (de 2.70 à 1.27 et 0.71 x 10<sup>6</sup> cellules), respectivement (Figure 11a). Par contre, cet antagoniste n'a aucun effet inhibiteur sur la neutrophilie (Figure 11b). L'antagoniste administré seul n'a aucun effet sur les populations cellulaires pulmonaires retrouvées dans le LBA 5 h après l'injection de l'agoniste (résultats non montrés). De plus, nous avons tenté de bloquer l'éosinophilie et la neutrophilie induite par la DBK par l'antagoniste du récepteur B<sub>2</sub>, le HOE 140 (10 µg Kg<sup>-1</sup>), mais cet antagoniste n'a eu aucun effet inhibiteur (résultats non montrés).

Figure 11 : Effet du [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK ( 10 et 100 µg Kg<sup>-1</sup>) sur le nombre d'éosinophiles (A), de neutrophiles (B) et de macrophages (C) récoltés dans le LBA 5 après l'injection de la DBK (10 µg Kg<sup>-1</sup>). L'antagoniste fut administré 10 minutes avant l'injection de l'agoniste. Les cobayes témoins ont reçu une injection intratrachéale de saline (100 µl). Les valeurs sont des moyennes ± erreurs-type de 7 à 21 observations. \* : P < 0.05 comparé aux cobayes témoins (Témoins); \*\*\* : P < 0.001 comparé aux cobayes témoins (Témoins); † : P < 0.05 comparé aux traités (DBK); ‡ : P < 0.01 comparé aux traités (DBK).





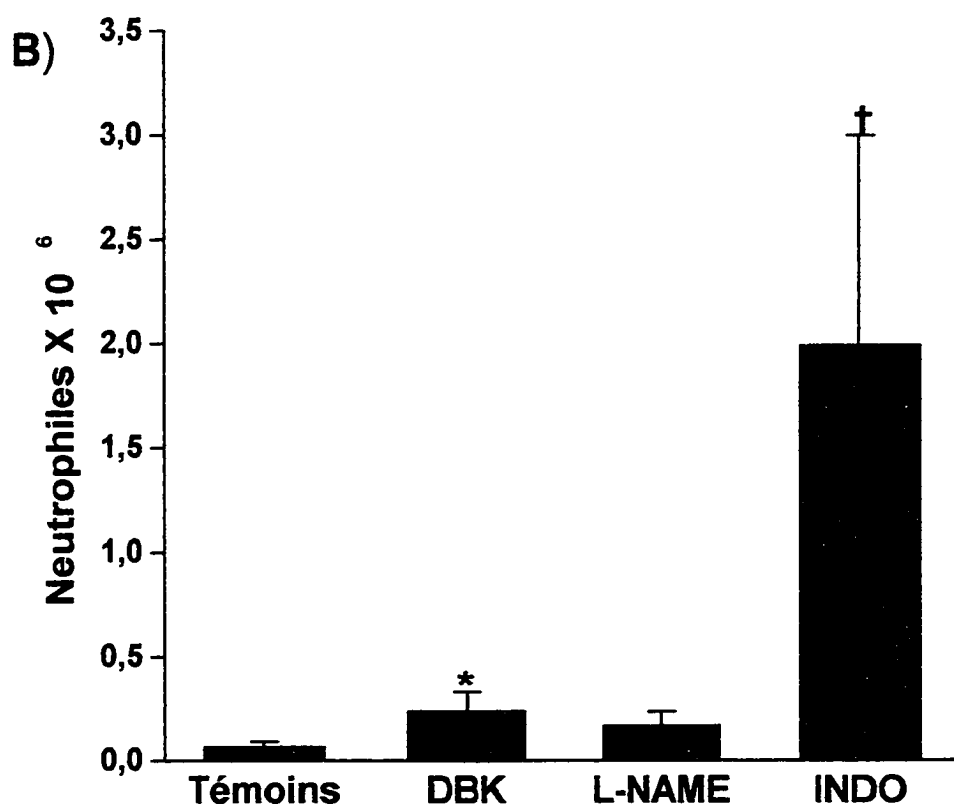
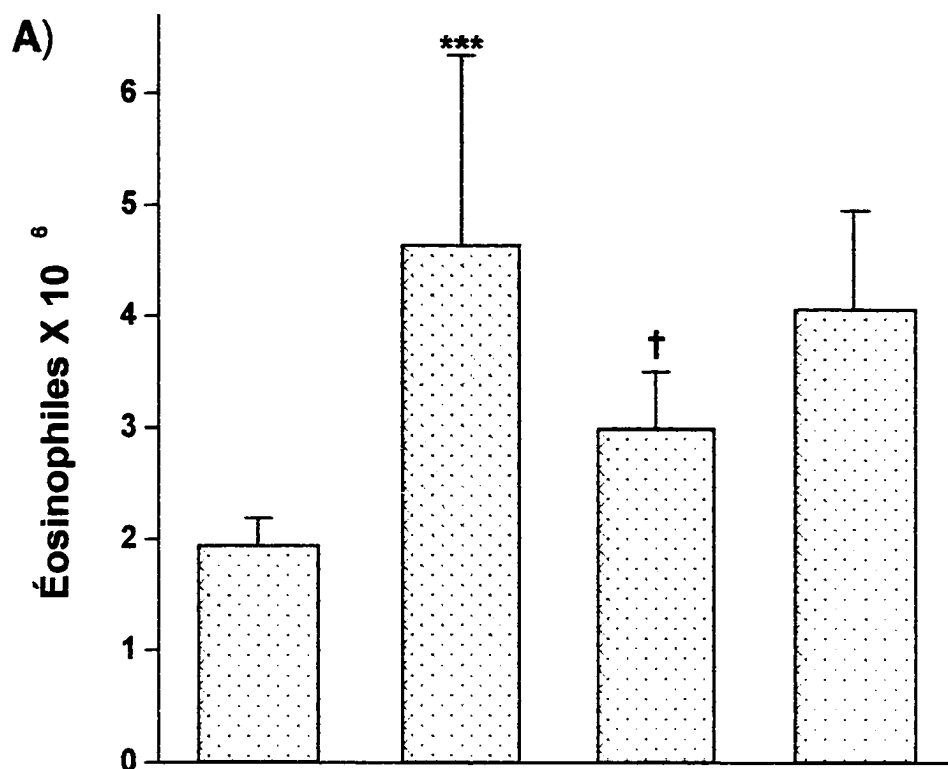
#### 9.4.4 Effet du L-NAME et de l'indométacine sur l'infiltration cellulaire pulmonaire induite par la desArg<sup>9</sup>-BK

Afin de déterminer si l'oxyde nitrique et les métabolites de la cyclooxygénase (COX) sont des seconds messagers impliqués dans l'infiltration cellulaire induite par la DBK, nous avons utilisé un inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase (NOS), le L-NAME (10 mg Kg<sup>-1</sup>), et un inhibiteur de la COX, l'indométacine (5 mg Kg<sup>-1</sup>). Le L-NAME est administré de façon intraveineuse via une veine de l'oreille, 30 minutes avant l'injection de la DBK tandis que l'indométacine est injectée de façon intrapéritonéale 1 h avant l'injection de la DBK. Les LBA sont effectués 5 h après l'injection de la DBK.

Le L-NAME diminue de 58% (de 2.70 à 1.14 x 10<sup>6</sup> cellules) l'éosinophilie (Figure 7a) et de 41% la neutrophilie (de 0.17 à 0.10 x 10<sup>6</sup> cellules), bien que cette diminution ne soit pas considérée significative (Figure 12b). Lorsqu'administré seul, le L-NAME ne provoque aucune variation dans les taux basaux des populations cellulaires retrouvées dans le LBA des animaux témoins (résultats non montrés).

Le prétraitement à l'indométacine n'a aucun effet inhibiteur sur l'éosinophilie et la neutrophilie induite par la DBK (Figure 12a,b). À l'inverse, le prétraitement des animaux avec cet inhibiteur potentialise de 11 fois (de 0.17 à 1.93 x 10<sup>6</sup> cellules) le nombre de neutrophiles récoltés 5 h après l'injection de la DBK (Figure 12b). Le prétraitement des animaux témoins avec l'indométacine induit une augmentation significative du nombre de neutrophiles récoltés dans le LBA (résultats non montrés).

Figure 12 : Effet du L-NAME ( $10 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) et de l'indométacine ( $5 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) sur l'éosinophilie (A) et la neutrophilie (B) induite par l'injection intratrachéale de DBK ( $10 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$ ). Le L-NAME est administré de façon intraveineuse 30 minutes avant l'injection de la DBK. L'indométacine est administrée de façon intrapéritonéale 1 h avant l'injection de l'agoniste. Le LBA est effectué 5 h après l'injection de la DBK. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreurs-type de 7 à 21 observations. \* :  $P < 0.05$  comparé aux cobayes témoins (Témoins); \*\*\* :  $P < 0.001$  comparé aux cobayes témoins (Témoins); † :  $P < 0.05$  comparé aux traités (DBK).

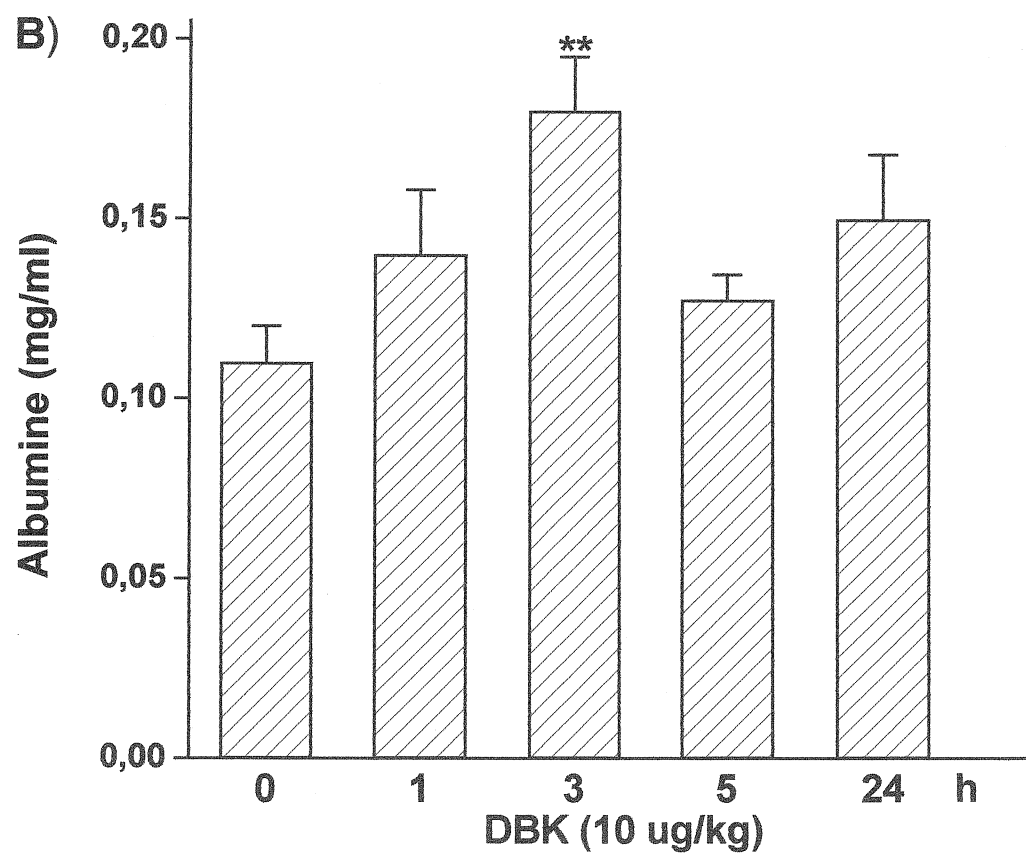
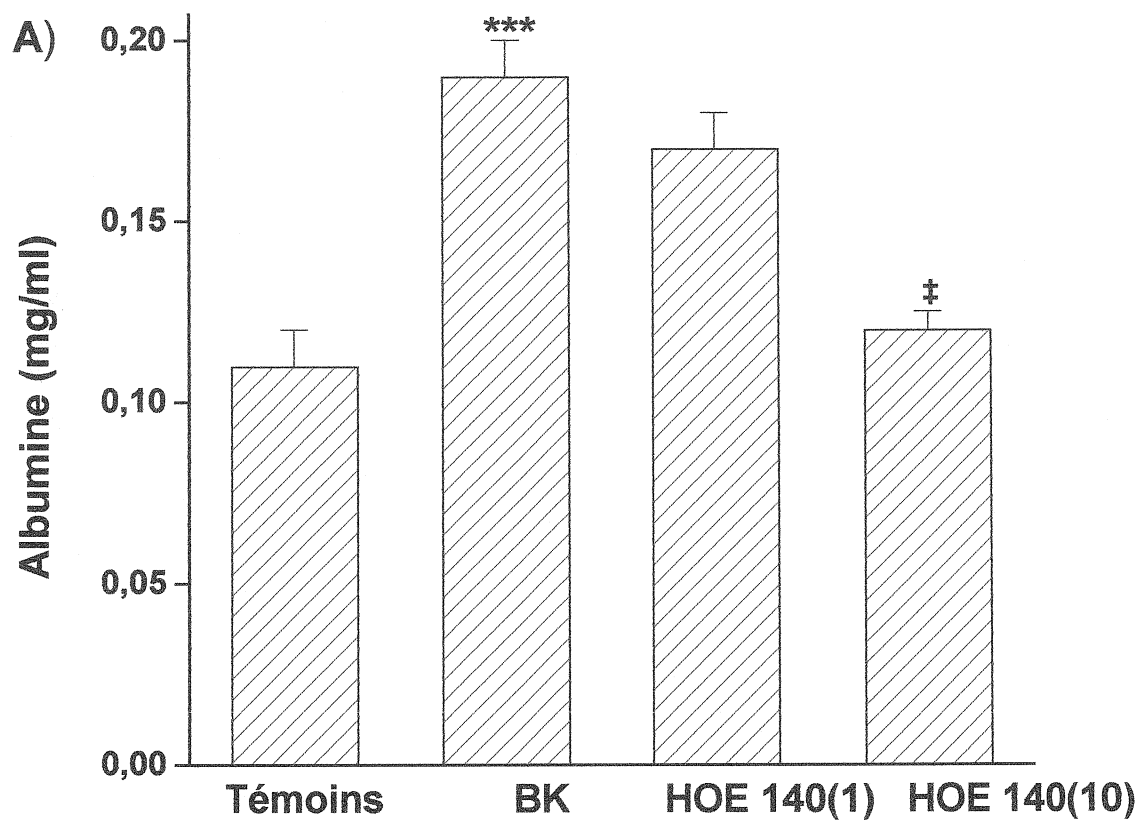


Nos résultats démontrent que le prétraitement des animaux avec un inhibiteur de la NOS inhibe partiellement l'éosinophilie et la neutrophilie induite 5 h après l'injection de DBK. À l'inverse, le prétraitement des animaux avec l'indométacine n'exerce aucun effet inhibiteur sur l'éosinophilie et la neutrophilie induite par la DBK.

#### 9.5 Effet de la bradykinine et de la desArg<sup>9</sup>-BK sur la perméabilité bronchoalvéolaire

Les courbes d'étalonnage de la densité optique en fonction de la quantité d'albumine (0.15 à 1 mg/ml) ont permis de quantifier la quantité d'albumine (mg/ml) présente dans les liquides bronchoalvéolaires. L'injection intratrachéale de BK ( $1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) augmente de 1.7 fois (de 0.11 à 0.19 mg/ml) la quantité d'albumine (mg/ml) présente dans les liquides du LBA, 3 h après l'injection. (Figure 13a). Cette augmentation est totalement inhibée par le HOE 140 ( $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) injecté 10 minutes avant la BK (figure 13a). Lorsqu'administré seul, le HOE 140 ( $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) n'a aucun effet sur l'extravasation de l'albumine dans les liquides bronchoalvéolaires, car la quantité d'albumine est la même que celle retrouvée dans le LBA des cobayes témoins (résultats non montrés). L'injection de DBK ( $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) augmente de 1.6 fois la quantité d'albumine (mg/ml) présente dans les liquides du LBA, 3 h après l'injection (Figure 13b). Nous pouvons observer une augmentation de la quantité d'albumine de 1.3 fois dès la première heure suivant l'injection de DBK, toutefois cette augmentation n'est pas significative. La quantité d'albumine est maximale à 3 h et tend à revenir au niveau basal 5 h après l'injection de DBK (Figure 13b).

Figure 13 : Quantité d'albumine (mg/ml) retrouvée dans les liquides du LBA des cobayes témoins, injectés avec la BK ( $1\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) (A) et injectés avec la DBK ( $10\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) (B). Les LBA sont effectués 3 h après l'injection de BK (A) et 1, 3, 5 et 24 h après l'injection de DBK (B). Le HOE 140 ( $1$  et  $10\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) est injecté 10 minutes avant la BK (A). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreurs-type de 5 à 22 observations. \*\* :  $P < 0.01$  comparé aux cobayes témoins (temps 0 h); \*\*\* :  $P < 0.001$  comparé aux cobayes témoins (Témoins); ‡ :  $P < 0.01$  comparé aux traités (BK).



Donc, l'agoniste du récepteur B<sub>2</sub> (BK; 1 µg Kg<sup>-1</sup>) et l'agoniste du récepteur B<sub>1</sub> (DBK; 10 µg Kg<sup>-1</sup>), en plus d'induire une infiltration cellulaire pulmonaire, sont capables d'induire une extravasation de l'albumine dans les liquides bronchoalvéolaires.

## 9.6 Effet vasodépresseur des kinines

### 9.6.1 Effet de la bradykinine et de la desArg<sup>9</sup>-BK sur la pression artérielle des cobayes témoins et des cobayes injectés avec les billes de Sephadex

La BK, injectée de façon intraartérielle, produit une diminution dose-dépendante (0.05 à 10 µg Kg<sup>-1</sup>) de la pression artérielle chez les cobayes témoins (de 4 à 22 mm Hg) et les cobayes injectés avec les billes de Sephadex (de 7 à 28 mm Hg). Chez les deux groupes d'animaux, le plateau est atteint à 10 µg Kg<sup>-1</sup> et il n'y a pas de différence significative entre l'effet vasodépresseur exercé par la BK chez les cobayes injectés au Sephadex et les cobayes témoins (Figure 14a).

L'agoniste du récepteur B<sub>1</sub>, la DBK, injectée de façon intraartérielle, produit lui aussi une diminution dose-dépendante (10 à 500 µg Kg<sup>-1</sup>) de la pression artérielle chez les cobayes témoins (de 1 à 29 mm Hg) et les cobayes injectés aux billes de Sephadex (de 1 à 31 mm Hg). Chez les deux groupes d'animaux, le plateau est atteint à 500 µg Kg<sup>-1</sup>. Nous avons utilisé des doses de 50 à 200 fois supérieures de DBK pour observer un effet vasodépresseur similaire à la BK (Figure 14b). En effet, la plus forte dose de BK (10 µg Kg<sup>-1</sup>) ou de DBK (500 µg Kg<sup>-1</sup>) utilisée, produit une chute de 28 et 30 mm Hg de la pression artérielle, respectivement, chez les cobayes injectés avec les billes de

Sephadex et une chute de 22 et 29 mm Hg de la pression artérielle, respectivement, chez les cobayes témoins. Une dose de  $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de DBK induit une chute de la pression artérielle significativement plus élevée chez les cobayes traités au Sephadex (10 mm Hg) comparé aux cobayes témoins (5 mm Hg). Cependant, l'allure générale des deux courbes doses-réponses observées chez les deux groupes d'animaux sont relativement semblables.

## 9.7 Effet des kinines sur la pression d'insufflation pulmonaire

### 9.7.1 Effet de la BK et de la DBK sur la pression d'insufflation pulmonaire des cobayes témoins et injectés avec les billes de Sephadex

La BK injectée de façon intraartérielle ( $0.05$  à  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) n'a aucun effet sur la pression d'insufflation pulmonaire (PIP) chez les cobayes injectés au Sephadex et les cobayes témoins (résultats non montrés). Par contre, la DBK ( $10$  à  $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) augmente de façon marquée la PIP des cobayes injectés au Sephadex comparés à la PIP basale des cobayes témoins (Figure 15). En effet, la DBK induit des augmentations de la PIP de  $0 \text{ mm Hg}$  à  $37 \pm 3.4 \text{ mm Hg}$  chez les animaux témoins et de  $0 \text{ mm Hg}$  à  $64 \pm 4.7 \text{ mm Hg}$  chez les cobayes injectés au Sephadex. De plus, on observe un déplacement vers la gauche de la courbe dose-réponse obtenue chez les animaux traités au Sephadex par rapport à celle obtenue chez les animaux témoins, indiquant non seulement une hyperréactivité, mais aussi une hypersensibilité des voies aériennes à la DBK des cobayes suite à l'injection des billes de Sephadex. L' $EC_{50}$  des cobayes injectés au Sephadex est  $150.92 \pm 4.4 \mu\text{g Kg}^{-1}$  comparé à l' $EC_{50}$  des cobayes témoins qui est  $339.08 \pm 0.94 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (Figure 15).



Figure 14 : Effet vasodépresseur de la BK ( $0.05$  à  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) (A) et de la DBK ( $10$  à  $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) (B) chez les animaux témoins (cercles pleins) et chez les cobayes injectés avec les billes de Sephadex (carrés pleins). Les agonistes sont injectés de façon intraartérielle et un temps d'attente de 15 minutes est respecté entre chaque dose. Abscisse : dose de BK (A) ou de DBK (B) en  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . Ordonnée : pression artérielle en mm Hg. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreurs-type de 8 à 10 observations.

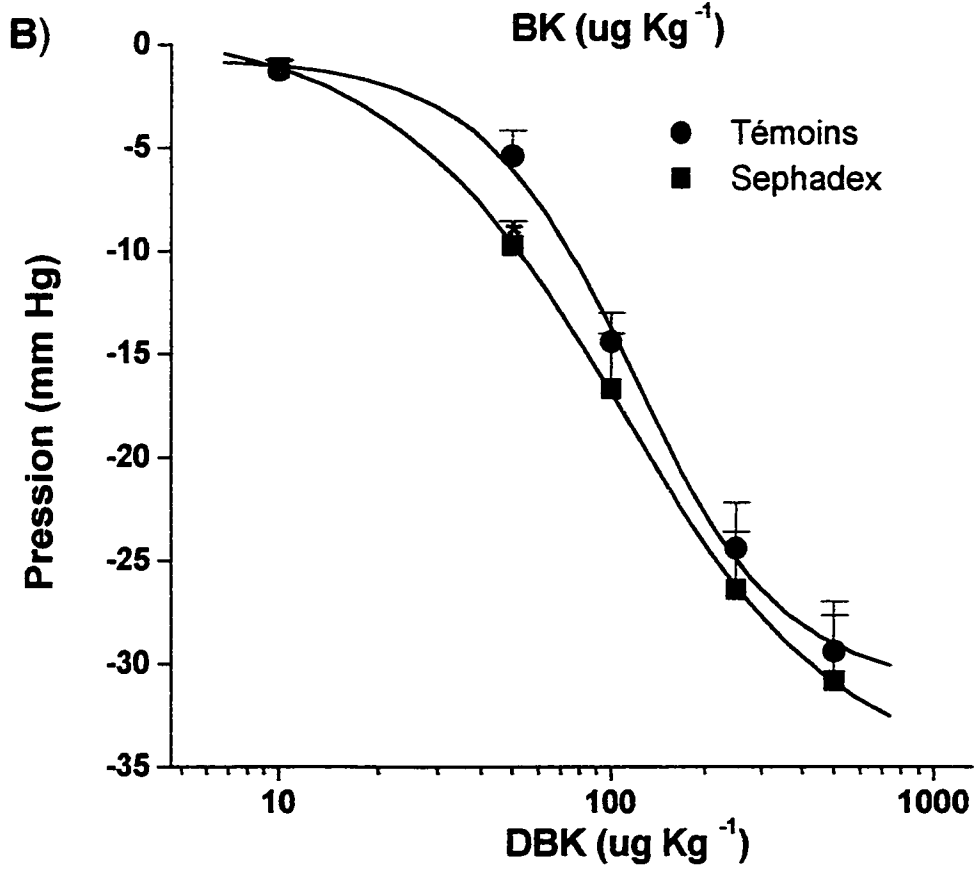
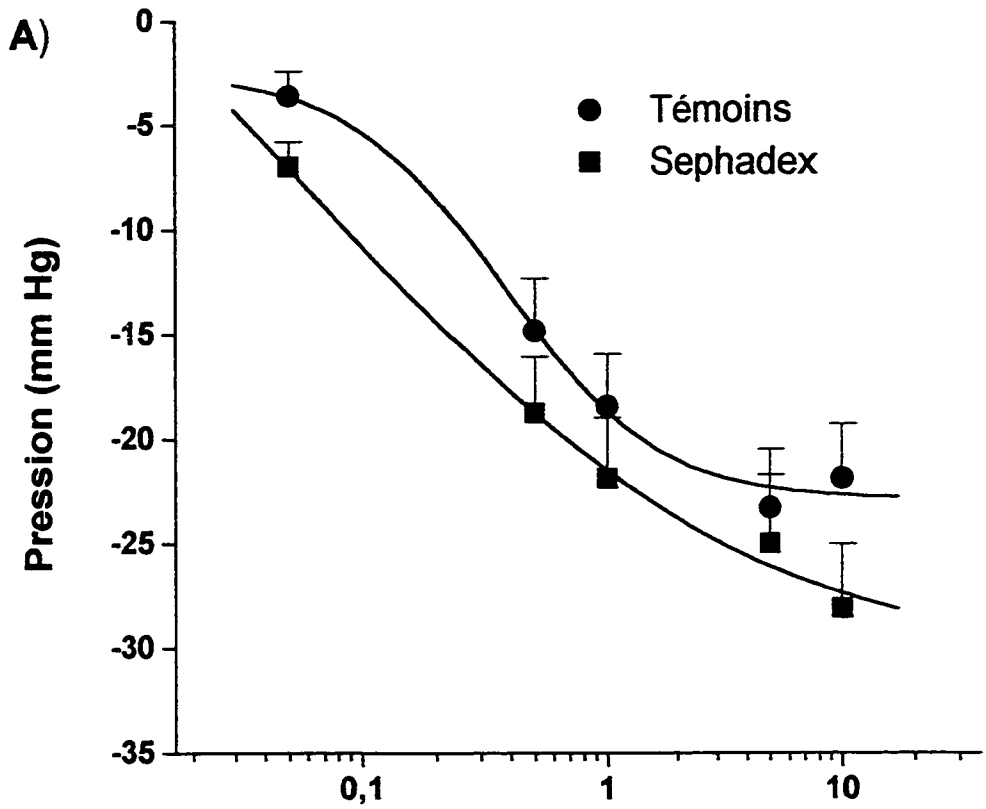
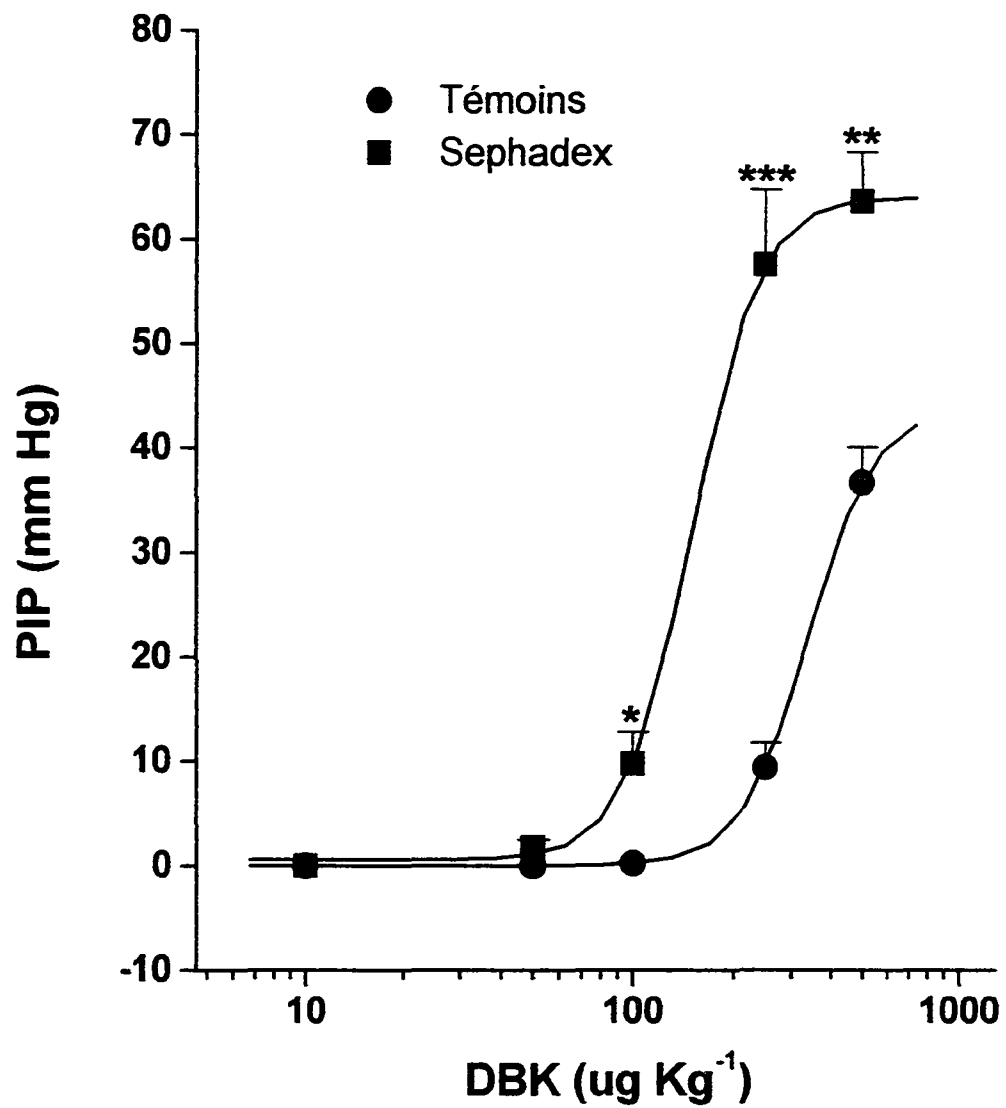


Figure 15 : Hyperréactivité pulmonaire chez les cobayes injectés avec les billes de Sephadex. Bronchoconstriction suivant l'injection de la DBK (10 à 500  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) chez les cobayes injectés au Sephadex (carrés pleins) et chez les cobayes témoins (cercles pleins). Abscisse : dose de DBK en  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . Ordonnée : PIP en mm Hg. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreurs-type de 6 à 10 observations. \* :  $P < 0.05$  comparé aux cobayes témoins (cercles pleins); \*\* :  $P < 0.01$  comparé aux cobayes témoins (cercles pleins); \*\*\* :  $P < 0.001$  comparé aux cobayes témoins (cercles pleins).



## 10. DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDES *IN VITRO*

Cette partie de l'étude a pour but de vérifier la réactivité des différentes parties de l'arbre trachéobronchique (trachée, bronches supérieures et inférieures) à l'agoniste du récepteur B<sub>1</sub>, la desArg<sup>9</sup>-BK (DBK), de cobayes témoins et injectés avec les billes de Sephadex.

### 10.1 Réactivité de la trachée, des bronches supérieures et inférieures de cobayes témoins à la DBK

Tout d'abord, au début et à la fin de chaque expérience, les tissus reçoivent une injection de carbachol (4 µM) afin de vérifier l'intégrité et la réactivité des tissus (résultats non montrés). Aucune différence n'est remarquée entre la réactivité de la trachée, des bronches supérieures et inférieures au carbachol entre le début et la fin de l'expérience. Sous l'action du carbachol, les tissus exercent les tensions suivantes après 1 et 6 h d'incubation: la trachée  $1.07 \pm 0.05$  et  $1.0833 \pm 0.03$  g, les bronches supérieures  $1.33 \pm 0.19$  et  $1.29 \pm 0.26$  g et les bronches inférieures  $0.08 \pm 0.001$  g et  $0.07 \pm 0.01$  g, respectivement.

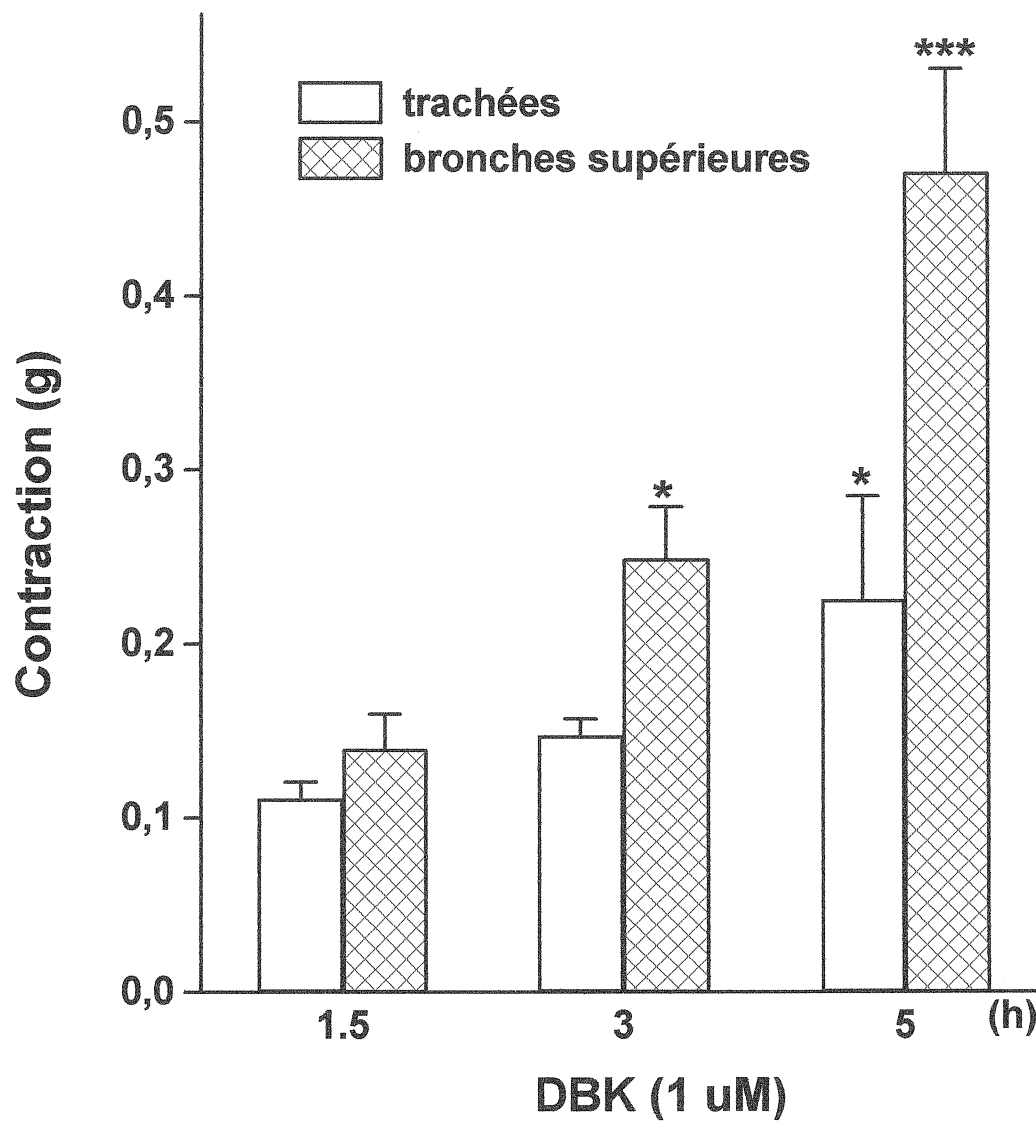
La trachée et les bronches supérieures de cobayes témoins contractent de façon significative suite aux injections de DBK (1 µM) (Figure 16). La réponse contractile de la DBK augmente de façon significative en fonction du temps d'incubation (1.5, 3 et 5 h) de ces deux tissus. De plus, après 5 h d'incubation des tissus, cet agoniste produit une activité contractile plus forte sur la bronche supérieure que sur la trachée de cobaye témoin. Sous l'action de la DBK, les tissus exercent les tensions suivantes après 1.5, 3

et 5 heures d'incubation : la trachée  $0.11 \pm 0.01$ ,  $0.15 \pm 0.01$  et  $0.23 \pm 0.06$  g ; les bronches supérieures  $0.14 \pm 0.02$ ,  $0.25 \pm 0.03$  et  $0.47 \pm 0.06$  g, respectivement (Figure 16). Après 5 h d'incubation, la réponse contractile est maximale pour les deux tissus. Notons que les bronches inférieures de cobayes témoins ne répondent pas à la DBK ( $1 \mu\text{M}$ ).

#### 10.2 Réactivité de la trachée, des bronches supérieures et inférieures de cobayes injectés avec les billes de Sephadex à la DBK

Aucune différence n'est remarquée entre la réactivité de la trachée et des bronches supérieures de cobayes injectés avec les billes de Sephadex au carbachol ( $4 \mu\text{M}$ ) entre le début et la fin de l'expérience. De plus, le carbachol exerce une activité contractile semblable sur la trachée et les bronches supérieures de cobayes témoins et injectés au Sephadex. Sous l'action du carbachol, les tissus de cobayes injectés au Sephadex exercent les tensions suivantes après 1 et 6 h d'incubation: la trachée  $1.17 \pm 0.03$  et  $1.08 \pm 0.07$  g, les bronches supérieures  $1.45 \pm 0.16$  et  $1.50 \pm 0.22$  g et les bronches inférieures  $0.29 \pm 0.04$  g et  $0.33 \pm 0.03$  g, respectivement. Les bronches inférieures de cobayes injectés au Sephadex démontrent une hyperréactivité au carbachol ( $4\mu\text{M}$ ) comparées aux bronches inférieures de cobayes témoins et ce dès le début de l'expérience et est maintenue jusqu'à la fin.

Figure 16 : Réactivités des tissus pulmonaires isolés de cobayes témoins à un agoniste du récepteur  $B_1$  : DBK. Réponses contractiles de la trachée (colonnes vides) et des bronches supérieures (colonnes hachurées en x) à des injections de DBK ( $1\mu\text{M}$ ) après 1.5, 3 et 5 h d'incubation des tissus. Abscisse : agoniste ( $\mu\text{M}$ ) injecté après 1.5, 3 et 5 h d'incubation. Ordonnée : contraction en grammes. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreurs-type de 6 à 20 observations. \* :  $P < 0.05$  comparé aux tissus prélevés après 1.5 h d'incubation (1.5 h) ; \*\*\* :  $P < 0.001$  comparé aux tissus prélevés après 1.5 h d'incubation (1.5 h)

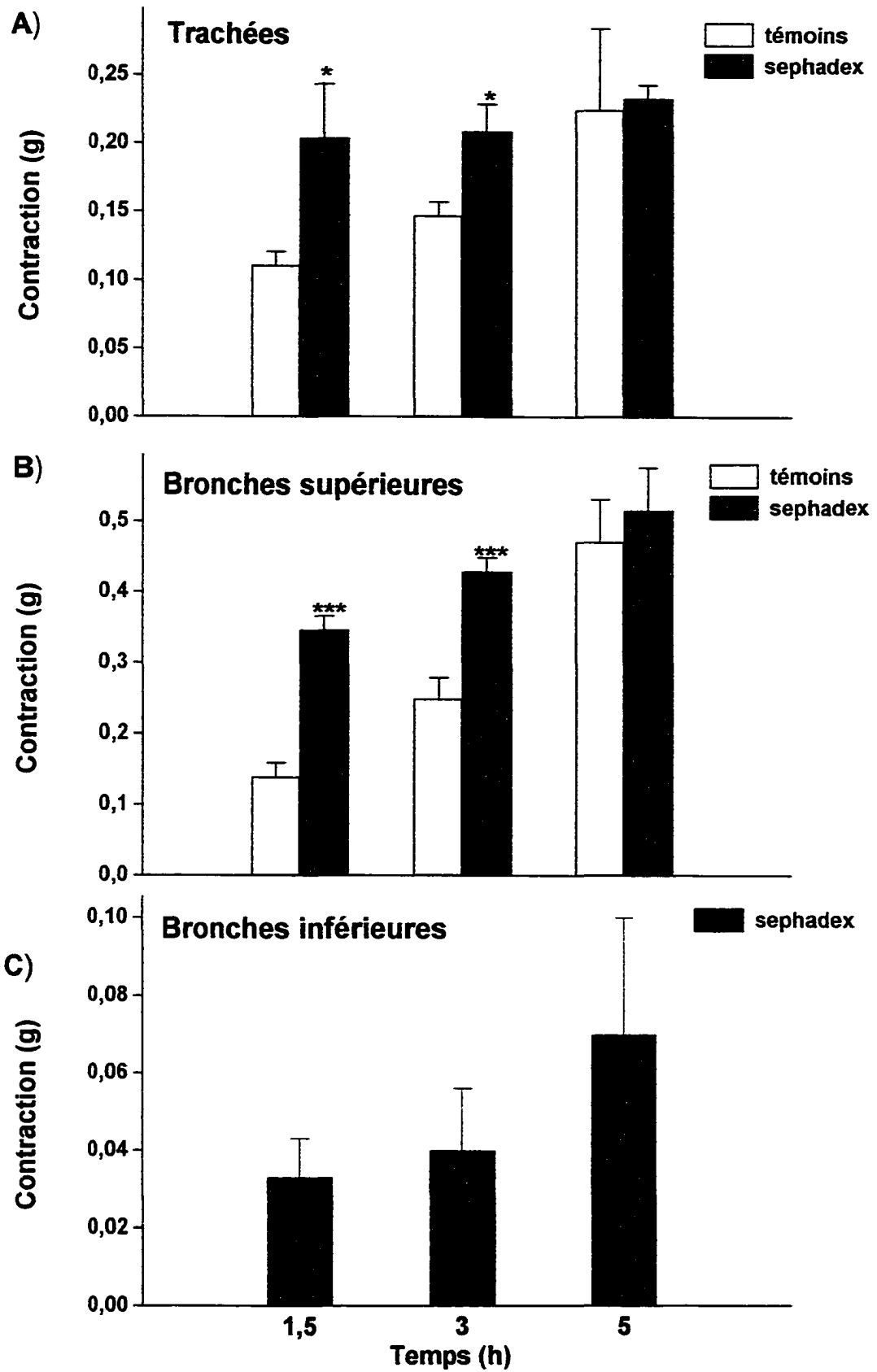




La trachée (Figure 17a), les bronches supérieures (Figure 17b) et inférieures (Figure 17c) prélevées 24 h après l'injection de billes de Sephadex, contractent de façon significative suite aux injections de DBK ( $1\mu\text{M}$ ). La réponse contractile à la DBK n'augmente pas de façon significative en fonction du temps d'incubation des tissus *in vitro*. Cependant, lorsque l'on compare la réactivité de la trachée, des bronches supérieures et inférieures de cobayes injectés au Sephadex avec les tissus pulmonaires prélevés des animaux témoins, il y a une augmentation marquée de la réactivité des tissus à la DBK 24 h après l'injection des billes de Sephadex (Figure 17 a, b, c). Les bronches inférieures de cobayes injectés au Sephadex répondent à la DBK, contrairement aux bronches inférieures de cobayes témoins qui ne démontraient aucune réponse contractile.

En réponse à la DBK, les tissus de cobayes traités au Sephadex exercent les tensions suivantes après 1.5, 3 et 5 h d'incubation : la trachée  $0.20 \pm 0.04$ ,  $0.21 \pm 0.02$  et  $0.23 \pm 0.01$  g ; les bronches supérieures  $0.35 \pm 0.02$ ,  $0.43 \pm 0.02$  et  $0.51 \pm 0.06$  g et les bronches inférieures  $0.03 \pm 0.013$ ,  $0.04 \pm 0.016$  et  $0.07 \pm 0.03$  g, respectivement. Après 5 h d'incubation, la réponse contractile à la DBK est maximale pour les trois tissus.

Figure 17 : Comparaison de la réactivité des tissus pulmonaires de cobayes témoins (colonnes blanches) et injectés au Sephadex (colonnes noires) à un agoniste du récepteur  $B_1$  : DBK. Réponses contractiles de la trachée (a), des bronches supérieures (b) et inférieures (c) à des injections de DBK ( $1\mu\text{M}$ ) après 1.5, 3 et 5 h d'incubation des tissus. Abscisse : agoniste ( $\mu\text{M}$ ) injecté après 1.5, 3 et 5 h d'incubation. Ordonnée : contraction en grammes. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreurs-type de 6 à 20 observations. \* :  $P < 0.05$  comparé aux cobayes témoins (colonnes vides); \*\*\* :  $P < 0.001$  comparé aux cobayes témoins (colonnes vides).



### 10.3 Effets des antagonistes du récepteur B<sub>1</sub> sur la réponse contractile des tissus pulmonaires de cobayes témoins à la DBK

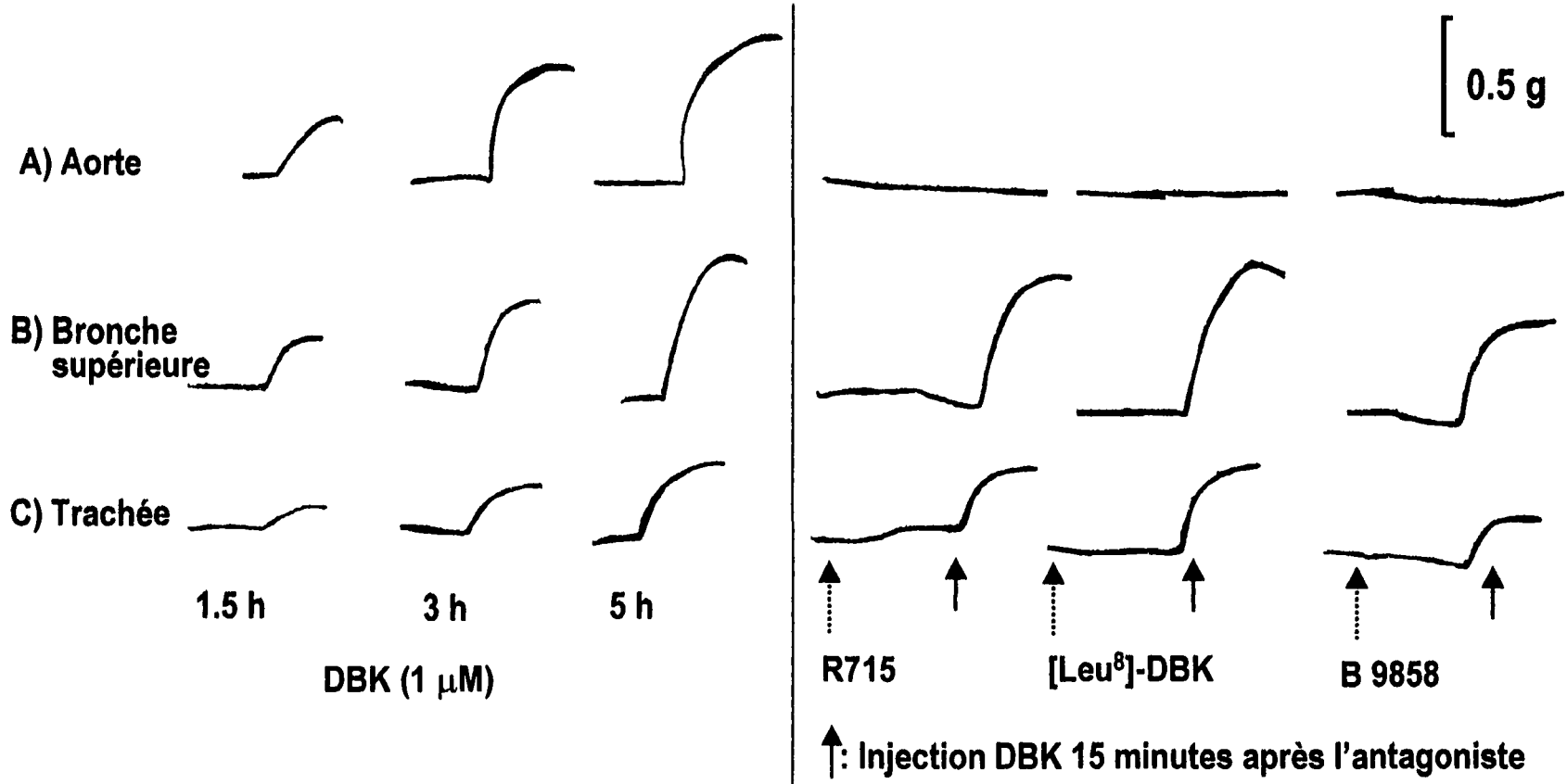
Le récepteur B<sub>1</sub> n'a jamais été identifié chez le cobaye, bien que certaines études démontrent, de façon indirecte, l'implication de ce sous-type de récepteur dans certaines pathologies induites chez cet animal. Nous avons utilisé 3 antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> des kinines, soit le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK, le B 9858 et le R 715, pour tenter de bloquer l'effet contractile de la DBK observé au niveau des tissus pulmonaires de cobayes sains.

#### 10.3.1 Effet du [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK, du R 715 et du B 9858 sur l'effet contractile à la DBK observé sur la trachée et les bronches supérieures de cobayes témoins.

Nous avons utilisé comme tissu de référence l'aorte thoracique de lapin. Ce tissu a permis la première identification pharmacologique du récepteur de type B<sub>1</sub>. Par la suite, plusieurs études *in vitro* ont permis la caractérisation pharmacologique de ce sous-type de récepteur au niveau de l'aorte de lapin.

À la concentration utilisée ( $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ ), le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK, le R 715 et le B 9858 n'ont aucun effet antagoniste sur la réponse contractile à la DBK ( $1 \mu\text{M}$ ) au niveau de la trachée et de la bronche supérieure de cobayes témoins ( $n=4$ ) (Figure 18). Par contre, les trois antagonistes du récepteur de type B<sub>1</sub> ([Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK, R715, B 9858;  $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ ) antagonisent complètement l'effet contractile de la DBK au niveau de l'aorte de lapin (Figure 18). Les antagonistes sont injectés seulement lorsque la réponse contractile à la DBK est stable, soit après 5 h d'incubation des tissus *in vitro*. Les antagonistes sont injectés 15 minutes avant la DBK.

Figure 18 : Tracé-type des contractions observées au niveau de l'aorte de lapin (A), de la bronche supérieure (B) et de la trachée (C) de cobaye suite aux injections de DBK ( $1\mu\text{M}$ ) après 1.5, 3 et 5 h d'incubation des tissus (panneau gauche). Après 5 h d'incubation, les contractions observées sont stables. Effet du R 715, du [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK et du B 9858 ( $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ ) sur l'effet contractile de la DBK au niveau de l'aorte de lapin (A), de la bronche supérieure (B) et de la trachée de cobayes témoins (panneau droit).



## DISCUSSION

### 11. MODÈLE D'INFLAMMATION PULMONAIRE

Depuis quelques années, l'asthme est considéré comme un désordre inflammatoire des voies aériennes. En effet, les patients asthmatiques doivent désormais utiliser, en plus des bronchodilatateurs (propranolol), des anti-inflammatoires (corticostéroïdes), pour diminuer et prévenir les crises d'asthme. Les anti-inflammatoires permettent de diminuer l'inflammation des voies aériennes des sujets asthmatiques. Certaines études suggèrent que l'infiltration des voies aériennes par les cellules inflammatoires (éosinophiles, neutrophiles, macrophages...) pourrait être en partie responsable du développement de l'HRB, caractéristique importante de l'asthme. Plusieurs médiateurs semblent impliqués dans les changements physiopathologiques associés à l'asthme. Depuis que HERXHEIMER et STRESEMAN (1961) ont observé que l'inhalation de BK est un puissant bronchoconstricteur chez les asthmatiques et est essentiellement inactif chez les non-asthmatiques, ce peptide est considéré comme un médiateur important impliqué dans la pathogénèse de l'asthme. L'implication de la BK, et par conséquent l'implication du récepteur  $B_2$ , dans le processus inflammatoire est bien documenté. Cependant, les rôles de la DBK, métabolite actif de la BK, agissant sur le récepteur  $B_1$ , dans l'inflammation demeure obscurs. Ceci nous a donc mené à faire une étude *in vivo* des effets de la DBK et des antagonistes du récepteur  $B_1$  sur : 1) l'infiltration cellulaire pulmonaire ; 2) la perméabilité bronchoalvéolaire ; 3) la pression artérielle et 4) la pression d'insufflation pulmonaire (PIP) chez le cobaye. Nous avons également fait l'étude avec la BK et un antagoniste du récepteur  $B_2$ , afin de comparer l'implication des deux sous-types de récepteurs dans le processus inflammatoire.

Dans la première partie de notre étude, nous avons utilisé un modèle animal d'inflammation pulmonaire, développé dans notre laboratoire par MAGHNI *et al.*, (1993). Nous avons démontré que l'injection de billes de Sephadex G-50 induit rapidement un recrutement important d'éosinophiles et de neutrophiles dans le poumon de cobayes. Rappelons que l'éosinophilie pulmonaire est une caractéristique retrouvée dans la physiopathologie de l'asthme. WALLS et BEESON (1972) furent les premiers à décrire une éosinophilie induite par l'injection de billes de Sephadex chez le rat. Les mécanismes responsables du recrutement de leucocytes dans ce modèle d'inflammation sont très complexes et ne sont pas clairement établis. Cependant, SORDEN *et al.* (1990) ont démontré que les billes de Sephadex injectées de façon intraveineuse chez le rat, sont emprisonnées dans les artères pulmonaires de petits calibres, associés aux bronchioles terminales, et induisent une accumulation de macrophages et de cellules multinucléaires aux sites d'inflammation. Les plus gros vaisseaux qui ne sont pas obstrués par les particules de Sephadex, démontrent un œdème périvasculaire et une infiltration d'éosinophiles. De plus, la taille et le poids en Dextran des billes de Sephadex, ainsi que la nature chimique du polymère composant les billes, sont des facteurs déterminants pour l'induction d'une éosinophilie chez le rat (WALLS et BEESON, 1972). Suite à l'injection intrapéritonéale de billes de Sephadex chez le cobaye, des anticorps anti-Dextran sont apparus dans le sérum de l'animal environ 3 à 4 semaines après l'injection (BATTISTO *et al.*, 1968). Ces résultats suggèrent que l'éosinophilie et la neutrophilie observée 1 jour après l'injection des billes de Sephadex, n'est probablement pas associée à une réaction de type antigène-anticorps.



L'injection des billes de Sephadex chez le cobaye conscient, induit plusieurs changements physiopathologiques, tels le recrutement de leucocytes (éosinophiles, neutrophiles, macrophages), une HRB non-spécifique et une augmentation de la perméabilité microvasculaire et bronchoalvéolaire (MAGHNI *et al.*, 1993 ; NOGUERIA de FRANCISCHI *et al.*, 1993). Tous ces changements sont des caractéristiques retrouvées dans l'asthme. Notre modèle comporte plusieurs avantages comparés aux autres modèles d'inflammation pulmonaire. En effet, nous avons démontré qu'une dose unique de billes de Sephadex est nécessaire pour induire une éosinophilie et une neutrophilie chez le cobaye. De plus, nous avons montré que le nombre d'éosinophiles retrouvé dans le LBA, 1 jour après l'injection des billes, était supérieur au nombre obtenu chez le rat après plusieurs injections de Sephadex (WALLS et BEESON, 1972 ; SCHRIDER et ZUCKER-FRANKLIN, 1974). Contrairement aux modèles d'inflammation nécessitant une sensibilisation de plusieurs semaines à un antigène, le modèle Sephadex permet d'obtenir une éosinophilie pulmonaire beaucoup plus importante et ce, en peu de temps (MAGHNI *et al.*, 1993). L'injection des billes de Sephadex est donc une méthode simple, rapide, reproductible et peu coûteuse, permettant l'induction d'une éosinophilie pulmonaire chez le cobaye conscient.

#### 11.1 Induction de l'influx de cellules inflammatoires dans les poumons de cobayes suite à l'injection de billes de Sephadex

Nos résultats démontrent que l'injection intraveineuse de billes de Sephadex G-50 (24 mg Kg<sup>-1</sup>) est capable d'induire une infiltration importante de leucocytes dans les poumons de cobayes. Nous avons utilisé une dose de 24 mg Kg<sup>-1</sup> de billes de Sephadex,

car nous avons démontré que cette dose est la dose maximale non-létale pouvant être injectée chez le cobaye conscient. Une augmentation du nombre d'éosinophiles (5.9 et 4.4 fois) de neutrophiles (30.5 et 17.2 fois) et de macrophages (1.7 fois) est observée dans les LBA des cobayes, 24 h après l'injection des billes de Sephadex (Figure 6 et 7, respectivement). Concomitant avec cet influx d'éosinophiles, nous avons observé une augmentation de l'activité EPO totale dans le surnageant du LBA 24 h après l'injection des billes, ce qui suggère que les éosinophiles récoltés dans les liquides du LBA sont activés. Ceci est en accord avec nos résultats précédents (MAGHNI *et al.*, 1996).

Les neutrophiles sont rarement retrouvés dans l'arbre trachéobronchique des cobayes témoins (2% des cellules totales récoltés dans le LBA). Ce sont des cellules mobiles rapidement recrutées aux sites d'inflammation, c'est pourquoi ils augmentent de façon marquée suite à l'injection des billes de Sephadex. À l'inverse, les cellules mononucléaires (macrophages) constituent 84% des cellules totales récoltées dans les liquides du LBA des cobayes témoins et ce pourcentage diminue à 50% après l'induction de l'inflammation pulmonaire. Il est important de noter que le nombre total de macrophages augmente après l'injection des billes de Sephadex, bien que cette augmentation soit moins prononcée que pour les autres types cellulaires (éosinophiles et neutrophiles). Les macrophages sont des cellules résidentes de l'arbre trachéobronchique des sujets sains et ces cellules sont capables de relâcher une panoplie de médiateurs pro-inflammatoires, comme le MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ), un facteur chémoattractif pour les éosinophiles (ROT *et al.*, 1992). De plus, le groupe de LAMKHIOUED (1997) a démontré que l'éotaxin, chémokine responsable du recrutement spécifique des éosinophiles, était principalement localisé au niveau des

macrophages. Donc, les macrophages peuvent contribuer à la pathogénèse de l'asthme en recrutant les cellules inflammatoire, comme les éosinophiles, au niveau des voies aériennes.

L'utilisation de ce modèle animal d'inflammation pulmonaire nous a permis d'évaluer l'effet des antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines sur l'infiltration cellulaire pulmonaire.

### 11.2 Effets des antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> sur l'infiltration cellulaire pulmonaire induite par le Sephadex

Pour cette partie de l'étude, nous avons infusé, à l'aide de micro-pompes osmotiques, un antagoniste du récepteur B<sub>1</sub> ([Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK) et un antagoniste du récepteur B<sub>2</sub> (HOE 140). Nous avons choisi ce mode d'administration car ce sont des antagonistes peptidiques susceptibles à la dégradation *in vivo*. Nous avons utilisé une dose dix fois supérieure de [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK (40 mg/kg/24 h) que de HOE 140 (4 mg/kg/24 h) parce que le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK, premier antagoniste décrit pour le récepteur B<sub>1</sub> (Drapeau et Regoli, 1988), est peu puissant et est rapidement dégradé par les peptidases *in vivo*. Le HOE 140 n'est pas un substrat pour l'ECA et l'acide octahydroindole-2-carboxylique (Oic) en position 8 le rend résistant au clivage par la CPN. Ce peptide a donc une longue durée d'action *in vivo*. Le HOE 140 est largement utilisé dans les études *in vivo* chez le cobaye, en effet, une dose de 100 nm/Kg/i.v. abolit la bronchoconstriction induite par la BK (i.v. ou inhalé) (WIRTH *et al.*, 1993). Nous avons utilisé une infusion intraveineuse de 130 nm/Kg/h, ce qui est largement nécessaire pour

inhiber la réponse. Dans la littérature, il existe seulement une étude *in vivo* qui démontre un effet inhibiteur du [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK sur l'HRB et la neutrophilie induite par une sensibilisation des cobayes à l'ovalbumine. Dans ce modèle, le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK est administré immédiatement avant l'inhalation de l'antigène à des doses de 400 µg/kg/i.v., plus 600 µg/kg/s.c. Nous avons utilisé une infusion intraveineuse de 1700 µg/kg/h de [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK, ce qui est largement nécessaire pour inhiber la réponse.

Nos résultats démontrent que l'antagoniste du récepteur B<sub>1</sub>, le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK, administré de façon intraveineuse sur une période de 24 h, diminue significativement l'éosinophilie (33 %) tandis que l'antagoniste du récepteur B<sub>2</sub>, le HOE 140, diminue significativement l'éosinophilie (42 %) et la neutrophilie (35 %) induite 24 h après l'injection intraveineuse de billes de Sephadex. Notons que ces deux antagonistes n'affectent pas le nombre de macrophages récoltés dans le LBA. Le groupe d'animaux injecté avec les billes de Sephadex ayant reçu une infusion intraveineuse de saline via les pompes osmotiques, ne démontrent pas d'augmentation significative du nombre de macrophages (Figure 7). Nous n'avons donc pu observer un effet inhibiteur du HOE 140 ou du [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK sur la population de macrophages étant donné qu'il n'y avait pas d'augmentation entre le groupe de cobayes témoins saline et le groupe de cobayes injectés avec les billes de Sephadex. L'anesthésie des cobayes et la chirurgie effectuée lors de l'implantation des pompes osmotiques pourraient être une explication possible de l'absence de l'influx de macrophages suite à l'injection des billes de Sephadex. Car, dans notre deuxième série d'expériences (figure 6 et 8), nous avons démontré une augmentation significative du nombre de macrophages, résultat qui concorde parfaitement avec nos résultats antérieurs (MAGHNI *et al.*, 1993).

Concomitant avec la diminution du nombre d'éosinophiles par les antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>, nous notons une diminution de l'activité EPO totale retrouvée dans les liquides du LBA. Cette diminution correspond à la diminution du nombre d'éosinophiles dans les liquides du LBA des cobayes ayant reçu les antagonistes.

L'inhibition de l'éosinophilie et de la neutrophilie par le HOE 140 suggère l'implication de la BK endogène, formée en réponse à l'inflammation provoquée par l'injection intraveineuse des billes de Sephadex, dans la migration des leucocytes au niveau de la lumière pulmonaire. La BK pourrait donc jouer un rôle important dans le maintien de l'inflammation des voies aériennes chez le cobaye. Nos résultats sont en accord avec ceux de FARMER *et al.* (1992), qui ont démontré que le NPC 349, un antagoniste du récepteur B<sub>2</sub>, inhibe l'éosinophilie et la neutrophilie pulmonaire induite par une sensibilisation des cobayes à l'ovalbulmine. Plusieurs antagonistes du récepteur B<sub>2</sub> démontrent des effets bénéfiques dans différents modèles animaux d'asthme. Par exemple, le prétraitement des moutons ayant une hypersensibilité à *Ascaris suum* avec le NPC 567, un antagoniste du récepteur B<sub>2</sub>, abolit l'HRB et diminue l'inflammation des voies aériennes (SOLER *et al.*, 1990). De plus, l'inhalation d'un antagoniste du récepteur B<sub>2</sub> prévient l'HRB et diminue de façon marquée le nombre d'éosinophiles présents dans les sections de tissus provenant des voies aériennes de cobayes sensibilisés par des expositions répétées à l'allergène (FARMER *et al.*, 1992). Ces résultats supportent l'activité anti-inflammatoire des antagonistes du récepteur B<sub>2</sub> sur l'infiltration de leucocytes dans les voies aériennes de cobayes.

L'inhibition de l'éosinophilie par le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK suggère que la DBK, métabolite actif de la BK, serait aussi impliquée dans la migration cellulaire pulmonaire induite par le Sephadex. Ce résultat est surprenant car à ce jour, la présence du récepteur B<sub>1</sub> n'a jamais été démontré chez le cobaye. Cependant, FARMER *et al.*, ont démontré que cet antagoniste est capable d'inhiber la neutrophilie pulmonaire des cobayes sensibilisés à l'ovalbumine. Le recrutement de leucocytes dans notre modèle d'inflammation pulmonaire n'implique pas les mécanismes dépendants des IgE (modèle non-allergène), alors les types cellulaires recrutés et, par conséquent inhibés par les antagonistes, peuvent varier d'un modèle à l'autre.

Suite aux résultats obtenus avec le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK, nous avons utilisé un antagoniste du récepteur B<sub>1</sub> nouvellement décrit, le B 9858, et un antagoniste non-sélectif des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>, le B 9430, afin de confirmer l'implication potentielle du récepteur B<sub>1</sub> dans le recrutement de leucocytes dans notre modèle d'inflammation pulmonaire. Les deux antagonistes sont administrés par la voie intrapéritonéale 1h après l'injection des billes de Sephadex. Des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que le B 9858 est un puissant antagoniste du récepteur B<sub>1</sub> et est très résistant au métabolisme (STEWART *et al.*, 1996). La fonction majeure de l'indanylglycine (Igl) en position 5 et 7, est de conférer à cet analogue la résistance contre les enzymes de dégradation (GERA *et al.*, 1996). STEWART *et al.*, (1996) ont démontré que le B 9858 est environ 50 fois plus puissant que le Lys[Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK pour inhiber l'effet vasodépresseur de la DBK chez le chien. De plus, dans ce modèle, la durée d'action *in vivo* du Lys[Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK est de 15 min, comparée à la durée d'action du B 9858 qui est de 4 h. Le B 9430 est un puissant antagoniste des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>, ayant lui aussi une

longue durée d'action *in vivo*. Chez le chien, le B 9430 a une puissance équivalente au HOE 140 pour inhiber l'effet vasodépresseur de la BK, et une puissance équivalente au Lys[Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK pour inhiber l'effet vasodépresseur de la DBK. STEWART *et al.*, (1996, 1997) ont démontré qu'une simple injection sous-cutanée de B 9430 (30 µg Kg<sup>-1</sup>) inhibe la réponse hypotensive de la BK en 5 min chez le lapin, et cet effet inhibiteur est maintenu durant 24 h. Aussi, le B 9430 est équivalent au HOE 140 pour inhiber l'hyperalgésie induite par la carragénine chez le rat. Nous nous sommes basés sur ces études pour déterminer la dose et la voie d'administration utilisée pour ces 2 antagonistes dans notre modèle d'inflammation.

D'autre part, l'antagoniste non-sélectif des récepteurs B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub>, le B 9430 (1 mg Kg<sup>-1</sup>), induit une inhibition plus marquée que le B 9858 sur l'éosinophilie pulmonaire induite par le Sephadex (35% vs 60%), et ce pour une même dose d'antagoniste (1 mg Kg<sup>-1</sup>; i.p.). Concomitant avec l'inhibition de l'éosinophilie, ces 2 antagonistes diminuent de façon marquée l'activité EPO totale retrouvée dans le surnageant du LBA. Nos résultats soutiennent donc l'implication des 2 sous-types de récepteurs des kinines dans la migration des éosinophiles dans notre modèle d'inflammation pulmonaire. Le B 9430 exerce un effet inhibiteur sur l'influx de macrophages. Les récepteurs B<sub>1</sub> et/ou B<sub>2</sub> pourraient donc jouer un rôle dans le recrutement des macrophages dans la lumière pulmonaire des cobayes injectés au Sephadex.

Comme le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK et le B 9858 n'ont pas d'effet sur la neutrophilie et que l'inhibition de la neutrophilie par le B 9430 est comparable à celle exercée par le HOE 140 (45% vs 35%), bien que les voies d'administration et les doses d'antagonistes

soient différentes, cela suggère que seul le récepteur  $B_2$  serait impliqué dans la migration des neutrophiles. Les mécanismes responsables du recrutement des leucocytes au niveau du poumon de cobayes suite à l'injection des billes de Sephadex sont très complexes et ne sont pas clairement établis. La cinétique de la migration des cellules inflammatoires dans les poumons de cobayes, suite à l'injection des billes de Sephadex, a démontré que l'infiltration des neutrophiles se produisait avant celle des éosinophiles. Cela suggère que l'éosinophilie et la neutrophilie seraient probablement contrôlées par des mécanismes différents.

### 11.3 Effets de la bradykinine sur l'infiltration cellulaire pulmonaire

Afin de mieux comprendre les rôles des récepteurs  $B_1$  et  $B_2$  dans l'infiltration cellulaire pulmonaire, nous avons tenté d'induire une inflammation pulmonaire par l'injection intratrachéale d'agonistes des récepteurs  $B_1$  et  $B_2$ . Nous avons d'abord évalué l'habileté de la BK à induire une infiltration cellulaire pulmonaire chez le cobaye sain. Comme le récepteur  $B_2$  est bien caractérisé chez le cobaye, cela nous permet de valider la méthode utilisée. Nos résultats démontrent que l'instillation intratrachéale de BK ( $1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) augmente de 2.8 fois le nombre d'éosinophiles et de 1.3 fois le nombre de macrophages récoltés dans les liquides du LBA, 3 h après l'injection de la BK. Notons que la BK augmente aussi de 2.2 fois le nombre de neutrophiles, bien que cette augmentation ne soit pas considérée significative. L'influx d'éosinophiles, de macrophages et de neutrophiles est totalement inhibé par le HOE 140. Cela suggère que les effets pro-inflammatoires exercés par la BK dans ce modèle, sont médiés exclusivement par l'activation du récepteur  $B_2$ . Il est peu probable que le BK soit



métabolisé en DBK car le HOE 140 inhibe complètement l'influx cellulaire. Nos résultats sont en accord avec ceux de SALEH *et al.* (1997), qui ont démontré une migration de neutrophiles et de cellules mononucléaires dans la cavité pleurale de souris suite à l'injection intrathoracique de BK. De plus, la BK est capable d'induire une neutrophilie et une éosinophilie dans la cavité pleurale lorsqu'injectée chez le rat. Bien que nous ne pouvions pas comparer les résultats obtenus, il est évident que la BK est capable d'induire une infiltration cellulaire via l'activation du récepteur B<sub>2</sub> dans ces 3 modèles expérimentaux (cobaye, souris et rat). Nos résultats montrent donc que les types cellulaires recrutés au site d'inflammation peuvent varier en fonction de l'espèce et du modèle expérimental utilisé. Bien que les effets de la BK soient moins prononcés que ceux évoqués par des agents non-spécifiques (Sephadex, carragénine), nos résultats fournissent une évidence que la BK contribue à l'initiation de la réponse inflammatoire.

#### 11.4 Effets de la bradykinine sur la perméabilité bronchoalvéolaire

L'injection intratrachéale de BK, en plus d'induire une infiltration cellulaire, induit une extravasation de l'albumine dans les liquides bronchoalvéolaires 3 h après l'injection de BK. Il est bien connu que la BK induit une augmentation de la perméabilité au niveau des voies aériennes de cobayes (SARIA *et al.*, 1983 ; ROGERS *et al.*, 1990). La distribution du récepteur B<sub>2</sub> au niveau du poumon de cobaye suggère que la BK exercerait une action directe sur le muscle lisse des voies aériennes périphériques et une action indirecte sur les voies aériennes centrales. L'augmentation de la perméabilité et l'œdème provoqué par la BK au niveau des voies aériennes de cobayes résultent de l'activation du récepteur B<sub>2</sub>. Nos résultats soutiennent cette

hypothèse car le HOE 140 inhibe totalement l'augmentation de la quantité d'albumine dans les liquides du LBA, 3 h après l'injection de BK. Nos résultats sont en accord avec ceux de SAKAMOTO *et al.*, (1992), qui ont démontré que l'inhalation de BK induisait une augmentation de la perméabilité microvasculaire au niveau des voies aériennes de cobayes et cet effet était totalement inhibé par le HOE 140.

### 11.5 Induction d'une réponse inflammatoire par la desArg<sup>9</sup>-BK

Suite aux résultats obtenus avec la BK, nous avons étudié l'implication du récepteur B<sub>1</sub> dans la réponse inflammatoire induite par l'administration intratrachéale de DBK chez le cobaye. Nos résultats démontrent que l'instillation intratrachéale de DBK (10 µg Kg<sup>-1</sup>) induit une réponse inflammatoire significative caractérisée par une augmentation de la perméabilité bronchoalvéolaire associée à une infiltration cellulaire, principalement d'éosinophiles et de neutrophiles. En effet, l'agoniste du récepteur B<sub>1</sub>, (DBK; 10 µg Kg<sup>-1</sup>), induit une augmentation de 1.7 fois du nombre d'éosinophiles comparé à une augmentation de 2.8 fois par l'agoniste du récepteur B<sub>2</sub> (BK; 1 µg Kg<sup>-1</sup>), 3 h après l'injection des agonistes. Cependant, l'éosinophilie induite par la DBK (5 h; 4.46 x 10<sup>6</sup> cellules) est comparable à celle induite par la BK (3 h; 5.52 x 10<sup>6</sup> cellules). La BK augmente de 2.6 fois le nombre de neutrophiles (3 h) comparé à une augmentation de 3.8 fois par la DBK (5 h). Rappelons toutefois que même si la BK n'induit pas une neutrophilie jugée significative, le HOE 140 ramène complètement le nombre de neutrophile au niveau basal, suggérant l'implication du récepteur B<sub>2</sub>. Contrairement à la BK, la DBK n'exerce aucun effet sur la population de macrophages.

La réponse inflammatoire induite par la DBK est donc maximale 3 h (extravasation de l'albumine) et 5 h (migration cellulaire) après l'injection du peptide. Nous avons utilisé une dose de  $10\mu\text{g Kg}^{-1}$  car ce fut la dose maximale non-létale pouvant être administrée de façon intratrachéale chez le cobaye anesthésié. La réponse inflammatoire induite par la DBK semble être médiée par l'activation du récepteur  $B_1$  car : (1) l'injection intratrachéale de l'antagoniste sélectif du récepteur  $B_1$ , le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK, inhibe l'éosinophilie induite par l'instillation de DBK de façon dose-dépendante ; et (2) l'injection de l'antagoniste sélectif du récepteur  $B_2$ , le HOE 140, à une dose qui, comme nous l'avons démontré, inhibe complètement la migration cellulaire induite par la BK, n'affecte pas l'infiltration cellulaire induite par la DBK. La réponse inflammatoire causée par l'agoniste du récepteur  $B_1$  semble être médiée par l'activation d'un récepteur  $B_1$  constitutif. Cette hypothèse est basée sur les observations suivantes : (1) la réponse inflammatoire induite par la DBK commence à apparaître dès la première heure suivant l'injection du peptide (éosinophilie et extravasation de l'albumine) ; et (2) la réponse inflammatoire est induite chez des cobayes sains. Nos résultats sont en accord avec ceux de VIANNA et CALIXTO (1998) qui ont démontré que l'injection intrathoracique de DBK induit une accumulation de neutrophiles et une augmentation de la perméabilité dans l'espace pleurale chez la souris. De plus, les résultats préliminaires du groupe de PESQUERO *et al.*, (1996) suggèrent que les souris dont le gène codant pour le récepteur  $B_1$  a été délété, ont une déficience au niveau du recrutement des leucocytes aux sites d'inflammation. En effet, ils ont démontré que l'accumulation de leucocytes est réduite d'environ 65% au niveau des tissus inflammés de souris n'ayant pas de récepteur  $B_1$ . L'ensemble de ces résultats suggère donc que le récepteur  $B_1$ , tout comme le récepteur  $B_2$ , pourraient être impliqués dans le processus inflammatoire.

### 11.5.1 Effet du L-NAME et de l'indométacine sur l'infiltration cellulaire pulmonaire induite par la DBK

Plusieurs études suggèrent que certains effets des kinines induits par l'activation des récepteur B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> sont médiés indirectement par la relâche de l'oxyde nitrique (KHALIL et HELME, 1992 ; WIRTH *et al.*, 1994 ; SCHLEMPER et CALIXTO, 1994 ; NAKAMURA *et al.*, 1996). Nous avons donc évalué l'implication de ce médiateur dans l'infiltration cellulaire induite par la DBK. Le prétraitement des animaux avec le L-NAME (10 mg kg<sup>-1</sup>; i.v.) 30 min avant l'injection de la DBK, inhibe de façon significative l'éosinophilie pulmonaire. Nos résultats suggèrent donc un rôle important de l'oxyde nitrique dans l'infiltration d'éosinophiles induite par l'agoniste du récepteur B<sub>1</sub> chez le cobaye. Les kinines, en stimulant la formation de l'oxyde nitrique des cellules endothéliales, favorisent la migration des leucocytes du sang vers les tissus inflammés, le chimiotactisme et la dégranulation des leucocytes.

Cependant, contrairement à l'induction d'un œdème par la DBK chez des rats prétraités au LPS (CAMPOS *et al.*, 1996), l'infiltration de neutrophiles induit par la DBK dans notre modèle, est potentialisée par un prétraitement des animaux avec un inhibiteur de la cyclooxygénase (indométacine). Récemment, GONCALVES de MORAES *et al.*, (1996) ont démontré que l'indométacine augmente de façon significative l'infiltration de neutrophiles dans la réponse inflammatoire induite par l'administration de LPS chez la souris, un effet associé avec une augmentation de la production de TNF- $\alpha$  et la suppression de la production de PGE<sub>2</sub>. En effet, les prostaglandines sont capables de stimuler la production d'AMP<sub>c</sub> par les leucocytes, et

cette élévation d'AMP<sub>c</sub> exerce un effet inhibiteur sur la relâche de médiateurs inflammatoires.

Tout comme la BK, la DBK en plus d'induire une infiltration cellulaire, induit une extravasation de l'albumine dans les liquides bronchoalvéolaires 3 h après l'injection du peptide. Il est normal qu'une extravasation des constituants plasmatiques (albumine) soit associée à une infiltration de leucocytes.

La BK et la DBK semblent agir via des mécanismes différents pour induire l'infiltration cellulaire pulmonaire suite à l'injection intratrachéale de ces peptides. En effet, la BK induit une infiltration significative d'éosinophiles et de macrophages, tandis que la DBK induit une éosinophilie et une neutrophilie. De plus, l'éosinophilie et la neutrophilie induite 5 h après l'instillation de DBK, semblent être médiées par des mécanismes différents. En effet, l'antagoniste sélectif du récepteur B<sub>1</sub>, le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK, inhibe totalement l'éosinophilie et à l'inverse, n'a aucun effet sur la neutrophilie, suggérant un mécanisme indépendant du récepteur B<sub>1</sub>, comme par exemple un mécanisme non-réceptoriel, ou bien la neutrophilie serait un effet non-spécifique. Il serait donc intéressant d'approfondir notre étude sur la localisation des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> au niveau des leucocytes.

## 11.6 Effet vasodépresseur des kinines

La BK fut d'abord reconnue pour son effet vasodépresseur. Il est bien connu que la BK exerce une vasodépression marquée lorsqu'injectée de façon intraartérielle chez le cobaye. Par contre, aucune étude à ce jour ne rapporte d'effet de la DBK sur le système cardio-vasculaire chez le cobaye. Nous avons donc voulu comparer l'effet de la BK et de la DBK sur la pression artérielle de cobayes sains et injectés avec les billes de Sephadex. NAKHOSTINE *et al.*, (1993) furent les premiers à démontrer l'effet vasodépresseur dose-dépendant de la DBK chez le chien n'ayant aucune pathologie apparente. Cet effet a été largement étudié dans les conditions pathologiques, par exemple suite à une dose sub létale de LPS chez le lapin (REGOLI *et al.*, 1981). Pour cette raison, nous avons comparé l'effet hypotenseur de la DBK et de la BK des cobayes sains avec les cobayes injectés avec les billes de Sephadex. Nos résultats démontrent que l'injection intraartérielle de l'agoniste du récepteur B<sub>1</sub> (DBK), exerce un effet vasodépresseur similaire à l'agoniste du récepteur B<sub>2</sub> (BK), et ce à des doses de 50 à 200 fois supérieures à la BK. Ceci est en accord avec les résultats qui démontrent que l'agoniste du récepteur B<sub>1</sub> possède moins de 1% de l'activité de la BK sur la pression sanguine chez le cobaye sain (REGOLI et BARABÉ, 1980 ; BHOOOLA *et al.*, 1992). Des études rapportent que la réponse vasodépressive induite par l'injection intraveineuse de BK est plus faible que celle induite par l'administration intraartérielle de ce peptide. Ceci s'explique par le fait que 80-95% de l'activité biologique de la BK est inactivée par l'ECA lors de son passage dans la circulation pulmonaire (REGOLI et BARABÉ, 1980). C'est pourquoi nous avons injecté les deux agonistes de façon intraartérielle. De plus, l'effet vasodépresseur exercé par la BK et/ou la DBK est

semblable chez le cobaye sain et le cobaye injecté au Sephadex. Ces résultats suggèrent que l'injection des billes de Sephadex n'induit pas la synthèse *de novo* des récepteurs B<sub>1</sub> au niveau vasculaire, et l'effet vasodépresseur de la BK implique l'activation du récepteur B<sub>2</sub> constitutif, ce qui est en accord avec la littérature. Donc, chez le cobaye, le récepteur B<sub>1</sub> ne joue pas un rôle physiologique important sur la régulation de la pression sanguine et ce rôle n'est pas augmenté par l'induction d'une inflammation par l'injection de billes de Sephadex.

### 11.7 Effets des kinines sur la PIP

L'injection intraveineuse de BK provoque une bronchoconstriction chez le cobaye (ICHINOSE *et al.*, 1990 ; SAKAMOTO *et al.*, 1992 ). Cependant, notre étude démontre que l'injection intraartérielle de BK (0.05 à 10 µg/kg) n'a aucun effet sur la PIP des cobayes anesthésiés et ventilés mécaniquement. Cette absence de réponse peut se justifier par les doses qui sont plus faibles que celles utilisées par SAKAMOTO *et al.*, (1992), et par la voie d'administration utilisée (i.a. vs i.v.). Il est connue que la BK peut induire une bronchoconstriction selon différents mécanismes dépendant de la voie d'administration utilisée. La BK i.v. provoque une bronchoconstriction via la relâche des produits de la COX et la BK inhalée, induit une bronchoconstriction via des mécanismes cholinergiques et par la relâche des produits de la COX et est médié par l'activation du récepteur B<sub>2</sub> (ICHINOSE *et al.*, 1990). Dans notre étude, à la dose de 10 µg/kg de BK, les cobayes anesthésiés démontraient des spasmes musculaires. Ces spasmes étaient probablement dus à l'activation des fibres afférentes sensorielles par la BK. L'injection intraartérielle de la BK évite les effets secondaires dus à la stimulation

des autres tissus, mais induit une augmentation rapide de l'activité des fibres afférentes et initie les réflexes pseudo-moteur, ce qui indique une production de douleur. Pour cette raison, nous n'avons pas augmenté les doses de BK utilisées.

Chez le cobaye sain, il a été démontré que la DBK ne provoquait pas de bronchoconstriction (WIRTH *et al.*, 1993). Nos résultats démontrent que la DBK (10 à 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) augmente de façon marquée la PIP des cobayes injectés avec les billes de Sephadex comparé à la PIP observée chez les cobayes sains. À notre connaissance, aucune étude n'a démontré un rôle de l'agoniste du récepteur  $B_1$  dans l'hyperréactivité bronchique. Le déplacement vers la gauche de la courbe dose-réponse des animaux traités au Sephadex indique une hypersensibilité des voies aériennes des cobayes suite à l'injection des billes de Sephadex. Donc, les cobayes traités au Sephadex démontrent une hyperréactivité pulmonaire marquée à la DBK comparés aux cobayes sains.

Tous les résultats obtenus jusqu'à présent suggèrent la présence d'un récepteur  $B_1$  chez le cobaye. Cependant, à ce jour, aucune étude ne rapporte la présence de ce récepteur au niveau des tissus de cobayes. Pour cette raison, nous avons vérifié la réactivité des tissus pulmonaires de cobayes à l'agoniste du récepteur  $B_1$ .

#### 11.8 Réactivité des tissus pulmonaires de cobayes à l'agoniste du récepteur $B_1$

La présente étude décrit pour la première fois l'implication de l'agoniste du récepteur  $B_1$  dans la réponse contractile des tissus pulmonaires de cobayes. Nos résultats démontrent que la trachée et les bronches supérieures de cobayes sains



contractent de façon significative suite aux injections de DBK, et cette réponse augmente en fonction du temps d'incubation. La réponse est maximale après 5 h d'incubation des tissus *in vitro*. La bronche inférieure prélevée chez le cobaye sain ne répond pas à la DBK, suggérant l'absence du récepteur B<sub>1</sub> au niveau de ce tissu. Le récepteur B<sub>1</sub> n'est généralement pas exprimé au niveau des tissus pulmonaires des animaux et c'est le récepteur B<sub>2</sub> qui médie la plupart des effets biologiques des kinines au niveau des voies aériennes (FARMER, 1991). Il est donc surprenant que le récepteur B<sub>1</sub>, jamais caractérisé chez le cobaye et généralement induit suite à une pathologie, soit présent au niveau des tissus pulmonaires de cobayes sains. Cela soutient la présence d'un récepteur B<sub>1</sub> constitutif chez le cobaye, confirmant les résultats obtenus dans l'étude *in vivo*.

Les expériences *in vitro* faites chez le lapin démontrent que les tissus prélevés des animaux prétraités au LPS exhibent une réponse fonctionnelle aux agonistes du récepteur B<sub>1</sub>, dès la première d'incubation *in vitro*, contrairement à l'absence de réponse des tissus provenant des animaux sains (REGOLI *et al.*, 1981). Nous avons donc étudié l'effet de la DBK sur les tissus pulmonaires prélevés 24 h après l'injection des billes de Sephadex.

Nos résultats démontrent que la trachée, les bronches supérieures et inférieures ont une sensibilité plus marquée à la DBK, 24 h après l'injection des billes de Sephadex, sans que les réponses contractiles au carbachol en soient affectées (trachée et bronche supérieure). Il est intéressant de noter que les bronches inférieures prélevées 24 h après l'injection des billes de Sephadex, répondent à la DBK, contrairement à l'absence de

réponse des bronches inférieures de cobayes sains. Cependant, les bronches inférieures démontrent aussi une hyperréactivité au carbachol suite au traitement au Sephadex, ce qui est en accord avec nos résultats précédents (NOGUERIA de FRANCISCHI *et al.*, 1993). Nous observons donc une hyperréactivité non-spécifique à la DBK de la bronche inférieure suite au traitement avec les billes de Sephadex.

Afin de s'assurer que la réponse contractile à la DBK est médiée par l'activation du récepteur B<sub>1</sub>, nous avons utilisé trois antagonistes du récepteur B<sub>1</sub> : le R 715, le B 9858 et le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK. Pour cette série d'expériences, nous avons utilisé l'aorte de lapin comme tissu de référence. L'aorte isolé de lapin est un modèle de choix pour l'étude de la synthèse *de novo* du récepteur B<sub>1</sub> parce que les aortes prélevées des animaux sains sont initialement insensibles à la DBK (DEBLOIS *et al.*, 1988). Il est connu que l'aorte de lapin ne répond pas à la DBK durant la première d'incubation *in vitro*, et la réponse contractile à la DBK qui se développe en fonction du temps d'incubation, peut être prévenu si les tissus sont continuellement traités avec un inhibiteur de synthèses protéiques (cycloheximide) (DEBLOIS *et al.*, 1991). À notre grande surprise, aucun des trois antagonistes n'a inhibé la réponse contractile à la DBK au niveau de la trachée et des bronches supérieures de cobayes sains. Par contre, les trois antagonistes ont complètement inhibé la réponse contractile à la DBK au niveau de l'aorte de lapin. Cela soulève plusieurs questions, dont l'hypothèse de l'existence d'un sous-type de récepteur des kinines au niveau des voies aériennes de cobayes. En 1989, le groupe de Farmer a postulé l'existence d'un récepteur de type B<sub>3</sub> au niveau des tissus pulmonaires de cobayes. De plus, CABRINI et CALIXTO (1997) ont démontré que la DBK induit une contraction de la vésicule biliaire de cobayes *in vitro* qui augmente en

fonction du temps et qui est dépendante de la synthèse de protéine. Cependant, cette contraction n'est pas inhibée par le [Leu<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>-BK mais est inhibée par le HOE 140, suggérant la présence d'un récepteur B<sub>2</sub> inductible. Dans notre étude, nous savons que la réponse de la DBK n'est pas médiée par l'activation du récepteur B<sub>2</sub>, car le HOE 140 n'a eu aucun effet sur la réponse contractile induite par la DBK. Il serait intéressant de poursuivre les recherches afin de déterminer le mécanisme responsable de l'effet contractile de la DBK au niveau des tissus pulmonaires de cobayes. Des essais de liaisons ou bien une approche moléculaire permettraient sûrement de clarifier les résultats obtenus.

## CONCLUSION

Les résultats présentés dans cet ouvrage suggèrent que :

- 1- l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye conscient induit une éosinophilie et une neutrophilie pulmonaire importante.
- 2- les antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> ont une activité anti-inflammatoire sur le recrutement de leucocytes induit par l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye.
- 3- le récepteur B<sub>1</sub> serait impliqué dans le recrutement des éosinophiles tandis que le récepteur B<sub>2</sub> serait impliqué dans le recrutement des éosinophiles et des neutrophiles dans notre modèle d'inflammation pulmonaire.
- 4- l'agoniste du récepteur B<sub>2</sub>, la bradykinine, lorsqu'injecté de façon intratrachéale, est capable d'induire une infiltration d'éosinophiles et de macrophages au niveau du poumon de cobaye sain et cet effet serait médié exclusivement par l'activation du récepteur B<sub>2</sub>.
- 5- l'agoniste du récepteur B<sub>1</sub>, la desArg<sup>9</sup>-BK, lorsqu'injecté de façon intratrachéale, est capable d'induire une infiltration d'éosinophiles et de neutrophiles au niveau du poumon de cobaye sain et cet effet serait médié, en partie, par l'activation du récepteur B<sub>1</sub>.

- 6- les agonistes des récepteurs  $B_1$  et  $B_2$ , en plus d'induire une infiltration cellulaire pulmonaire, induisent une extravasation plasmatique de l'albumine dans les liquides bronchoalvéolaires.
- 7- l'oxyde nitrique serait un second messenger impliqué dans le recrutement des éosinophiles induit par la DBK.
- 8- les cobayes injectés avec les billes de Sephadex démontrent une hyperréactivité bronchique à la DBK 24 h après l'injection des billes.
- 9- la trachée et la bronche supérieure de cobayes sains ont une réponse contractile à la DBK, et cette réponse augmente en fonction du temps d'incubation *in vitro*.
- 10- la trachée, les bronches supérieures et inférieures de cobayes injectés avec les billes de Sephadex démontrent une hyperréactivité à la DBK.
- 11- l'existence d'un sous-type de récepteur  $B_1$  au niveau des voies aériennes de cobayes.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats suggère que les kinines endogènes, bradykinine et desArg<sup>9</sup>-BK, seraient impliquées dans le recrutement de leucocytes dans notre modèle d'inflammation pulmonaire induit par le Sephadex, et ce via l'activation des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>. De plus, l'induction d'une réponse inflammatoire par les agonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>, suggère un rôle potentiel de ces récepteurs dans l'initiation de la réponse inflammatoire au niveau des voies aériennes de cobayes. Cette réponse inflammatoire est caractérisée par une infiltration cellulaire pulmonaire, une extravasation plasmatique de l'albumine, une vasodilatation et une bronchoconstriction, toutes des caractéristiques retrouvées dans la physiopathologie de l'asthme. Nos résultats ouvrent donc une porte sur une nouvelle approche thérapeutique : l'utilisation des antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> dans le traitement de l'asthme.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais dédier ce mémoire à mes deux enfants, Marc-Philip et Julien, qui m'ont donnée la force, le courage et la volonté de mener cet ouvrage à terme.

Je voudrais remercier sincèrement le Dr. Pierre Sirois de m'avoir accueillie dans son laboratoire de recherche. Je voudrais le remercier de la grande confiance et de la latitude qu'il m'a accordée durant ces deux années de recherche. Je profite aussi de cette occasion pour remercier le Dr. Domenico Regoli pour toutes les discussions enrichissantes sur les kinines et pour l'attention qu'il a portée à mes travaux de recherches.

Je voudrais remercier les membres du jury, soit le Dr. Pierre Sirois, le Dr. Domenico Regoli et le Dr. Jana Stankova, pour avoir corrigé cet ouvrage avec grande attention, visant à améliorer la qualité de mon travail.

Mes remerciements vont aussi au Dr. Fernand Gobeil qui a répondu si brillamment à mes nombreuses questions et à madame Solange Cloutier pour ses conseils judicieux, son support technique et son amitié.

Ce travail a finalement vu le jour grâce au support de mes parents, Gilles et Ghislaine, et de mon conjoint, Martin. Merci infiniment de vos encouragements.

## BIBLIOGRAPHIE

- ABE, K., WATANABE, N., KUMAGAI, N., MOURI, T., SEKI, T. et YOSHINAGA, K. (1967) Circulating kinin in patients with bronchial asthma. *Experientia*. **23** : 626-627.
- ABE LOUS, J.E., et BARDIER, E. (1909) Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *C.R. Seances Soc. Biol.* **66** : 511.
- ABRAHAM, W.M., AHMED, A., CORTES, A., SOLER, M., FARMER, S.G., BAUGH, L.E. et HARBESON, S.L. (1991) Airway effects of inhaled bradykinin, substance P, and neurokinin A in sheep. *J. Allergy Clin. Immunol.* **87** : 557-564.
- ABRAHAM, W.M., BURCH, R.M., FARMER, S.G., SIELCZAK, M.W., AHMED, A. et CORTES, A. (1991) A bradykinin antagonist modifies allergen-induced mediator release and late bronchial responses in sheep. *Am. Rev. Respir. Dis.* **143** : 787-796.
- AHLUWALIA, A. et PERRETTI, M. (1996) Involvement of bradykinin B1 receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 beta in vivo in the mouse. *J. Immunol.* **156** : 269-274.
- ALHENC-GELAS, F., WEARE, J.A., JOHNSON, R.L. Jr. et ERDŐS, E.G. (1983) Measurement of human converting enzyme level by direct radioimmunoassay. *J. Lab. Clin. Med.* **101** : 83-96.



- AVERILL, F.J., HUBBARD, W.C., PROUD, D., GLEICH, G.J. et LIU, M.C. (1992) Platelet activation in the lung after antigen challenge in a model of allergic asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145** : 571-576.
- BARNES, P.J. (1989) New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **83** : 1013-1026.
- BARNES, P.J. (1992) Effect of bradykinin on airway function. *Agents Actions Suppl.* **38**: 432-438.
- BATTISTO, J.R., CHIAPETTA, G. et HIXON, R. (1968) Immunologic responses of guinea pigs to dextran. *J. Immunol.* **101** : 203-209.
- BAUMGARTEN, C.R., NICHOLS, R.C., NACLERIO, R.M. et PROUD, D. (1986) Concentrations of glandular kallikrein in human nasal secretions increase during experimentally induced allergic rhinitis. *J. Immunol.* **137** : 1323-1328.
- BAUMGARTEN, C.R., SCHWARTING, R. et KUNKEL, G. (1989) Localization of glandular kallikrein in nasal mucosa of allergic and nonallergic individuals. *Adv. Exp. Med. Biol.* **247** : 523-528.
- BERTRAND, C., NADEL, J.A., YAMAWAKI, I. et GEPPETTI, P. (1993) Role of kinins in the vascular extravasation evoked by antigen and mediated by tachykinins in guinea pig trachea. *J. Immunol.* **151** : 4902-4907.

BHoola, K.D., Figueroa, C.D. et Worthy, K. (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* **44** : 1-80.

Campos, M.M., Souza, G.E. et Calixto, J.B. (1996) Upregulation of B1 receptor mediating des-Arg<sup>9</sup>-BK-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin. *Br. J. Pharmacol.* **117** : 793-798.

Cabrini, D.A. et Calixto, J.B. (1997) Characterization of des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin-induced contraction in guinea-pig gallbladder in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **331** : 31-38.

Carl, V.S., Moore, E.E., Moore, F.A. et Whalley, E.T. (1996) Involvement of bradykinin B1 and B2 receptors in human PMN elastase release and increase in endothelial cell monolayer permeability. *Immunopharmacology.* **33** : 325-329.

Carlos, T.M. et Harlan, J.M. (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, **84** : 2068-2101.

Chao, J., Chai, K.X., Chen, L.M., Xiong, W., Chao, S., Woodley-Miller, C., Wang, L.X., Lu, H.S. et Chao, L. (1990) Tissue kallikrein-binding protein is a serpin. I. Purification, characterization, and distribution in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Biol. Chem.* **265** : 16394-16401.

CHAO, J., CHAO, L., WOODLEY-MILLER, C., GERALD, W. et MARGOLIUS, H.S. (1986) Active kallikrein, preprokallikrein, and kallikrein-inhibitor complex. *Adv. Exp. Med. Biol.* **198** : 181-187.

CHODIMELLA, V., SKIDGEL, R.A., KROWIAK, E.J. et MURLAS, C.G. (1991) Lung peptidases, including carboxypeptidase, modulate airway reactivity to intravenous bradykinin. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144** : 869-874.

CHRISTIANSEN, S.C., PROUD, D. et COCHRANE, C.G. (1987) Detection of tissue kallikrein in the bronchoalveolar lavage fluid of asthmatic subjects. *J. Clin. Invest.* **79** : 188-197.

CONNELLY, J.C., SKIDGEL, R.A., SCHULZ, W.W., JOHNSON, A.R. et ERDŐS, E.G. (1985) Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82** : 8737-8741

DEBLOIS, D., BOUTHILLIER, J. et MARCEAU, F. (1988) Effect of glucocorticoids, monokines and growth factors on the spontaneously developing responses of the rabbit isolated aorta to des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin. *Br. J. Pharmacol.* **93** : 969-977.

DEBLOIS, D., BOUTHILLIER, J. et MARCEAU, F. (1991) Pulse exposure to protein synthesis inhibitors enhances vascular responses to des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin: possible role of interleukin-1. *Br. J. Pharmacol.* **103** : 1057-1066.

DESMAZES, N., LOCKHART, A., LACROIX, H. et DUSSER, D.J. (1992) Carboxypeptidase M-like enzyme modulates the noncholinergic bronchoconstrictor response in guinea pig. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7 : 477-484.

DeWITT, B.J., CHENG, D.Y. et KADOWITZ, P.J. (1994) des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin produces tone-dependent kinin B1 receptor-mediated responses in the pulmonary vascular bed. *Circ. Res.* 75 : 1064-1072.

DJUKANOVIC, R. (1994) Asthma of mice and men, how do animal models help us understand human asthma ? *Clin. Exp. Allergy* 24 : 6-9.

DOUMAS, B.T., WATSON, W.A. et BIGGS, H.G. (1971) Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim. Acta.* 31 : 87-96.

DRAPEAU, G., DEBLOIS, D. et MARCEAU, F. (1991) Hypotensive effects of Lys-des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin and metabolically protected agonists of B1 receptors for kinins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259 : 997-1003.

DRAPEAU, G. et REGOLI, D. (1988) Synthesis of bradykinin analogues. *Methods Enzymol.* 163 : 263-272.

DRAY, A. et PERKINS, M. (1993) Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* 16 : 99-104.

DROUIN, J.N., GAUDREAU, P., ST-PIERRE, S.A. et REGOLI, D. (1979) Structure-activity studies of [des-Arg<sup>9</sup>]-bradykinin on the B<sub>1</sub> receptor of the rabbit aorta. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **57** : 562-566.

DROUIN, J.N., ST-PIERRE, S.A. et REGOLI, D. (1979) Receptors for bradykinin and kallidin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **57** : 375-379.

ERDŐS, E.G. (1961) Enzymes that inactivate active polypeptides. *Biochem. Pharmacol.* **8** : 112 P.

ERDŐS, E.G. (1979) In « Handbook of Experimental Pharmacology » Vol.25 suppl. (ed E.R. Erdős), pp.427-448. Springer-Verlag, Heidelberg.

ELLIOT, D.F., HORTON, E.W. et LEWIS, G.P. (1960) Actions of pure bradykinin. *J. Physiol.* **153** : 473-480.

FARMER, S.G. (1991) Bradykinin-induced airway microvascular leakage and bronchoconstriction are mediated via a bradykinin B<sub>2</sub> receptor. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144** : 237-239.

FARMER, S.G., BURCH, R.M., MEEKER, S.A. et WILKINS, D.E. (1989) Evidence for a pulmonary B<sub>3</sub> bradykinin receptor. *Mol. Pharmacol.* **36** : 1-8.

FARMER, S.G., WILKINS, D.E., MEEKER, S.A., SEEDS, E.A. et PAGE, C.P. (1992) Effects of bradykinin receptor antagonists on antigen-induced respiratory distress, airway hyperresponsiveness and eosinophilia in guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.* **107** : 653-659.

FEATHERSTONE, R.L., PARRY, J.E. et CHURCH, M.K. (1996) The effects of a kinin antagonist on changes in lung function and plasma extravasation into the airways following challenge of sensitized guinea-pigs. *Clin. Exp. Allergy.* **26** : 235-240.

FENOY, F.J. et ROMAN, R.J. (1992) Effect of kinin receptor antagonists on renal hemodynamic and natriuretic responses to volume expansion. *Am. J. Physiol.* **263** : R1136-R1140.

FERREIRA, S.H. et VANE, J.R. (1967) Half-lives of peptides and amines in the circulation. *Nature.* **215** : 1237-1240.

FIELD, J.L., HALL, J.M. et MORTON, I.K. (1992) Putative novel bradykinin B3 receptors in the smooth muscle of the guinea-pig taenia caeci and trachea. *Agents Actions Suppl.* **38** : 540-545.

FIGUEROA, C.D., HENDERSON, L.M., KAUFMANN, J., De La CADENA, R.A., COLMAN, R.W., MULLER-ESTERL, W. et BHOOLA, K.D. (1992) Immunovisualization of high (HK) and low (LK) molecular weight kininogens on isolated human neutrophils. *Blood.* **79** : 754-759.

FIGUEROA, C.D., MACIYER, A.G. et BHOOLA, K.D. (1989) Identification of a tissue kallikrein in human polymorphonuclear leucocytes. *Br. J. Haematol.* **72** : 321-328.

FRIGAS, E., MOTOJIMA, S. et GLEICH, G.J. (1991) The eosinophilic injury to the mucosa of the airways in the pathogenesis of bronchial asthma. *Eur. Respir. J. Suppl.* **13** : 123s-135s.

FULLER, R.W., DIXON, C.M., CUSS, F.M. et BARNES, P.J. (1987) Bradykinin-induced bronchoconstriction in humans. Mode of action. *Am. Rev. Respir. Dis.* **135** : 176-180.

GAFFORD, J.T., SKIDGEL, R.A., ERDŐS, E.G. et HERSH, L.B. (1983) Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. *Biochemistry* . **22** : 3265-3271.

GEPPETTI, P. (1993) Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul. Pept.* **47** : 1-23.

GERA, L., STEWART, J.M., WHALLEY, E., BURKARD, M. et ZUZACK, J.S. (1996) A new class of potent bradykinin antagonist dimers. *Immunopharmacology* . **33** : 178-182.

GONCALVES de MORAES, V.L., BORIS, VARGAFTIG, B., LEFORT, J., MEAGER, A. et CHIGNARD, M. (1996) Effect of cyclo-oxygenase inhibitors and modulators of cyclic AMP formation on lipopolysaccharide-induced neutrophil infiltration in mouse lung. *Br. J. Pharmacol.* **117** : 1792-1796.

GRAZIANO, F.M., COOK, E.B. et STAHL, J.L. (1999) Cytokines, chemokines, RANTES and eotaxin. *Allergy Asthma Proc.* **20** : 141-146.

GREENGARD, J.S. et GRIFFIN, J.H. (1984) Receptors for high molecular weight kininogen on stimulated washed human platelets. *Biochemistry.* **23** : 6863-6869.

GUSTAFSON, E.J., LUKASIEWICZ, H., WACHTFOGEL, Y.T., NORTON, K.J., SCHMAIER, A.H., NIEWIAROWSKI, S. et COLMAN, R.W. (1989) High molecular weight kininogen inhibits fibrinogen binding to cytoadhesins of neutrophils and platelets. *J. Cell. Biol.* **109** : 377-387.

HABERMANN, E. (1963) Über pH-bedingte Modifikationen des Kininliefernden  $\alpha$ -globulins (kininogen) aus Rinderserum und das Molekulargewicht von kininogen I. *Biochem. Z.* **337** : 440-448.

HAYASHI, R., YAMASHITA, N., MATSUI, S., MARUYAMA, M., SUGIYAMA, E., SUGIYAMA, S. et KOBAYASHI, M. (1998) Bradykinin stimulates interleukin-8 production by human lung fibroblasts. *Immunology* **95** : 507-511.



HENDERSON, L.M., FIGUEROA, C.D., MULLER-ESTERL, W., STAIN, A. et BHOOLA, K.D. (1992) Immunovisualisation of plasma prekallikrein and H-kininogen on human neutrophils and in human hepatocytes. *Agents Actions Suppl.* **38** : 590-594.

HERNANZ, R., ALONSO, M.J., BAENA, A.B., SALAICES, M. et MARIN, J. (1999) Mechanisms of bradykinin-induced relaxation in pig coronary arteries. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **21** : 243-251.

HERXHEIMER, H. et STRESEMANN, E. (1961) The effect of bradykinin aerosol in guinea pigs and in man. *J. Physiol.* **158** : 38P.

ICHINOSE, M., BELVISI, M.G. et BARNES, P.J. (1990) Bradykinin-induced bronchoconstriction in guinea pig in vivo: role of neural mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253** : 594-599.

ICHINOSE, M., NAKAJIMA, N., TAKAHASHI, T., YAMAUCHI, H., INOUE, H. et TAKISHIMA, T. (1992) Protection against bradykinin-induced bronchoconstriction in asthmatic patients by neurokinin receptor antagonist. *Lancet.* **340** : 1248-1251.

IGIC, R., ERDÖS, E.G., YEH, H.S., SORRELLS, K. et NAKAJIMA, T. (1972) Angiotensin I converting enzyme of the lung. *Circ. Res.* **31**Suppl 2 : 51-61.

INOKUCHI, J. et NAGAMATSU, A. (1981) Tripeptidyl carboxypeptidase activity of kininase II (angiotensin-converting enzyme). *Biochim. Biophys. Acta.* **662** : 300-307.

ISHIDA, K., KELLY, L.J., THOMSON, R.J., BEATTIE, L.L. et SCHELLENBERG, R.R. (1989) Repeated antigen challenge induces airway hyperresponsiveness with tissue eosinophilia in guinea pigs. *Appl. Physiol.* **67** : 1133-1139.

JONASSON, O. et BECKER, E.L. (1966) Release of kallikrein from guinea pig lung during anaphylaxis. *J. Exp. Med.* **123** : 509-522.

KAPLAN, A.P., KAY, A.B. et AUSTEN, K.F. (1972) A prealbumin activator of prekallikrein. 3. Appearance of chemotactic activity for human neutrophils by the conversion of human prekallikrein to kallikrein. *J. Exp. Med.* **35** : 1-97.

KELLERMANN, J., LOTTSPREICH, F., HENSCHEN, A. et MULLER-ESTERL, W. (1986) Amino acid sequence of the light chain of human high molecular mass kininogen. *Adv. Exp. Med. Biol.* **198** : 85-89.

KHALIL, Z. et HELME, R.D. (1992) The quantitative contribution of nitric oxide and sensory nerves to bradykinin-induced inflammation in rat skin microvasculature. *Brain Res.* **589** : 102-108.

KIMURA, K., INOUE, H., ICHINOSE, M., MIURA, M., KATSUMATA, U., TAKAHASHI, T. et TAKISHIMA, T. (1992) Bradykinin causes airway hyperresponsiveness and enhances maximal airway narrowing. Role of microvascular leakage and airway edema. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146** : 1301-1305.

KOYAMA, S., SATO, E., NOMURA, H., KUBO, K., MIURA, M., YAMASHITA, T., NAGAI, S. et IZUMI, T. (1999) Monocyte chemotactic factors released from type II pneumocyte-like cells in response to TNF-alpha and IL-1alpha. *Eur. Respir. J.* **13** : 820-828.

LEFORT, J., NAHORI, M.A., RUFFIE, C., VARGAFTIG, B.B. et PRETOLANI, M. (1996) In vivo neutralization of eosinophil-derived major basic protein inhibits antigen-induced bronchial hyperreactivity in sensitized guinea pigs. *J. Clin. Invest.* **97** : 1117-1121.

LEVIN, Y., SKIDGEL, R.A. et ERDÖS, E.G. (1982) Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase i). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79** : 4618-4622.

LAMKHIOUED, B., RENZI, P.M., ABI-YOUNES, S., GARCIA-ZEPADA, E.A., ALLAKHVERDI, Z., GHAFAR, O., ROTHENBERG, M.D., LUSTER, A.D. et HAMID, Q. (1997) Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *J. Immunol.* **159** : 4593-4601.

LOHMANN-MATTHES, M.L., STEINMULLER, C. et FRANKE-ULLMANN, G. (1994) Pulmonary macrophages. *Eur. Respir. J.* **7** : 1678-1689.

- LORTIE, M., REGOLI, D., RHALEB, N.E. et PLANTE, G.E. (1992) The role of B1- and B2-kinin receptors in the renal tubular and hemodynamic response to bradykinin. *Am. J. Physiol.* **262** : R72-R76.
- MADEDDU, P., EMANUELI, C., VARONI, M.V., DEMONTIS, M.P., ANANIA, V., GLORIOSO, N. et CHAO, J. (1997) Regulation of bradykinin B2-receptor expression by estrogen. *Br. J. Pharmacol.* **121** : 1763-1769.
- MAGHNI, K., BLANCHETTE, F. et SIROIS, P. (1993) Induction of lung eosinophilia and neutrophilia in guinea pigs following injection of sephadex beads. *Inflammation.* **17** : 537-550.
- MAGHNI, K., SIMARD, M.J., ARSENEAULT, D. et SIROIS, P. (1996) Kinetics of eosinophilia and eosinophil activation in the development of non-allergic bronchial hyperresponsiveness in guinea pigs injected with Sephadex beads. *Inflammation.* **20** : 523-535.
- MAK, J.C. et BARNES, P.J. (1991) Autoradiographic visualization of bradykinin receptors in human and guinea pig lung. *Eur. J. Pharmacol.* **194** : 37-43.
- MANDLE, R., Jr., COLMAN, R.W., et KAPLAN, A.P. (1976) Identification of prekallikrein and HMW-kininoggen as a circulating complex in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73** : 4179-4183.

MARSH, K.A. et HILL, S.J. (1994) Des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin-induced increases in intracellular calcium ion concentration in single bovine tracheal smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* **112** : 934-938.

MENKE, J.G., BORKOWSKI, J.A., BIERILO, K.K., MacNEIL, T., DERRICK, A.W., SCHNECK, K.A., RANSOM, R.W., STRADER, C.D., LINEMAYER, D.L. et HESS J.F. (1994) Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.* **269** : 21583-21586.

NAGAE, A., ABE, M., BECKER, R.P., DEDDISH, P.A., SKIDGEL, R.A. et ERDŐS, E.G. (1993) High concentration of carboxypeptidase M in lungs: presence of the enzyme in alveolar type I cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **9** : 221-229.

NAKAMURA, A., FUJITA, M. et SHIOMI, H. (1996) Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradykinin-induced peripheral hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* **117** : 407-412.

NAKHOSTINE, N., RIBUOT, C., LAMONTAGNE, D., NADEAU, R. et COUTURE, R. (1993) Mediation by B1 and B2 receptors of vasodepressor responses to intravenously administered kinins in anaesthetized dogs. *Br. J. Pharmacol.* **110** : 71-76.

- NOGUEIRA de FRANCISCHI, J., CONROY, D.M., MAGHNI, K. et SIROIS, P. (1993) Inhibition by rapamycin of leukocyte migration and bronchial hyperreactivity induced by injection of Sephadex beads to guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.* **110** : 1381-1386.
- NSA ALLOGHO, S., GOBEIL, F.Jr., PERRON, S.I., HESS, J.F. et REGOLI, D. (1998) Effects of kinins on isolated stomachs of control and transgenic knockout B2 receptor mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **357** : 191-196.
- PANG, L. et KNOX A.J. (1997) PGE2 release by bradykinin in human airway smooth muscle cells: involvement of cyclooxygenase-2 induction. *Am. J. Physiol.* **273** : 1132-1140.
- PESQUERO, J.B., PESQUERO, J.L., OLIVEIRA, S.M., ROSCHER, A.A., METZGER, R., GANTEN, D. et BADER, M. (1996) Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B1 receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220** : 219-225.
- REGOLI, D. et BARABÉ, J. (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* **32** : 1-46.
- REGOLI, D., MARCEAU, F. et LAVIGNE, J. (1981) Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. *Eur. J. Pharmacol.* **71** : 105-115.

- REHLI, M., KRAUSE, S.W., KREUTZ, M. et ANDREESEN, R. (1995) Carboxypeptidase M is identical to the MAX.1 antigen and its expression is associated with monocyte to macrophage differentiation. *J. Biol. Chem.* **270** : 15644-15649.
- ROCHA e SILVA, M., BERALDO, W.T. et ROSENFELD, G. (1949) Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* **156** : 261-273.
- ROGERS, D.F., DIJK, S. et BARNES, P.J. (1990) Bradykinin-induced plasma exudation in guinea-pig airways: involvement of platelet activating factor. *Br. J. Pharmacol.* **101** : 739-745.
- ROT, A., KRIEGER, M., BRUNNER, T., BISCHOFF, S.C., SCHALL, T.J. et DAHINDEN, C.A. (1992) RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J. Exp. Med.* **176** : 1489-1495.
- SAKAMOTO, T., BARNES, P.J. et CHUNG, K.F. (1993) Effect of CP-96,345, a non-peptide NK1 receptor antagonist, against substance P-, bradykinin- and allergen-induced airway microvascular leakage and bronchoconstriction in the guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.* **231** : 31-38.

- SAKAMOTO, T., ELWOOD, W., BARNES, P.J. et CHUNG, K.F. (1992) Effect of Hoe 140, a new bradykinin receptor antagonist, on bradykinin- and platelet-activating factor-induced bronchoconstriction and airway microvascular leakage in guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.* **213** : 367-373.
- SALEH, T.S., CALIXTO, J.B. et MEDEIROS, Y.S. (1997) Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. *Eur. J. Pharmacol.* **331** : 43-52.
- SARIA, A., LUNDBERG, J.M., SKOFITSCH, G. et LEMBECK, F. (1983) Vascular protein linkage in various tissue induced by substance P, capsaicin, bradykinin, serotonin, histamine and by antigen challenge. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **324** : 212-218.
- SATO, F. et NAGASAWA, S. (1988) Mechanism of kinin release from human low-molecular-mass-kininogen by the synergistic action of human plasma kallikrein and leukocyte elastase. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **369** : 1009-1017.
- SCHLEMPER, V. et CALIXTO, J.B. (1994) Nitric oxide pathway-mediated relaxant effect of bradykinin in the guinea-pig isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.* **111** : 83-88.
- SCHMAIER, A.H., KUO, A., LUNDBERG, D., MURRAY, S. et CINES, D.B. (1988) The expression of high molecular weight kininogen on human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **263** : 16327-16333.



- SCHMIDT, D., JORRES, R.A., RABE, K.F. et MAGNUSSEN, H. (1996) Reproducibility of airway response to inhaled bradykinin and effect of the neurokinin receptor antagonist FK-224 in asthmatic subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **50** : 269-273.
- SCHRIBER, R.A. et ZUCKER-FRANKLIN, D. (1974) A method for the induction of blood eosinophilia with simple protein antigens. *Cell. Immunol.* **14** : 470-474.
- SCICLI, A.G., FORBES, G., NOLLY, H., DUJOVNY, M. et CARRETERO, O.A. (1984) Kallikrein-kinins in the central nervous system. *Clin. Exp. Hypertens.* **6** : 1731-1738.
- SIEBECK, M., SPANNAGL, E., SCHORR, M., STUMPF, B., FRITZ, H., WHALLEY, E.T. et CHERONIS, J.C. (1996) Effect of combined B1 and B2 kinin receptor blockade in porcine endotoxin shock. *Immunopharmacology.* **33** : 81-84.
- SIEBECK, M., WHALLEY, E.T., HOFFMANN, H., WEIPERT, J. et FRITZ, H. (1989) The hypotensive response to des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin increases during *E. coli* septicemia in the pig. *Adv. Exp. Med. Biol.* **247** : 389-393.

SKIDGEL, R.A., BENNETT, C.D., SCHILLING, J.W., TAN, F.L., WEERASINGHE, D.K. et ERDŐS, E.G. (1988) Amino acid sequence of the N-terminus and selected tryptic peptides of the active subunit of human plasma carboxypeptidase N: comparison with other carboxypeptidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154** : 1323-1329.

SKIDGEL, R.A. et ERDŐS, E.G. (1987) Cleavage of peptide bonds by angiotensin I converting enzyme. *Agents Actions.* **22** : 289-296.

SMITH, W.B., GAMBLE, J.R. et VADAS, M.A. (1994) The role of granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors in neutrophil transendothelial migration :comparison with interleukin-8. *Exp. Hematol.* **22** : 329-334.

SMITH, J.A., WEBB, C., HOLFORD, J. et BURGESS, G.M. (1995) Signal transduction pathways for B1 and B2 bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* **47** : 525-534.

SOLER, M., SIELCZAK, M. et ABRAHAM, W.M. (1990) A bradykinin-antagonist blocks antigen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation in sheep. *Pulm. Pharmacol.* **3** : 9-15.

SORDEN, S.D., LEMANSKE, R.F. Jr. et CASTLEMAN, W.L. (1990) Pulmonary eosinophilia and granulomatous pulmonary arteritis induced in rats by intravenous Sephadex. *Vet. Pathol.* **27** : 217-222.

STEWART, J.M., GERA, L., CHAN, D.C., WHALLEY, E.T., HANSON, W.L. et ZUZACK, J.S. (1997) Potent, long-acting bradykinin antagonists for a wide range of applications. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75** : 719-724.

STEWART, J.M., GERA, L., HANSON, W., ZUZACK, J.S., BURKARD, M., McCULLOUGH, R. et WHALLEY, E.T. (1996) A new generation of bradykinin antagonists. *Immunopharmacology.* **33** : 51-60.

STRATH, M., WARREN, D.J. et SANDERSON, C.J. (1985) Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J. Immunol. Methods.* **83** : 209-215.

SUGO, T., IKARI, N., KATO, H., IWANAGA, S. et FUJII, S. (1980) Functional sites of bovine high molecular weight kininogen as a cofactor in kaolin-mediated activation of factor XII (Hageman factor). *Biochemistry.* **19** : 3215-3220.

SWIFT, G.H., DAGORN, J.C., ASHLEY, P.L., CUMMINGS, S.W. et MacDONALD, R.J. (1982) Rat pancreatic kallikrein mRNA: nucleotide sequence and amino acid sequence of the encoded preproenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **23** : 7263-7267.

TIFFANY, C.W. et BURCH, R.M. (1989) Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett.* **247** : 189-192.

TOKUMASU, T., UENO, A. et OH-ISHI, S. (1995) A hypotensive response induced by des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin in young brown/Norway rats pretreated with endotoxin. *Eur. J. Pharmacol.* **274** : 225-228.

TRIFILIEFF, A., HADDAD, E.B., LANDRY, Y. et GIES, J.P. (1991) Evidence for two high-affinity bradykinin binding sites in the guinea-pig lung. *Eur. J. Pharmacol.* **207** : 129-134.

VIANNA, R.M. et CALIXTO, J.B. (1998) Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg<sup>9</sup>-BK in mouse pleurisy. *Br. J. Pharmacol.* **123** : 281-291.

WALLS, R.S. et BEESON, P.B. (1972) Mechanism of eosinophilia. IX. Induction of eosinophilia in rats by certain forms of dextran. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **140** : 689-693.

WERLE, E. (1936) Über kallikrein aus blut. *Biochem. J.* **287** : 235-261.

WIRTH, K.J., GEHRING, D. et SCHOLKENS, B.A. (1993) Effect of Hoe 140 on bradykinin-induced bronchoconstriction in anesthetized guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148** : 702-706.

WIRTH, K.J., SCHÖLKENS, B.A. et WIEMER, G. (1994) The bradykinin B2 receptor antagonist WIN 64338 inhibits the effect of des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin in endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **288** : R1-R2.

YAMASAWA, H., ISHII, Y. et KITAMURA, S. (1999) Cytokine-induced neutrophil chemoattractant in a rat model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Inflammation.* **23** : 263-274.

YANG, H.Y.T. et ERDÖS, E.G. (1967) Second kininase in human blood plasma. *Nature* **215** : 1402-1403.