

2m11.2574.3

Université de Montréal

**Actions centrales des kinines et de leurs récepteurs sur la fonction cardio-vasculaire dans des modèles d'inflammation et de diabète chez le rat éveillé**

Par

**Frank Cloutier**

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences neurologiques

septembre 1997

© Frank Cloutier, 1997



0 9725 1100

W  
4  
U58  
1998  
V.011

Ministère de l'Éducation

Document communiqué en vertu de la Loi sur l'accès à l'information et de la Loi sur la protection des renseignements personnels

Document communiqué en vertu de la Loi sur l'accès à l'information et de la Loi sur la protection des renseignements personnels

Document communiqué en vertu de la Loi sur l'accès à l'information et de la Loi sur la protection des renseignements personnels

Document communiqué en vertu de la Loi sur l'accès à l'information et de la Loi sur la protection des renseignements personnels



Document communiqué en vertu de la Loi sur l'accès à l'information et de la Loi sur la protection des renseignements personnels

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**Actions centrales des kinines et de leurs récepteurs sur la fonction cardio-vasculaire dans des modèles d'inflammation et de diabète chez le rat éveillé**

présenté par:

**Frank Cloutier**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Richard Robitaille

président du jury

Dr. Réjean Couture

directeur de recherche

Dr. Sylvain Foucart

membre du jury

Mémoire accepté le: 26-03-1998

## Sommaire

Les travaux présentés dans ce mémoire ont pour principal objectif de mettre au point des modèles expérimentaux servant à étudier l'action centrale des kinines sur le récepteur B<sub>1</sub>. Notre hypothèse est que le récepteur B<sub>1</sub> peut aussi être exprimé centralement dans des modèles d'animaux où ce dernier est induit en périphérie. Les kinines étant considérées comme d'importants médiateurs pro-inflammatoires, nous avons utilisé trois modèles d'inflammation où l'induction du récepteur B<sub>1</sub> a été rapporté en périphérie: le modèle de l'oedème à la carragénine, l'inflammation par injection systémique ou centrale de lipopolysaccharides (LPS) et le modèle du rat diabétique obtenu après traitement avec la streptozotocine (STZ). Notre hypothèse sera évaluée dans des études fonctionnelles chez le rat éveillé non-restreint où les réponses cardio-vasculaires seront mesurées suite à l'injection centrale (intracérébroventriculaire (i.c.v.) et intrathécale (i.t.)) et périphérique (intra-veineux et intra-carotide) d'agonistes pour les récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines .

Avec le modèle de l'oedème à la carragénine, nos résultats montrent que l'agoniste classique du récepteur B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-BK, ne produit aucun effet cardio-vasculaire significatif par rapport au véhicule lorsqu'injecté par la jugulaire, la carotide et par la voie i.t. avant et après (3-24h) une injection (50µl) intraplantaire de carragénine (1%) dans les 2 pattes postérieures.

---

Dans le modèle d'inflammation systémique causée par les LPS (100µg/Kg intra artérielle (i.a.)), l'injection i.t. de l'agoniste B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-BK, provoque une bradycardie significative 24 h après traitement au LPS. Dans ce même



modèle, la des-Arg<sup>9</sup>-BK n'a produit aucun effet cardio-vasculaire significatif après administration intra-vasculaire ou i.c.v. En revanche, l'agoniste B<sub>1</sub> résistant au métabolisme, Sar[D-Phe<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK, n'affecte pas les paramètres cardio-vasculaires lorsqu'injecté par voie i.t. ou par la carotide avant et après traitement au LPS (100µg/Kg i.a.). De plus, avec un traitement intraveineux au LPS (100µg/Kg), cet agoniste est sans effet sur les paramètres cardio-vasculaires lorsqu'injecté par voie i.c.v. ou par voie intra-vasculaire avant et après le traitement. Dans le modèle d'inflammation centrale provoquée par l'injection de LPS (1µg i.c.v. ou 10 µg i.t.), aucun effet cardio-vasculaire significatif n'est induit par l'injection i.c.v. ou i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK, respectivement. Dans ce même modèle d'inflammation centrale, mais avec une dose plus élevée de LPS (75µg/rat i.c.v.), l'injection du Sar[D-Phe<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK ne provoque pas de réponse cardio-vasculaire lorsqu'injecté à 6h, 24h et 48h après traitement au LPS. Toutefois, 6 h après le traitement au LPS, la réponse pressive de la BK disparaît et une bradycardie qui n'est pas observée normalement chez le rat témoin, apparaît. Le même traitement au LPS abolit l'effet presseur de l'agoniste B<sub>2</sub> résistant au métabolisme, Phe<sup>8</sup>ψ(CH<sub>2</sub>NH)Arg<sup>9</sup>-BK, et préserve la bradycardie persistente mesurée avec cet agoniste. Cette dernière réponse est bloquée par l'atropine, suggérant une implication du système nerveux parasympathique (nerf vague). La perte de réponse cardio-vasculaire après traitement au LPS n'est pas spécifique aux kinines sur le récepteur B<sub>2</sub>, puisque les augmentations d'activité comportementale, de pression artérielle et de fréquence cardiaque induites par l'injection i.c.v. de substance P (SP) sont aussi bloquées. Ces effets supresseurs du LPS sur les réponses centrales de la SP et de la BK persistent après traitement à l'indométhacine ce qui semble exclure la participation des prostaglandines

dans ce phénomène. Ces résultats suggèrent que les LPS favorisent la composante parasympathique (bradycardie) au détriment de la composante sympathique (effet presseur et tachycardie) de la SP et de la BK.

Enfin, l'utilisation du modèle du rat diabétique obtenu avec un traitement à la STZ, nous a permis de montrer une manifestation du récepteur B<sub>1</sub> caractérisée par une réponse pressive et une tachycardie suite à l'injection i.t. de l'agoniste classique du récepteur B<sub>1</sub>, la des-Arg<sup>9</sup>-BK.

En somme, les modèles d'inflammation centrale (LPS) et périphérique (carragénine ou LPS) n'ont pas permis de démontrer que le récepteur B<sub>1</sub> puisse être induit centralement et exercer une action sur la fonction cardio-vasculaire. Toutefois, l'injection centrale de LPS (75µg i.c.v.) a permis de révéler que l'hyperthermie centrale inhibe spécifiquement la composante sympathique des réponses cardio-vasculaires centrales des agonistes B<sub>2</sub>. Il est aussi suggéré que l'agoniste B<sub>2</sub> stable Phe<sup>8</sup>ψ(CH<sub>2</sub>NH)Arg<sup>9</sup>-BK altère la pression artérielle et la fréquence cardiaque en agissant sur deux sites cérébraux distincts suite à son injection i.c.v. Enfin, dans le modèle du rat diabétique, la présence dans la moelle épinière d'un récepteur B<sub>1</sub> fonctionnel ouvre de nouvelles avenues de recherche dans l'élucidation des causes de cette maladie et des affections cardio-vasculaires sous-jacentes.

---

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLES DES MATIÈRES	vi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES TABLEAUX	xvi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xix
DÉDICACE	xxii
REMERCIEMENTS	xxiii

### PREMIER CHAPITRE: INTRODUCTION

1.0 Introduction générale.....	2
1.1 Historique, origine et isolation des kinines.....	4
1.2 Formation et dégradation des kinines .....	6
1.2.1 Formation.....	6
1.2.2 Dégradation.....	11
1.3 Récepteurs des kinines .....	12
1.3.1 Agonistes et antagonistes .....	12
1.3.2 Clonage des récepteurs .....	14
1.3.3 Sous-types de récepteurs.....	16
1.3.4 Actions cellulaires et messagers secondaires.....	18
1.3.4.1 Récepteur B <sub>2</sub> .....	18
1.3.4.2 PLC.....	20
1.3.4.3 PLA <sub>2</sub> .....	20
1.3.4.4 Récepteur B <sub>1</sub> .....	22
1.4 Kinines dans la périphérie.....	22

1.4.1	Activation des neurones sensoriels.....	22
1.4.2	Kinines et les tissus immunitaires .....	24
1.5	Évidences en faveur d'une action centrale des kinines.....	24
1.6	Kinines dans le système nerveux central.....	25
1.6.1	Composantes du système Kallicréine-Kinine.....	25
1.6.1.1	Kallicréine .....	25
1.6.1.2	Kininogènes .....	26
1.6.1.3	Kininases.....	26
1.6.1.4	Métabolites actifs (kinines).....	27
1.6.1.5	Récepteurs des kinines .....	30
1.6.2	Interaction des kinines avec les cellules immunitaires.....	33
1.7	Action centrale des kinines.....	34
1.7.1	Action sur le système cardio-vasculaire.....	34
1.7.2	Action sur la température corporelle .....	38
1.7.3	Action sur le comportement.....	39
1.7.4	Action antidiurétique .....	39
1.7.5	Action antinociceptive.....	40
1.8	Action des kinines dans la moelle épinière.....	41
1.8.1	Action antinociceptive.....	41
1.8.2	Action sur le système cardio-vasculaire.....	41
1.8.3	Action sur le comportement.....	43
1.9	Implication physiopathologique des kinines .....	44
1.9.1	Kinines et inflammation dans le SNC.....	44
1.9.2	Kinines et l'hypertension artérielle.....	46
1.9.3	Kinines et l'hyperthermie.....	49
1.9.4	Autres évidences de la présence du récepteur B <sub>1</sub> en situation physiologique et pathologique .....	51

2.0 Objectifs généraux du mémoire.....	53
--	----

## DEUXIÈME CHAPITRE: MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.0 Animal.....	56
2.1 Procédures chirurgicales.....	56
2.1.1 Implantation intrathécale .....	56
2.1.2 Implantation d'un cathéter intracérébroventriculaire.....	58
2.1.3 Implantation intra-vasculaire .....	59
2.1.4 Soins post-chirurgicaux.....	60
2.2 Mesure des paramètres cardio-vasculaires.....	62
2.3 Protocoles expérimentaux .....	63
2.3.1 Effets central et périphérique de la des-Arg <sup>9</sup> -BK sur le système cardio-vasculaire après un traitement à la carragénine.....	63
2.3.2 Effets central et périphérique de la des-Arg <sup>9</sup> -BK sur le système cardio-vasculaire après un traitement i.a. au LPS chez le rat.....	64
2.3.3 Effets central et périphérique de l'agoniste résistant Sar [D-Phe <sup>8</sup> ] des-Arg <sup>9</sup> -BK sur le système cardio-vasculaire après un traitement systémique au LPS chez le rat.....	65
2.3.3.1 Traitement i.v. au LPS.....	65
2.3.3.2 Traitement i.a. au LPS.....	65
2.3.4 Effets centraux des kinines sur le système cardio-vasculaire après un traitement central au LPS chez le rat.....	66
2.3.4.1 Effets i.c.v. et i.t. de la des-Arg <sup>9</sup> -BK après traitement central au LPS.....	66

2.3.4.2 Effets i.c.v. de l'agoniste B <sub>1</sub> (Sar[D-Phe <sup>8</sup> ] des-Arg <sup>9</sup> -BK) et des agonistes B <sub>2</sub> (BK et Phe <sup>8</sup> ψ (CH <sub>2</sub> NH) Arg <sup>9</sup> -BK) après injection i.c.v. de LPS.....	67
2.3.5 Effet i.c.v. de l'agoniste Phe <sup>8</sup> ψ (CH <sub>2</sub> NH) Arg <sup>9</sup> -BK en présence d'atropine.....	67
2.3.6 Effets i.c.v. de la SP sur la réponse comportementale et les paramètres cardio-vasculaires suite à un traitement i.c.v. au LPS.....	68
2.3.7 Effets i.c.v. de la SP sur les réponses comportementales et cardio-vasculaires en présence d'indométhacine avant et après traitement au LPS.....	69
2.3.8 Effets i.c.v. de la SP sur les réponses comportementales et cardio-vasculaires en présence d'indométhacine après traitement au LPS.....	69
2.3.9 Effets i.c.v., i.t. et périphérique des agonistes Sar [D-Phe <sup>8</sup> ] des-Arg <sup>9</sup> -BK et des-Arg <sup>9</sup> -BK sur le système cardio-vasculaire du rat diabétique.....	70
2.3.10 Effet cardio-vasculaire de plusieurs doses de des-Arg <sup>9</sup> -BK (0.65 à 65 nmoles/10µl i.t.) après 18 jours de traitement à la STZ.....	71
2.4 Solution, peptides et autres composés.....	71
2.6 Analyse statistique.....	72

---

### TROISIÈME CHAPITRE: RÉSULTATS

3.1 Effets cardio-vasculaires central et périphérique du des-Arg <sup>9</sup> -BK après un traitement à la carragénine.....	74
---	----

3.2 Effets cardio-vasculaires central et périphérique du des-Arg <sup>9</sup> -BK après traitement au LPS.....	76
3.3 Effets cardio-vasculaires central et périphérique du Sar [D-Phe <sup>8</sup> ] des-Arg <sup>9</sup> -BK après traitement i.v. au LPS.....	78
3.4 Effets cardio-vasculaires central et périphérique du Sar [D-Phe <sup>8</sup> ] des-Arg <sup>9</sup> -BK après traitement i.a. au LPS.....	80
3.5 Effets centraux des kinines sur le système cardio-vasculaire après un traitement central au LPS chez le rat.....	82
3.5.1 Effets i.c.v. et i.t. de des-Arg <sup>9</sup> -BK après traitement au LPS.....	82
3.5.2 Effets cardio-vasculaires centraux du Sar[D-Phe <sup>8</sup> ] des-Arg <sup>9</sup> -BK, de la BK et du Phe <sup>8</sup> ψ (CH <sub>2</sub> NH) Arg <sup>9</sup> -BK après injection i.c.v. de LPS.....	84
3.5.3 Effet de l'agoniste Phe <sup>8</sup> ψ (CH <sub>2</sub> NH) Arg <sup>9</sup> -BK en présence d'atropine.....	94
3.6 Effets i.c.v. de la SP sur la réponse comportementale et les paramètres cardio-vasculaires suite à un traitement i.c.v. au LPS.....	99
3.7 Effets i.c.v. de la SP sur les réponses comportementales et cardio-vasculaires en présence d'indométhacine avant et après traitement au LPS.....	104
3.8 Effets i.c.v. de la SP sur les réponses comportementales et cardio-vasculaires en présence d'indométhacine après traitement au LPS.....	109
3.9 Effets cardio-vasculaires central et périphérique du Sar [D-Phe <sup>8</sup> ] des-Arg <sup>9</sup> -BK et de la des-Arg <sup>9</sup> -BK après traitement à la STZ (65 mg/Kg i.p.).....	114

## QUATRIÈME CHAPITRE: DISCUSSION

4.1 Modèle de l'oedème à la carragénine.....	126
--	-----

4.2 Modèle de l'inflammation systémique par l'injection en périphérie de LPS.....	127
4.3 Modèle de l'hyperthermie induite par l'injection centrale de LPS.....	128
4.3.1 Mécanisme d'action de la réponse centrale de la BK .....	130
4.4 Modèle de l'induction du diabète par la streptozotocine .....	133
Sommaire et Conclusions.....	136
Bibliographie .....	139

---



## LISTE DES FIGURES

### PREMIER CHAPITRE: INTRODUCTION

- Figure 1:** Représentation schématique des deux principales cascades biochimiques de la formation des kinines dans le plasma et les tissus 8
- Figure 2:** Représentation schématique des différentes étapes transcriptionnelles, traductionnelles, et de maturation protéolytiques menant à la synthèse des kinines 10
- Figure 3 :** Sites enzymatiques de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK 12
- Figure 4 :** Comparaison de la séquence en acides aminés des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> chez l'homme 16
- Figure 5 :** Le récepteur B<sub>2</sub> de la cellule endothéliale  
Transduction de signal permettant la relaxation de la cellule musculaire lisse 21

---

### DEUXIÈME CHAPITRE: MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Figure 6:** Représentation schématique de l'implantation des canules i.c., i.v. et intra-fémorale 61

**TROISIÈME CHAPITRE: RÉSULTATS**

- Figure 7:** Courbes temporelles montrant l'absence d'effet cardio-vasculaire de l'agoniste B<sub>1</sub>, Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK, (1.025 nmole/1µl i.c.v.) avant et à 6, 24 et 48 h après l'injection de LPS (75µg i.c.v.). 85
- Figure 8 :** Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire de quatre injections de BK (0.94 nmole/1µl i.c.v.) administrées à intervalles de 24 h. 87
- Figure 9 :** Courbes temporelles montrant l'effet de la BK (0.94 nmole/1µl i.c.v.) sur la PAM et la FC avant et à 6, 24 et 48 h après l'injection de LPS (75µg i.c.v.). 90
- Figure 10 :** Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire de quatre injections du Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK (0.85 nmole/1µl i.c.v.) administrées à intervalles de 24 h. 92
- Figure 11 :** Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire du Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK (0.85 nmole/1µl i.c.v.) avant et à 6, 24 et 48 h après l'injection de LPS (75µg i.c.v.) 95
- 
- Figure 12:** Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire du Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK (0.85 nmole/1µl i.c.v.) avant et après l'injection d'atropine (1mg/Kg i.a.). 97

- Figure 13:** Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire de la SP (25 pmoles/1 $\mu$ l i.c.v.) avant et à 6, 24 et 48 h après l'injection de LPS (75 $\mu$ g i.c.v.). 100
- Figure 14 :** Effets i.c.v. de la SP (25 pmoles) sur la réponse comportementale avant et à 6, 24 et 48 h après l'injection de LPS (75 $\mu$ g i.c.v.). 102
- Figure 15 :** Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire de la SP (25 pmoles/1 $\mu$ l i.c.v.) suite à l'injection d'indométhacine avant et après traitement au LPS. 105
- Figure 16:** Effets i.c.v. de la SP sur les réponses comportementales suite à l'injection d'indométhacine avant et après traitement au LPS. 107
- Figure 17:** Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire de la SP (25 pmoles/1 $\mu$ l i.c.v.) suite à l'injection d'indométhacine après traitement au LPS 110
- Figure 18:** Effets i.c.v. de la SP sur les réponses comportementales suite à l'injection d'indométhacine après traitement au LPS 112
- 
- Figure 19:** Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire de la des-Arg<sup>9</sup>-BK (6.5 nmoles/10 $\mu$ l i.t.) après traitement à la STZ (mêmes animaux qu'aux tableaux VIII-X) 115

- Figure 20:** Effet cardio-vasculaire de plusieurs doses de des-Arg<sup>9</sup>-BK (0.65 à 65 nmoles/10µl i.t.) après 18 jours de traitement à la STZ. 121
- Figure 21:** Effet cardio-vasculaire de plusieurs doses de des-Arg<sup>9</sup>-BK (0.65 à 65 nmoles/10µl i.t.) chez un groupe de rats témoins. 123
-

## LISTE DES TABLEAUX

## PREMIER CHAPITRE: INTRODUCTION

**Tableau I:** Antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> 14

**Tableau II:** Effets biologiques de la bradykinine 19

## TROISIEME CHAPITRE: RESULTATS

**Tableau III :** Changements maximaux de la pression artérielle moyenne et de la fréquence cardiaque induits par l'injection de 6.5 nmoles de des-Arg<sup>9</sup>-BK à différents sites après traitement à la carragénine chez le rat éveillé. 75

**Tableau IV:** Changements maximaux de la pression artérielle moyenne et de la fréquence cardiaque induits par l'injection de des-Arg<sup>9</sup>-BK à différents sites après un traitement au Lipopolysaccharide (100µg/Kg i.a) chez le rat éveillé. 77

---

**Tableau V:** Changements maximaux de la pression artérielle moyenne et de la fréquence cardiaque induits par l'injection de Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK à différents sites après traitement au Lipopolysaccharide (100µg/Kg i.v.) chez le rat éveillé. 79

**Tableau VI :** Changements maximaux de la pression artérielle moyenne et de la fréquence cardiaque induits par l'injection de Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK à différents sites après traitement au LPS (100µg/Kg i.a.) chez le rat éveillé. 81

**Tableau VII:** Changements maximaux de la pression artérielle moyenne et de la fréquence cardiaque induits par l'injection de des-Arg<sup>9</sup>-BK à différents sites après traitement au LPS (10µg i.t. ou 1µg i.c.v.) chez le rat éveillé. 83

**Tableau VIII:** Changements maximaux de la pression artérielle moyenne et de la fréquence cardiaque induits par l'injection i.a. et i.v. de Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK et de des-Arg<sup>9</sup>-BK après traitement à la STZ (60mg/Kg i.p.) (8-11jours) chez le rat éveillé. 117

<b>Tableau IX:</b> Changements maximaux de la pression artérielle moyenne et de la fréquence cardiaque induits par l'injection i.c.v. de Sar[D-Phe <sup>8</sup> ] des-Arg <sup>9</sup> -BK et de des-Arg <sup>9</sup> -BK après traitement à la STZ (65mg/Kg i.p.) (8-11jours) chez le rat éveillé.	118
<b>Tableau X:</b> Effets sur le poids corporel et le taux sanguin de glucose après traitement à la streptozotocine.	119

---

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ADNc</b>	acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>AMPc</b>	adénosine monophosphate cyclique
<b>ANOVA</b>	analyse de variance
<b>Arg</b>	arginine
<b>ARNm</b>	acide ribonucléique messenger
<b>BHC</b>	barrière hémato-encéphalique
<b>BK</b>	bradykinine
<b>BK-LI</b>	BK-immunoréactive
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	calcium intracellulaire
<b>CGRP</b>	peptide relié au gène de la calcitonine
<b>CML</b>	cellules musculaires lisses
<b>CPM</b>	carboxypeptidase M
<b>CPN</b>	carboxypeptidase N
<b>D</b>	digging (remuage de la litière)
<b>ECA</b>	enzyme de conversion de l'angiotensine
<b>EDHF</b>	facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
<b>FC</b>	fréquence cardiaque
<b>FW</b>	face washing (nettoyage de la région faciale)
<b>G</b>	grooming (nettoyage des pattes arrières et du dos)
<b>GCs</b>	guanylyl cyclase soluble
<b>GMP</b>	guanosine monophosphate cyclique



<b>HS</b>	head scratching (grattage de la tête avec les pattes postérieures)
<b>i.a.</b>	intraartérielle
<b>i.c.</b>	intra-carotide
<b>i.c.v.</b>	intacérébroventriculaire
<b>i.p.</b>	intra-peritonéale
<b>i.t.</b>	intrathécale
<b>i.v.</b>	intra-veineux
<b>IEC</b>	inhibiteur de l'enzyme de conversion
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositol 1,4,5-triphosphate
<b>KD</b>	kallidine
<b>KHM/KFM</b>	kininogène à haut/faible poids moléculaire
<b>KK</b>	kallicréine-kinine
<b>LCR</b>	liquide céphalorachidien
<b>LPS</b>	lipopolysaccharide
<b>Lys</b>	lysine
<b>NAME</b>	NG-nitro-L-arginine
<b>NEP24.11</b>	endopeptidase neutre 24.11
<b>NO</b>	monoxyde d'azote
<b>NOS</b>	synthase du monoxyde d'azote
<b>NTS</b>	noyau du tractus solitaire
<b>ODN</b>	oligonucléotides antisenses
<b>PAF</b>	platelet activating factor
<b>PAM</b>	pression artérielle moyenne

<b>PE</b>	cathéter de polyéthylène
<b>PKC</b>	protéine kinase C
<b>PLA<sub>2</sub></b>	phospholipase A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	phospholipase C
<b>PM</b>	poids moléculaire
<b>S</b>	sniffing (activité exploratrice par l'odorat)
<b>SNC</b>	système nerveux central
<b>SP</b>	substance P
<b>STZ</b>	streptozotocine
<b>TNF</b>	tumour necrosis factor
<b>WDS</b>	wet dog shake (secoues corporelles)
<b>WKY/SHR</b>	Wistar Kyoto normotendu/rat spontanément hypertendu

---

À Josée Claude

À mes parents Réjean et Ginette

---

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier le docteur Réjean Couture, mon directeur de recherche, pour m'avoir donné sa pleine confiance afin de concrétiser mon passage aux études supérieures et pour son encadrement exceptionnel tout au long de ma maîtrise et particulièrement dans la rédaction de mon mémoire.

Je tiens à remercier le groupe de recherche sur le système nerveux autonome (GRSNA) pour son soutien financier et le Dr. D. Regoli de l'université de Sherbrooke pour nous avoir fourni les peptides nécessaires pour cette étude.

Je tiens également à remercier mes collègues de laboratoire pour m'avoir transmis leurs connaissances: Paolo Lopez pour la chirurgie i.t. et intra-vasculaire, Yi Ding Yuan pour la chirurgie i.c.v., Eric Cellier pour l'utilisation du logiciel de statistiques, tout particulièrement Lionel Barbot pour son grand support technique avec l'ordinateur, dans les chirurgies, dans le montage du modèle du rat éveillé non-restreint et pour sa très grande convivialité et sans oublier Anick Décarie, Phillipe Poulat, Alexandre Prat, Andrée Lessard, Hudson Buck et Vanessa Pinheiro pour leur soutien moral et leur amitié.

---

Je m'en voudrais d'oublier Christiane Laurier pour son aide secrétariale et la contribution importante des animaliers, Pierre et Jean.

# **Chapitre 1**

## **Introduction**

---

## 1.0 Introduction générale

Les kinines, incluant la bradykinine(BK), la kallidine (KD) et leurs métabolites actifs (des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine et des-Arg<sup>10</sup>-kallidine), sont des peptides produits localement et qui agissent au site d'inflammation. Par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires spécifiques B<sub>2</sub> et B<sub>1</sub>, couplés à un grand nombre de mécanismes de transduction, ces autacoïdes produisent une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et la douleur par suite de la stimulation des fibres sensorielles de type C. Les kinines interagissent aussi directement avec le système immunitaire. En stimulant les fibres sensorielles et les cellules du système immunitaire, les kinines provoquent le relâchement et la synthèse de nombreux médiateurs de l'inflammation, notamment les prostanoïdes, les tachykinines, les cytotoxines (cytokines, radicaux libres et le NO), qui leur confèrent le titre de puissants agents algésiques et pro-inflammatoires.

Chez l'homme et le boeuf, il existe deux kinines principales, la BK qui est un nonapeptide (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) et la KD ou lys-bradykinine (lys-BK). Chez le rat, une kinine additionnelle, Il-Ser-BK, appelée T-kinine est libérée à partir d'un kininogène, le T-kininogène, hydrolysable par la trypsine (Bhoola et al., 1992).

Contrairement au récepteur B<sub>2</sub> qui est exprimé de manière constitutive et grandement distribué dans l'organisme, le récepteur B<sub>1</sub> est rarement exprimé dans un organisme sain. En effet, le récepteur B<sub>1</sub> est induit dans les stades pathologiques suivant un traumatisme tissulaire. Ce récepteur jouerait un rôle essentiel dans la modulation de la réponse inflammatoire,

bien qu'il reste encore plusieurs questions à solutionner concernant son mécanisme de régulation.

Le système kallikréine-kinine est aussi présent dans le système nerveux central (SNC). En effet, des études utilisant des modèles d'animaux pour étudier les traumatismes et les ischémies cérébrales ont montré un accroissement de l'activité des kinines. De plus, cette amplification de l'activité était prévenue par des antagonistes des récepteurs des kinines ou par l'inhibition de la production des kinines. D'autres rôles centraux ont aussi été attribués aux kinines dont un effet sur la modulation du signalement de la douleur dans le cerveau (peut être relié aux migraines) et dans la corne dorsale de la moelle épinière où les afférences primaires des nocicepteurs peuvent être stimulées. Des études ont montré que les kinines pourraient avoir une fonction dans la régulation cardio-vasculaire et spécialement durant la phase chronique de l'hypertension spontanée. Tous ces rôles ont été jusqu'à maintenant associés au récepteur B<sub>2</sub>. En effet, à ce jour, aucune étude complète n'a montré l'implication du récepteur B<sub>1</sub> au niveau central. Des données récentes proposent une implication du récepteur B<sub>1</sub> dans la phase chronique de l'hypertension et dans l'inflammation cérébrale persistante (hyperthermie) après l'injection de lipopolysaccharides (LPS) bactérien dans les ventricules cérébraux.

Ce mémoire vise donc à évaluer le rôle physiopathologique du récepteur B<sub>1</sub> des kinines dans la régulation centrale de la pression artérielle. Pour atteindre cet objectif, nous tenterons d'induire l'expression du récepteur B<sub>1</sub> dans le SNC suite à l'administration systémique et/ou centrale de différents agents connus pour induire l'inflammation et l'expression du récepteur B<sub>1</sub>

en périphérie (e.g. carragénine et LPS bactérien). De plus, le modèle du rat diabétique obtenu après traitement avec la streptozotocine (STZ) sera employé dans nos études, car des évidences pharmacologiques récentes ont suggéré la présence d'un récepteur B<sub>1</sub> fonctionnel sur la veine porte du rat diabétique et dans le fundus de l'estomac de souris diabétique. Il a aussi été démontré que les souris diabétiques (STZ) traitées avec l'antagoniste du récepteur B<sub>1</sub>, [Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK, avaient une glycémie normale. Notre approche expérimentale consiste à mesurer les effets cardio-vasculaires obtenus suite à l'injection centrale (intrathécale et intracérébroventriculaire) et périphérique (intra-veineux et intra-artériel) d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines chez le rat éveillé.

### 1.1 Historique, origine et isolation des kinines

L'histoire de ce système commence au début du siècle, en 1909, quand les physiologistes Abelous et Bardier rapportèrent que l'injection intraveineuse (i.v.) d'urine humaine entraîne, chez le chien, une importante chute de la pression sanguine systolique. Ces chercheurs avaient, sans le savoir, découvert l'effet de la kallicréine. Sur la base de cette observation, le groupe de Werle isola, en 1930, des quantités importantes de cette substance hypotensive à partir d'extraits de pancréas et la désigna du nom de "kallicréine" (du mot grec *kallicreas*, pancréas) (Kraut et al., 1930). L'équipe de Werle suggéra d'abord qu'il s'agissait d'une hormone synthétisée par le pancréas et éliminée dans l'urine, mais cette hypothèse fut abandonnée lorsque cette même équipe démontra, pour la première fois, la libération de kinines à partir d'un précurseur présent dans le sérum. En effet, lorsque les kallicréines (extraites de glandes salivaires) sont incubées en présence de



sérum humain sur une préparation d'iléon de cobaye, elles provoquent des contractions des couches musculaires lisses alors que lorsque le sérum n'est pas rajouté, aucune contraction n'est observée (Werle et al., 1937). Plus tard, le groupe brésilien de Rocha e Silva découvrit la BK en montrant que la trypsine ou le venin du serpent *Bothrops jararaca* induit la libération d'un peptide fortement hypotenseur lorsque mis en présence de globulines plasmatiques (Rocha e Silva et al., 1949). Des études de cinétique sur la formation de la KD (lys-BK), à partir du même précurseur obtenu plutôt en 1948 par l'équipe de Werle, ont permis d'établir le concept que les kinines sont libérées de façon enzymatique (Werle et Bereck, 1948).

Contrairement aux tachykinines, qui causent des contractions rapides de l'iléon de cobaye, la BK provoque une contraction beaucoup plus lente, d'où son nom tiré du grec *brady* (pour lent) et *kinin* (pour mouvement). La BK perd son action en présence de l'alpha-chymotrypsine suggérant qu'il s'agit d'un peptide (Rocha e Silva, 1955). Cette même équipe et une autre ont isolé et purifié la BK confirmant qu'il s'agissait bel et bien d'un peptide (Andrade et Rocha e Silva, 1956; Elliot et al., 1959). Toutefois, ce n'est qu'en 1970 qu'on démontra que la BK était un nonapeptide après avoir établi sa séquence en acides aminés (Elliot, 1970). Au cours de la même année, le groupe d'Erdös découvrit que l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est à la fois capable de produire de l'angiotensine II vasoconstrictrice et d'inactiver la BK vasodilatatrice (Yang et al., 1970). Cette découverte allait ouvrir une importante voie de recherche pour l'industrie pharmaceutique dans le domaine de l'hypertension artérielle avec le développement des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC).

L'histoire des kinines s'est accélérée et il est maintenant connu que les kinines sont plus que des peptides hypotenseurs. En effet, ils participent à de nombreux processus physiologiques: la genèse, la transmission et l'amplification de l'information nociceptive, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, les oedèmes et la contraction des muscles lisses bronchopulmonaires, intestinaux et utérins. Les kinines sont aussi retrouvées dans le système nerveux central, mais leur rôle demeure encore très peu étudié à ce niveau. Enfin, plusieurs évidences suggèrent que ces peptides sont impliquées dans plusieurs conditions pathologiques tels l'inflammation, l'asthme, les rhumatismes, l'arthrite, les migraines, l'infarctus du myocarde, le choc septique et le diabète.

## **1.2 Formation et dégradation des kinines**

### ***1.2.1 Formation***

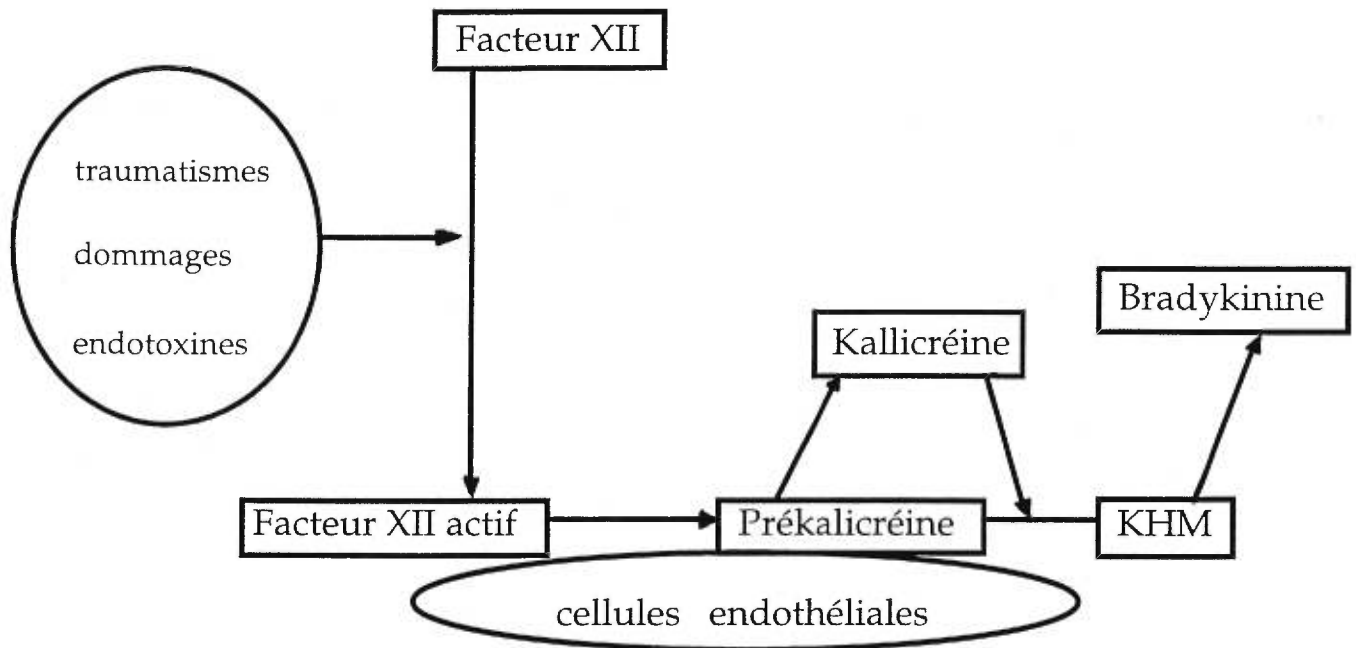
Le nonapeptide, BK, est le mieux étudié parmi l'ensemble des kinines formées à la suite d'un dommage tissulaire. Il y a deux cascades biochimiques majeures amenant la libération de kinines; la première est plasmatique et la deuxième est tissulaire (figure 1). Dans le sang, la première étape qui initie la cascade survient lorsque le facteur XII inactif, ou facteur de Hageman, se lie à une surface chargée négativement, comme une membrane endommagée ou des endotoxines. Ce processus va activer le Facteur XII. L'activation subséquente de la kallibréine va libérer la BK du kininogène de haut poids moléculaire (KHM). Dans les tissus, le précurseur pour la production des kinines est de faible poids moléculaire (KFM)

(Bhoola et al., 1992). Ceux-ci diffèrent bien entendu par leur poids moléculaire, mais aussi par leur susceptibilité aux différentes kallicréines (Takagaki et al., 1985).

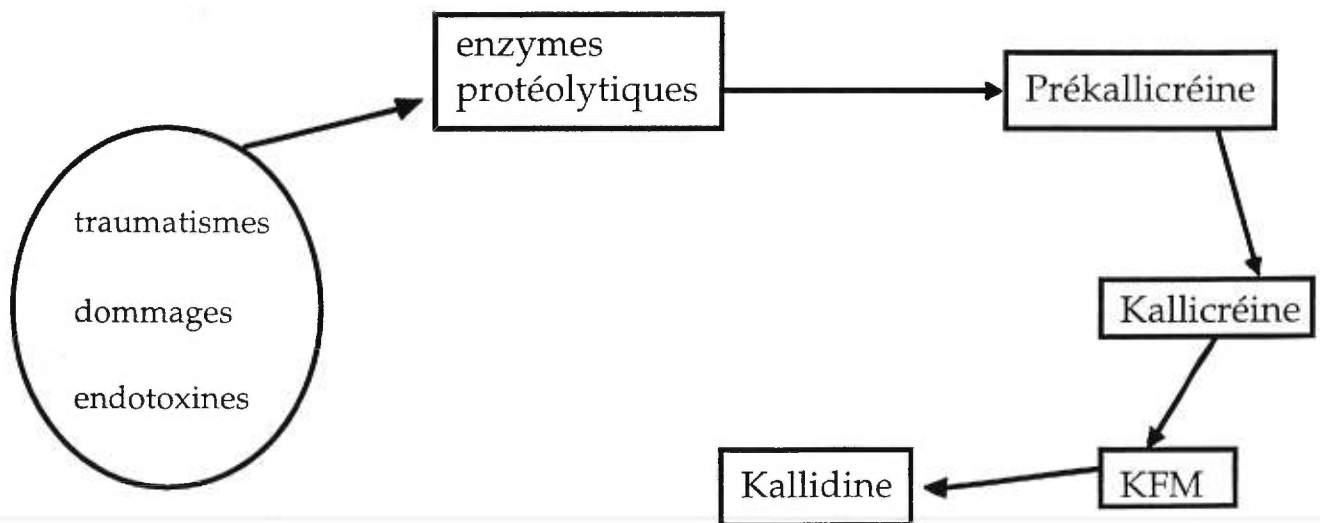
Ces deux précurseurs sont des chaînes simples de glycoprotéines, lesquelles contiennent la séquence peptidique de la BK non active. La glycoprotéine possède trois grands domaines distincts: à son extrémité amino-terminale une chaîne lourde (H), à son centre une séquence pour la BK toujours précédée par un acide aminé arginine (Arg) ou une lysine (Lys), et par une chaîne légère (L) à l'extrémité carboxyl-terminale. La chaîne lourde est caractérisée par la présence de 8 ponts disulfures conférant 8 structures en forme de loupe. Un autre pont disulfure est localisé entre la chaîne lourde et la chaîne légère (Sueyoshi et al., 1987).

---

### Dans le plasma



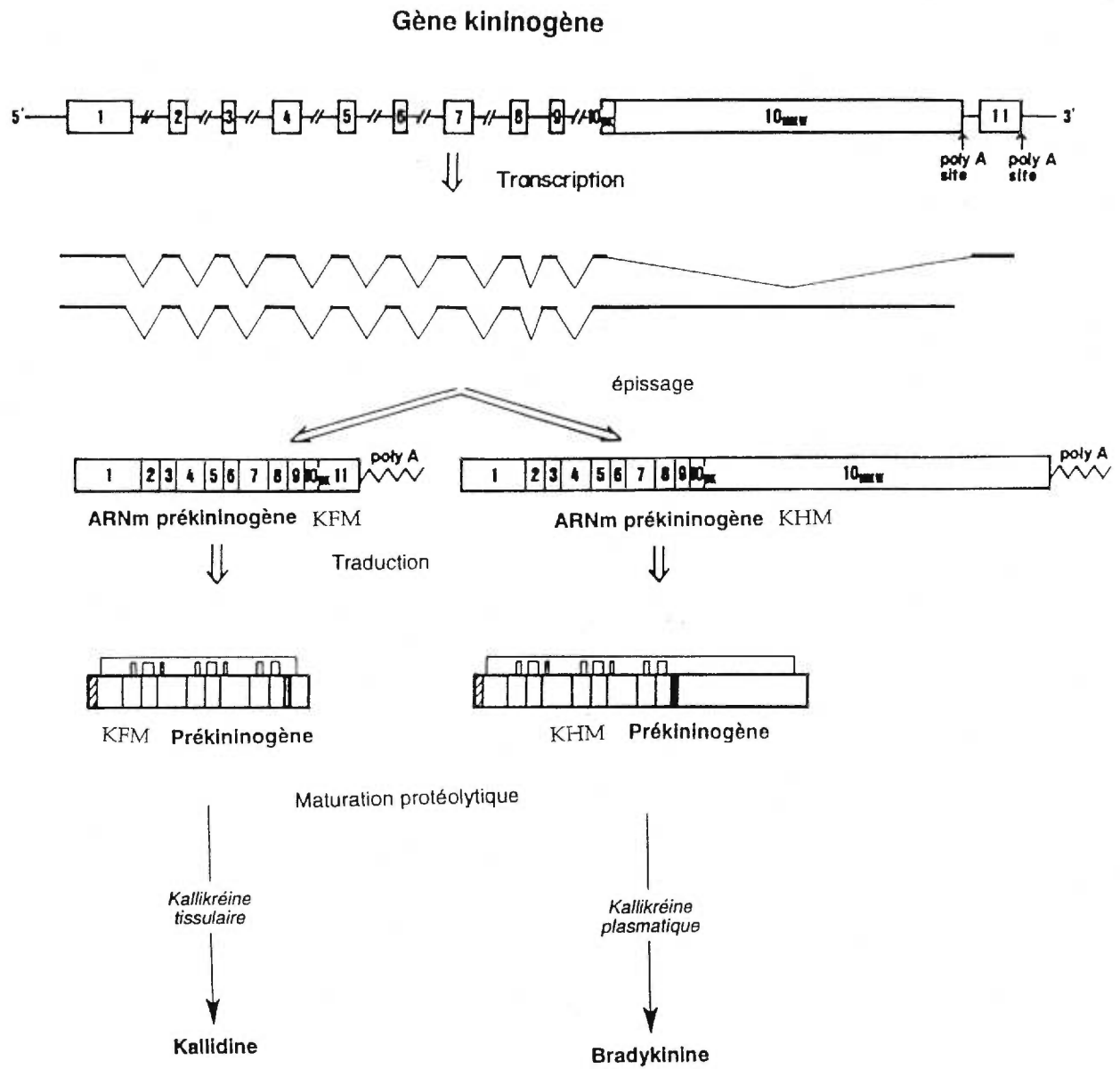
### Dans les tissus



**Figure 1:** Représentation schématique des deux principales cascades biochimiques de la formation des Kinines dans le plasma et les tissus (Walker et al., 1995)

Les kininogènes de haut et de faible poids moléculaires synthétisés dans le foie proviennent de l'épissage alternatif d'un seul gène (Bhoola et al., 1992). En effet, l'utilisation de techniques de clonage génomique a montré que les acides ribonucléiques messagers (ARNm) codant pour les prékininogènes KHM et KFM chez l'homme partagent des séquences identiques entre les chaînes terminales (5' non-traduites), tandis que les deux ARNm divergent dans leur portion terminale 3' (Takagaki et al., 1985). Après la traduction, on obtient le peptide signal, la chaîne lourde (H) et la séquence codant pour la BK, qui sont des régions communes pour les deux prékininogènes, constituées de 18, 362 et 9 acides aminés respectivement. La chaîne légère des prékininogènes (KHM) et (KFM) est composée de 255 et 38 acides aminés respectivement (Takagaki et al., 1985)(figure 2). Les gènes codants pour les kininogènes présentent des variations de séquences en fonction des espèces. En conséquence, on observe également des variations inter spécifiques dans la séquence peptidique des kinines.

Les kallicréines sont des protéases à sérine parmi lesquelles on distingue la kallicréine plasmatique (PM: 60kDa) synthétisée par le foie et les kallicréines tissulaires (PM entre 24 et 48kDa) qui sont principalement synthétisées par le pancréas, le rein, l'intestin, le cerveau et les glandes sudoripares (Bhoola et al., 1992). La kallicréine plasmatique est codée par un seul gène, alors que les kallicréines tissulaires sont codées par plusieurs gènes, localisés chez l'homme sur le chromosome 19. Les deux enzymes hydrolysent avec des affinités différentes le kininogène de haut et de faible poids moléculaire.



**Figure 2:** Représentation schématique des différentes étapes transcriptionnelles, traductionnelles, et de maturation protéolytiques menant à la synthèse des kinines (Nakanishi, 1987)

### 1.2.2 Dégradation

L'activité des kinines n'est que de courte durée *in vivo*. Cette inactivation est attribuable à de nombreuses peptidases que l'on retrouve dans le plasma sous forme soluble et à la surface de cellules dont les cellules endothéliales et les neutrophiles. L'une des principales enzymes dégradant les kinines est la kininase I, également connue sous le nom de carboxypeptidase N (CPN dans le plasma) ou encore carboxypeptidase M (CPM sur la membrane plasmique des cellules vasculaires) (figure 3). En enlevant l'arginine en position C-terminale de la BK et de la kallidine, ces enzymes forment la des-Arg<sup>9</sup>-BK et la des-Arg<sup>10</sup>-KD qui sont des peptides biologiquement actifs avec des effets biologiques bien distincts de ceux de la BK et de la kallidine. En effet, ces métabolites sont peu actifs sur le récepteur B<sub>2</sub>, mais possèdent une forte activité sur des préparations contenant le récepteur B<sub>1</sub>, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Regoli et al., 1977; 1978).

La kininase II, plus connue sous le nom d'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ECA), dégrade la BK en fragments BK1-5 et BK1-7 inactifs, et assure également la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. L'endopeptidase neutre 24.11 (NEP 24.11) est une autre kininase importante et forme les deux principales kininases II avec l'enzyme de conversion de l'angiotensine. L'ECA est retrouvée en grande partie à la surface des cellules endothéliales et dans les liquides corporels comme le liquide séminal, le sang, l'urine, la lymphe et le liquide cérébrospinal (LCR) où elle est moins abondante (Erdös et Yang, 1967). On retrouve aussi des aminopeptidases capables de dégrader les kinines en agissant à l'extrémité

N-terminale, mais ces enzymes n'ont pas de rôle prépondérant dans l'inactivation des kinines.

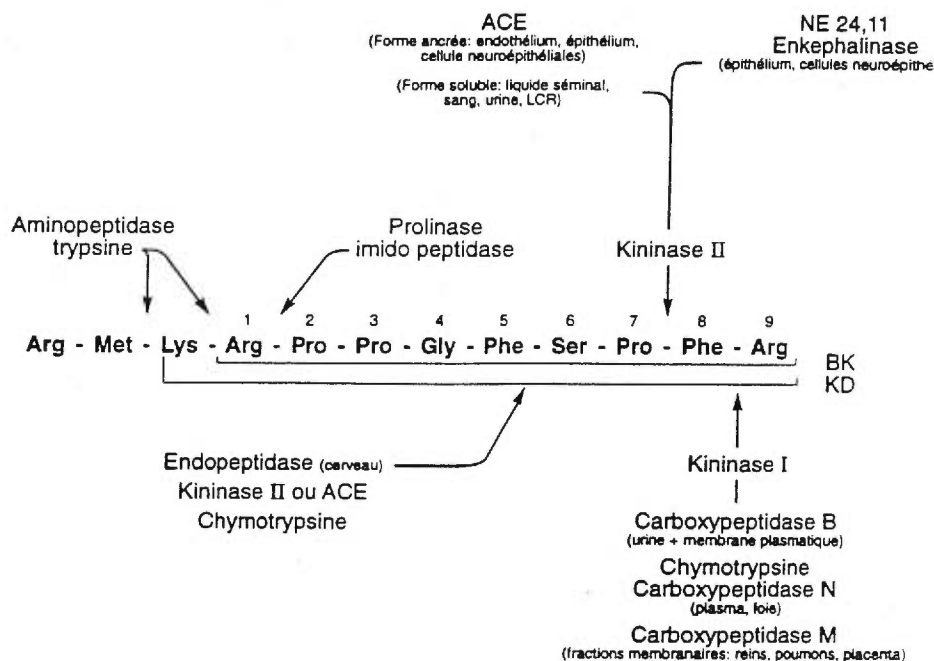


Figure 3 : Sites enzymatiques de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK (Adapté de Regoli et Barabé, 1980)

### 1.3 Récepteurs des kinines

#### 1.3.1 Agonistes et antagonistes

A la suite de nombreuses études portant sur les relations entre les modifications de la séquence peptidique de la BK et son activité biologique, l'équipe de Regoli proposa une première classification des récepteurs de la BK (Regoli et Barabé, 1980). En effet, ces auteurs ont distingué deux types de récepteurs, nommés B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>, en étudiant l'effet de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-



BK sur la contraction de différentes préparations vasculaires. Le récepteur B<sub>1</sub>, d'abord identifié sur l'aorte et la veine mésentérique de lapin, est activé préférentiellement par la des-Arg<sup>9</sup>-BK mais également par la BK avec une efficacité moindre. Présent sur la veine jugulaire de lapin et l'artère carotide de chien, le récepteur B<sub>2</sub> est stimulé seulement par la BK et la Lys-BK. Toutes ces études ont aussi démontré que la suppression du résidu arginine en position 9 (des-Arg<sup>9</sup>-BK), transforme la BK, agoniste préférentiel de type B<sub>2</sub>, en agoniste sélectif de type B<sub>1</sub>. La distinction de ces deux récepteurs fut confirmée en 1991 et 1994 par le clonage des ADNc de deux récepteurs distincts (McEachern et al., 1991; Menke et al., 1994).

L'ordre de puissance des agonistes pour le récepteur B<sub>1</sub> sur l'aorte de lapin est: des-Arg<sup>10</sup>-KD > Sar<sup>0</sup>[D-Phe<sup>8</sup>]-des-Arg<sup>9</sup>-BK > des-Arg<sup>9</sup>-BK > KD > BK > T-kinine > [Hyp<sup>3</sup>,Tyr (Me)<sup>8</sup>]-BK et pour le récepteur B<sub>2</sub> sur la veine jugulaire de lapin: [Hyp<sup>3</sup>,Tyr (Me)<sup>8</sup>]-BK > BK > KD > T-kinine > des-Arg<sup>10</sup>-KD > des-Arg<sup>9</sup>-BK > Sar<sup>0</sup>[D-Phe<sup>8</sup>]-des-Arg<sup>9</sup>-BK (Regoli et al., 1990 a;b).

Il existe aussi une grande variété d'antagonistes pour les récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>. Les antagonistes les plus remarquables sont mentionnés au tableau I. La première génération d'antagonistes peptidiques n'avait, comparée à la BK elle-même, qu'une faible affinité pour le récepteur B<sub>2</sub>. La deuxième génération d'antagonistes est caractérisée par l'introduction de résidus de chaînes aliphatiques en position 7, ce qui a considérablement augmenté leur résistance à la dégradation. Enfin, la troisième génération d'antagonistes est caractérisée par le fait que ces molécules récentes sont non peptidiques. Le WIN64338 représente le premier antagoniste non peptidique du récepteur

B<sub>2</sub> (Stewart, 1995) et tout récemment l'équipe de Inamura (1997) a caractérisé un nouvel antagoniste B<sub>2</sub> non peptidique, le FR173657.

**Tableau I:** Antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> (Bascands et Girolami, 1996)

Antagonistes	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>
1 <sup>re</sup> génération	[Leu <sup>8</sup> -des-Arg <sup>9</sup> ]-BK [Leu <sup>9</sup> -des-Arg <sup>10</sup> ]Lys-BK	[DPhe <sup>7</sup> ]-BK [DArg,Hyp <sup>3</sup> ,Thi <sup>5,8</sup> ,DPhe <sup>7</sup> ]-BK
2 <sup>e</sup> génération	DArg[Hyp <sup>3</sup> ,Thi <sup>5</sup> ,Cys <sup>6</sup> ,DPhe <sup>7</sup> ]-BK S-linker-S DArg[Cys <sup>1</sup> ,Hyp <sup>3</sup> ,Thi <sup>5</sup> ,DPhe <sup>7</sup> ,Leu <sup>8</sup> ] Ac Lys [D-βNal <sup>7</sup> ,Ile <sup>8</sup> ] des-Arg <sup>9</sup> -BK	DArg[Hyp <sup>3</sup> ,Thi <sup>5</sup> ,Cys <sup>6</sup> ,DPhe <sup>7</sup> ]-BK S-linker-S DArg[Cys <sup>1</sup> ,Hyp <sup>3</sup> ,Thi <sup>5</sup> ,DPhe <sup>7</sup> ,Leu <sup>8</sup> ] DArg[Hyp <sup>3</sup> ,Thi <sup>5</sup> ,DTic,Oic <sup>8</sup> ]-BK (a) DArg[Hyp <sup>3</sup> ,DHyp <sup>7</sup> ,Oic <sup>8</sup> ]-BK DArg[Hyp <sup>3</sup> ,Thi <sup>5</sup> ,Cys <sup>6</sup> ,DPhe <sup>7</sup> ] <sub>2</sub> -BK
3 <sup>e</sup> génération	non peptidique (à venir)	WIN 64338 FR173657

a) HOE 140

### 1.3.2 Clonage des récepteurs

Le clonage des acides désoxyribonucléique complémentaires (ADNc) et des gènes des récepteurs des kinines a confirmé leur classification pharmacologique. Ainsi, les ADNc codant pour le récepteur B<sub>2</sub> du rat (McEachern et al., 1991) et de l'homme (Hess et al., 1992) ont été isolés. Plus récemment, le récepteur B<sub>1</sub> a été cloné (Menke et al., 1994). Le séquençage de ces gènes a permis de confirmer que ces récepteurs appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés

aux protéines G (McEachern et al., 1991). Les récepteurs B<sub>2</sub> du rat et de l'homme sont composés respectivement de 366 et 364 acides aminés et possèdent environ 81% d'homologie. La différence la plus frappante entre le récepteur B<sub>2</sub> de l'homme et celui du rat est la délétion de deux acides aminés dans la portion N-terminale extra cellulaire chez le récepteur humain (Hess et al., 1992). La signification de cette délétion et la substitution de d'autres acides aminés dans la fonction du récepteur B<sub>2</sub> restent à être élucidées. Dans les deux cas, on y retrouve trois sites potentiels de N-glycosylation sur les domaines extra cellulaires et quatre sites potentiels de phosphorylation (deux pour la protéine kinase A et deux pour la protéine kinase C) dans les domaines intracellulaires. Ces sites pourraient être impliqués dans la régulation des fonctions du récepteur (Dohlmann et al., 1991). Par analogie avec le récepteur  $\beta$ -adrénergique, une cystéine conservée et localisée dans le segment C-terminal pourrait être palmitilée (O'Dowd et al., 1989). Des résidus sérines et thréonines, qui sont aussi conservés par rapport aux autres récepteurs couplés aux protéines G, pourraient représenter des sites de phosphorylation pour la protéine Bark (Dohlmann et al., 1991).

Chez l'homme, le récepteur B<sub>1</sub> est composé de 353 acides aminés et présente 36% d'homologie avec le récepteur B<sub>2</sub> (figure 4). Le récepteur B<sub>1</sub> possède aussi trois sites de glycosylation en N-terminal, quatre sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C et un site de phosphorylation par la protéine kinase A (Menke et al., 1994). Les études sur la distribution des ARN messagers codant pour le récepteur B<sub>2</sub> ont montré, tant chez l'homme que chez le rat, une forte expression dans le rein, l'utérus et le poumon et une expression plus faible dans le cerveau, le coeur, les testicules et le pancréas (Hess et al., 1992).

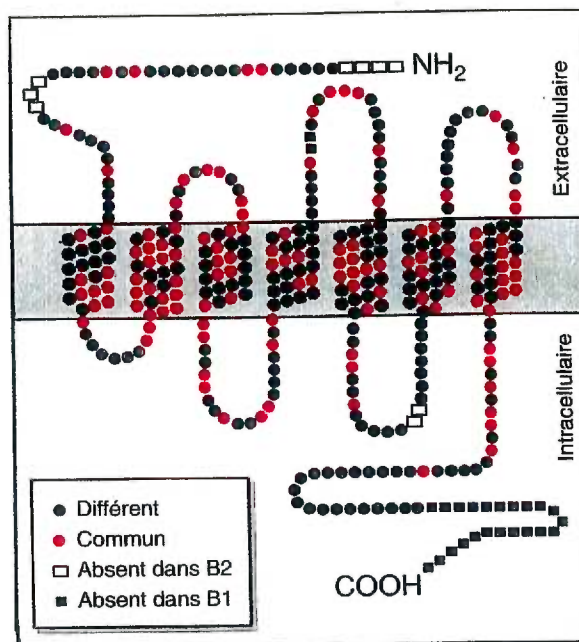


Figure 4: Comparaison de la séquence en acides aminés des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> chez l'homme (Bascands et Girolami, 1996)

### 1.3.3 Sous-types de récepteurs

Le récepteur B<sub>2</sub> a été le plus étudié et on le retrouve grandement distribué dans tout l'organisme, mais de nombreuses études pharmacologiques utilisant des agonistes et des antagonistes suggèrent l'existence d'une population hétérogène de récepteurs de type B<sub>2</sub>. En effet, les récepteurs pour la BK et les autres kinines semblent vouloir se multiplier en parallèle avec la découverte de nouveaux composés qui agissent comme agoniste partiel ou comme antagoniste sur le récepteur B<sub>2</sub>. Le tout a commencé avec les études de Vavrek et Stewart (1985) qui ont suggéré que les contractions de

l'utérus du rat et de l'iléon du cochon d'Inde en réponse à la BK et la réponse hypotensive chez le rat anesthésié à la BK, seraient relayées par différents récepteurs, car ces réponses sont sélectivement réduites ou bloquées par des composés comme le [D-Phe<sup>7</sup>,Hyp<sup>8</sup>]BK, [D-Phe<sup>2,7</sup>]BK et [Phe<sup>2</sup>,D-Phe<sup>7</sup>]BK, respectivement.

Llona et al., (1987) et Rifo et al., (1987) ont aussi proposé l'existence de deux récepteurs différents dans la partie préjonctionnelle (neuronale) et la partie postjonctionnelle (musculaire) du *vas deferens* de rat. Leur hypothèse est basée sur les résultats obtenus avec le [Thi<sup>5,8</sup>,D-Phe<sup>7</sup>]BK, un agoniste partiel qui stimule le côté préjonctionnel et bloque le site postsynaptique. En effet, le [Thi<sup>5,8</sup>,D-Phe<sup>7</sup>]BK s'est avéré être un agoniste puisqu'il induit des contractions du muscle lisse (Rhaleb et al., 1991) et accroît le taux de renouvellement des phosphoinositides dans la lignée de cellules neuronales N1E-115 (Braas et al., 1988). Ce même composé agit comme antagoniste sur une culture de cellules chromafines des glandes surrénales de boeuf (Plevin et Owen, 1988). De plus, le [Thi<sup>5,8</sup>,D-Phe<sup>7</sup>]BK est inactif sur le muscle lisse de la trachée de cobaye (Rhaleb et al., 1988; Farmer et al., 1989). L'ensemble de ces résultats suggèrent l'existence d'un nouveau récepteur de type B<sub>3</sub>. Plus récemment, Saha et ses collègues (1990; 1991) ont proposé que l'effet contractile et la réponse relaxante du muscle lisse de l'oesophage d'opossum par la BK seraient relayés par des récepteurs B<sub>3</sub> (différent de celui de l'équipe de Farmer, 1989), B<sub>4</sub> et B<sub>5</sub>.

---

Afin de résoudre cette énigme, l'équipe de Regoli (1993; 1994) ont entrepris une étude sur plusieurs tissus périphériques isolés (estomac, colon, vessie) de quatre espèces (rat, cobaye, lapin et humain) incluant des vaisseaux isolés

(veine jugulaire et veine cave de lapin, artère pulmonaire de cobaye et veine porte de rat). Les caractéristiques pharmacologiques des sites réceptoriels B<sub>2</sub> obtenues dans cette analyse indiquent que l'hétérogénéité des récepteurs B<sub>2</sub> est associée à des différences d'espèces plutôt qu'à une hétérogénéité moléculaire à l'intérieur d'une même espèce. Ces auteurs proposèrent alors deux sous-types de récepteurs B<sub>2</sub>, soit le B<sub>2a</sub> retrouvé chez le lapin, le chien et possiblement l'homme et le B<sub>2b</sub> retrouvé chez le cobaye, le hamster et le rat.

#### *1.3.4 Actions cellulaires et messagers secondaires*

##### 1.3.4.1 Récepteur B<sub>2</sub>

La BK est surtout connue pour son effet vasodilatateur. Cependant, ce peptide serait impliqué dans de nombreux autres processus, incluant les fonctions cardio-vasculaire, rénale, intestinale, pulmonaire, oculaire, urinaire, immunitaire et l'augmentation de la mobilité des spermatozoïdes. Les effets biologiques rapportés de la BK sont résumés dans le tableau II.

---

**Tableau II : Effets biologiques de la bradykinine**

Organes/Tissus	Récepteurs	Effets biologiques
Système nerveux central	B <sub>2</sub>	- effet sur le comportement, le système cardio-vasculaire et la nociception -antidiurétique
Fibres sensorielles A $\delta$ et C	B <sub>2</sub>	- douleur et inflammation neurogénique
Fibres sympathiques	B <sub>2</sub>	- $\uparrow$ libération des catécholamines
Vaisseaux sanguins (artères)	B <sub>2</sub>	- vasodilatation et augmentation du débit sanguin (via NO, PGI <sub>2</sub> et EDHF) - $\uparrow$ perméabilité vasculaire
(veines)	B <sub>2</sub>	- venoconstriction
Coeur	B <sub>2</sub>	- $\uparrow$ fréquence et débit cardiaque
Artères coronaires	B <sub>2</sub>	- dilatation (via NO et GMPc)
Iris	B <sub>2</sub>	- contraction
Trachée	B <sub>2</sub>	- relaxation (via les PG)
Poumons	B <sub>2</sub>	-Bronchoconstriction - $\uparrow$ sécrétion de mucus
Rein	B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub>	- $\uparrow$ débit sanguin rénal - $\downarrow$ résistance artériole afférente - diurétique, natriurétique
Glandes sudoripares	B <sub>2</sub>	- transport de l'eau et des électrolytes
Iléon (cellules musculaires et épithéliales)	B <sub>2</sub>	- contraction (via PG), sécrétion de CL <sup>-</sup>
Duodénum	B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub>	- relaxation (B <sub>2</sub> ) puis contraction (B <sub>1</sub> )
Côlon (cellules musculaires et épithéliales)	B <sub>1</sub>	- contraction, sécrétion de CL <sup>-</sup>
Vésicule biliaire	B <sub>2</sub>	- sécrétion de bicarbonate
Utérus	B <sub>2</sub>	- contraction
Ovaire	B <sub>2</sub>	- rupture du follicule
Spermatozoïde	B <sub>2</sub>	- $\uparrow$ mobilité
Fibroblastes	B <sub>2</sub>	- $\uparrow$ synthèse de collagène
Cellules immunitaires	B <sub>2</sub>	- libération de médiateurs (cytokines)

Si les effets cellulaires de la BK sont très variés, il en est autant pour les effets intracellulaires. En effet, à l'exception de l'AMP cyclique, le récepteur B<sub>2</sub> est lié à l'activation de nombreux systèmes de seconds messagers connus (Bascands et Girolami, 1996). Bien que le récepteur B<sub>2</sub> fasse partie de la grande famille de récepteurs couplés aux protéines G, la nature des protéines G impliquées est moins bien connue. Toutefois, deux voies métaboliques majeures se démarquent. Il s'agit de la stimulation de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) et de la phospholipase C (PLC).

#### 1.3.4.2 PLC

Dans presque tous les types cellulaires étudiés (cellules épithéliales, fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules de neuroblastomes, cellules mésangiales), la stimulation du récepteur B<sub>2</sub> conduit à l'activation subséquente de la phospholipase C. Activée, cette PLC hydrolyse le phospholipide inositol et forme les inositols phosphates (notamment l'inositol 1,4,5-triphosphate, IP<sub>3</sub>) et le diacylglycérol (Burch et al., 1995). En se fixant au réticulum endoplasmique, les IP<sub>3</sub> provoquent la libération de Ca<sup>2+</sup> et augmentent le calcium intracellulaire [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Cette augmentation constitue une première phase rapide et transitoire suivie d'une augmentation plus lente et soutenue, associée à l'activation de canaux calciques. Le diacylglycérol formé active la protéine kinase C, amenant la phosphorylation d'un nombre varié de protéines intracellulaires (Shearman et al., 1989).

#### 1.3.4.3 PLA<sub>2</sub>

La stimulation du récepteur B<sub>2</sub> peut aussi entraîner l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub>. En hydrolysant les phospholipides membranaires, cette enzyme libère l'acide arachidonique et des acides gras insaturés. Les cyclooxygénases et lipoxygénases vont ensuite métaboliser l'acide arachidonique en écosanoïdes. Ces derniers varient en fonction du type cellulaire étudié; on trouve principalement les prostaglandines E<sub>2</sub> et I<sub>2</sub> mais aussi les leukotriènes et le PAF (*platelet activating factor*) (Burch et al., 1995).



En plus de la stimulation classique des voies de la PLA<sub>2</sub> et de la PLC, la BK active la synthèse du monoxyde d'azote (NOS) retrouvée dans les cellules endothéliales. Ainsi, le monoxyde d'azote (NO) produit va diffuser et stimuler principalement la guanylyl cyclase soluble (GCs) des cellules musculaires lisses (CML) sous-jacentes. Le GMP cyclique formé va provoquer la relaxation des CML. Il est à noter que les prostaglandines dont la prostacycline produite de l'endothélium peuvent aussi induire une vasodilatation. Récemment, une nouvelle voie de transduction stimulée par la BK a été suggérée (Mombouli et Vanhoute, 1995). Malgré le fait que l'on bloque la production des prostaglandines et du monoxyde d'azote, les auteurs ont montré que l'effet vasodilatateur de la BK persiste toujours. Cet effet serait produit par un nouveau facteur endothélial, le facteur hyperpolarisant (EDHF) dérivé de l'endothélium (figure 5). D'autres études seront nécessaires afin d'éclaircir la nature exacte de ce nouveau facteur.

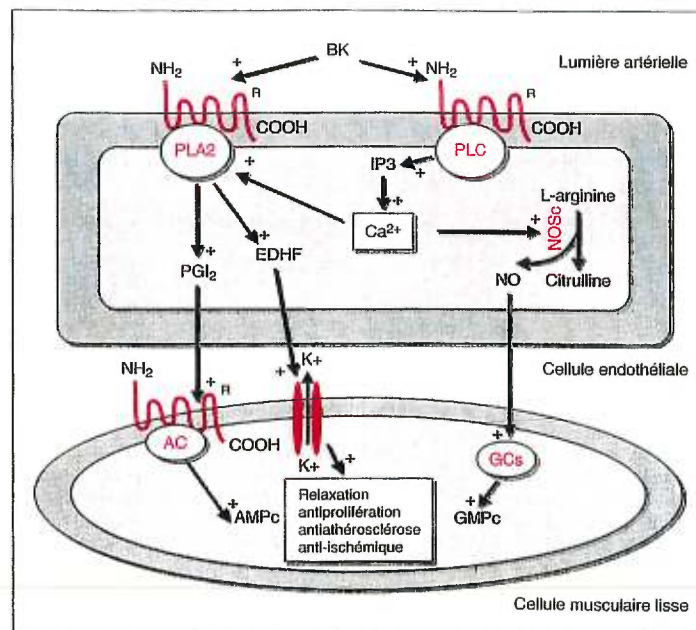


Figure 5: Le récepteur B<sub>2</sub> de la cellule endothéliale. Transduction de signal permettant la relaxation de la cellule musculaire lisse.

#### 1.3.4.4 Récepteur B<sub>1</sub>

Bien qu'un effet vasorelaxant relayé par le récepteur B<sub>1</sub> sur les artères mésentériques et coeliaques du lapin ainsi que sur l'artère rénale et la veine mésentérique du chien ait été rapporté, la fonction attribuée à ce type de récepteur est habituellement la contraction des muscles lisses. Les mécanismes sous-jacents à l'activation du récepteur B<sub>1</sub> sont moins connus, mais ils ne semblent pas très différents de ceux rapportés pour le récepteur B<sub>2</sub>. En effet, la des-Arg<sup>9</sup>-BK stimule la synthèse de prostaglandines par les fibroblastes, les cellules endothéliales et les ostéoblastes (Burch et al., 1995; Hall, 1992). Une augmentation du calcium intracellulaire est aussi observée dans les ostéoblastes (Hall, 1992), les cellules mésangiales (Bascands et al., 1993) et les cellules endothéliales provenant d'artères pulmonaires de boeuf (Smith et al., 1995). La différence la plus marquée entre les deux mécanismes de transduction réside dans la manière d'augmenter le calcium intracellulaire. L'activation du récepteur B<sub>2</sub> mobilise préférentiellement le calcium à partir des réserves intracellulaires alors que l'activation du récepteur B<sub>1</sub> semble être associée à un influx de calcium (Bascands et Girolami, 1996).

### 1.4 Kinines dans la périphérie

---

#### 1.4.1 Activation des neurones sensoriels

Une fois formée, la BK est capable de stimuler les terminaisons nerveuses nociceptives et causer la douleur. Cet effet immédiat de la BK, qui a fait

l'objet d'un grand nombre d'études comportementales et électrophysiologiques (Dray et al., 1988; Lang et al., 1990; Handwerker et Reeh, 1991), semble être le résultat de l'activation des nocicepteurs associés aux fibres de type C. Cependant, les fibres A $\delta$  peuvent aussi être activées. Il a été démontré que la BK provoque une hyperalgésie dose-dépendante qui est inhibée de manière dose-dépendante par un antagoniste du récepteur B<sub>2</sub>, D-Arg,[Hyp<sup>3</sup>,Thi<sup>5</sup>,D-Tic<sup>7</sup>,Oic<sup>8</sup>]-bradykinine (Hoe 140) (Heapy et al., 1991). Dans des conditions où l'hyperalgésie inflammatoire persiste pendant quelques jours ou plus, il y aurait une contribution significative du récepteur B<sub>1</sub> dans l'hyperalgésie (Perkins et Kelly, 1993; Dray et Perkins, 1993). En plus de la capacité d'activer les fibres nerveuses directement (peau, articulations, muscles), la BK produit une sensibilisation des nocicepteurs thermiques et mécaniques par l'intermédiaire des prostaglandines (Mense et Meyer, 1988; Manning et al., 1991).

La stimulation des fibres sensorielles de type C par la BK est aussi responsable d'un effet neurogénique local qui provoque la libération de plusieurs neuropeptides, dont la substance P (SP) et le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) (Wharton et al., 1986; Saria et al., 1988; Geppetti et al., 1990). La stimulation des fibres post-ganglionnaires sympathiques par la BK a été proposée comme un important mécanisme responsable de l'extravasation des protéines plasmatiques et de la formation d'oedème au niveau des articulations durant l'inflammation (Green et al., 1992).

---

### 1.4.2 Kinines et les tissus immunitaires

En plus de permettre l'accès des cellules du système immunitaire au tissu endommagé sous l'action de la vasodilatation et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, le système kallibréine-kinines est en interaction directe avec les cellules du système immunitaire. Premièrement, la kallibréine plasmatique est l'une des plus importantes substances chémotactiques capables de recruter les cellules immunitaires au site de l'inflammation (Kay et Kaplan, 1975). Aussi, le kininogène, la kallibréine et le récepteur B<sub>2</sub> ont été trouvés sur les membranes plasmiques des neutrophiles (Bhoola et al., 1992). Deuxièmement, la BK, la des-Arg<sup>9</sup>-BK et la kallidine stimulent la migration des lymphocytes du rat et de l'homme *in vitro* (McFadden et Vickers, 1989). Troisièmement, les kinines stimulent la production et le relâchement de prostanoïdes et de cytokines à partir d'un grand nombre de tissus incluant les fibroblastes et les cellules endothéliales (pour une revue voir Hall, 1992). Finalement, il est bien connu que les kinines provoquent la dégranulation des mastocytes et le relâchement d'histamine et de sérotonine (Ishizaka et al., 1985; Devillier et al., 1989).

### 1.5 Évidences en faveur d'une action centrale des kinines

Le SNC contient toutes les composantes du système kallibréine-kinine (KK). En isolant un "composé T" qui démontrait une activité semblable à la BK sur plusieurs préparations tissulaires telles le caecum, l'utérus, le colon et l'iléon, Inouye et ses collègues, en 1961, furent les premiers à mettre en évidence la présence de kinines dans le SNC. Plus tard, les études de Hori

(1968) démontrèrent une activité kallicréine et kininase dans des homogénats de cerveaux de bovin et de grenouille. Nous décrivons ci-dessous, les autres études qui tendent à suggérer un rôle pour ces peptides dans le SNC.

## 1.6 Kinines dans le système nerveux central

### 1.6.1 Composantes du système Kallicréine-Kinine

#### 1.6.1.1 Kallicréine

La formation des kinines dans le tissu neuronal a été pour la première fois rapportée par Hori (1968) dans des fractions microsomales d'homogénats de cerveau de lapin. Avec des évidences plus concluantes, la présence de la kallicréine dans le cerveau a été confirmée par des techniques spécifiques de radioimmunoessais (Powers et Nasjletti, 1983; Scicli et al., 1984; Chao et al., 1987) et d'hybridation *in situ* de brins d'ADN complémentaires à l'ARN messager codant pour la kallicréine (Chao et al., 1987). La kallicréine semble être distribuée dans plusieurs régions du SNC incluant le cortex, le tronc cérébral et le cervelet. Cependant, la plus grande concentration a été trouvée dans l'hypothalamus, l'hypophyse et la glande pinéale. Dans la glande pinéale, la kallicréine semble être spécifiquement logée dans ou sur les vaisseaux sanguins (Kitagawa et al., 1991).

### 1.6.1.2 Kininogènes

La présence du précurseur des kinines a été rapportée pour la première fois dans un homogénat de cerveau de rat perfusé pour éliminer les kininogènes circulants (Shikimi et al., 1973). Contrairement à l'étude du groupe de Pela (1975) où le kininogène semblait se retrouver exclusivement dans l'hypothalamus et le tronc cérébral, ces auteurs prétendent que le contenu en kininogène dans le cortex représente le tiers par rapport à ceux du cervelet et du tronc cérébral. Plus récemment, l'immunoréactivité du kininogène à haut poids moléculaire (KHM) a été observée dans des neurones de l'aire périventriculaire hypothalamique qui projettent dans la zone externe de l'éminence médiane. L'immunoréactivité du T-kininogène était restreinte aux neurones magnocellulaires des noyaux périventriculaire et supra optique et aux neurones parvocellulaires du noyau supra chiasmatique (Richoux et al., 1991). Le T-kininogène a aussi été observé dans des homogénats hypothalamiques (10 ng/mg de protéines) et cérébelleux (5.3 ng/mg de protéines) (Richoux et al., 1991). Il paraît évident que d'autres études seront nécessaires pour identifier et localiser les populations cellulaires impliquées.

### 1.6.1.3 Kininases

Une variété de kininases a été identifiée dans les tissus du cerveau, comme les aminopeptidases (Camargo et al., 1972), l'enképhalinase (Camargo et al., 1972; Schwartz et al., 1981) et deux endopeptidases additionnelles désignées kininases A (métalloendopeptidase 24.15) et B (une peptidase dipeptidyl) (Camargo et al., 1973). De plus, l'étude de Orawski et Simmons (1989) a mis

en évidence que la dégradation de la BK par les membranes synaptiques cérébrales était due à l'activité de trois enzymes: 1) une forme de métalloendopeptidase 24.15 liée à la membrane qui hydrolyse le lien Phe<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>; 2) une carboxypeptidase B laquelle coupe le fragment Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup>; et 3) une enzyme référée comme "dipeptidase peptidyle", laquelle clive le fragment Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>. Il est intéressant de voir que cette étude suggère que le peptide BK aurait accès aux membranes synaptiques dans le cerveau.

La détermination de la distribution régionale de l'activité kininase a montré une très forte activité dans le cervelet et le striatum par rapport aux autres régions du cerveau du rat. Par exemple, l'activité dans ces deux régions était approximativement deux fois plus élevée que dans le cortex cérébral. Le niveau d'activité dans les régions du mésencéphale, de l'hippocampe, de la medulla oblongata et de l'hypothalamus n'était pas significativement différent, tandis que dans la moelle épinière l'activité était moindre (Roth et al., 1969; Cushman et Cheung, 1971; Yang et Neff, 1972; Kariya et al., 1981a;b; Elrod et al., 1986). Contrairement au rat, une faible activité kininase est observée dans le cervelet de l'homme (Poth et al., 1975).

#### 1.6.1.4 Métabolites actifs (kinines)

La localisation des kinines endogènes dans le SNC n'a pas été un travail facile. D'abord les kinines sont rapidement métabolisées et il n'est pas facile d'enrayer complètement l'activité des kininases. Ensuite, il y a le manque de spécificité des anticorps, car la séquence peptidique de la BK est retrouvée dans le kininogène pouvant ainsi donner une surévaluation de la présence des kinines. Des bioessais avec des extraits de tissus de cerveau appliqués

sur des préparations de muscles lisses ont suggéré la présence de kinines (Inouye et al., 1961; Hori, 1968; Werle et Zach, 1970; Pela et al., 1975).

En immunocytochimie, la BK immunoréactive a été observée particulièrement dans les noyaux périventriculaires et médiodorsal, dans les corps neuronaux et les fibres de l'hypothalamus (Corrêa et al., 1979). Cette même équipe observa aussi une immunoréactivité dans des fibres et dans les projections situées dans la substance grise péri-épendymaire, dans l'hypothalamus, le perirhinal et le cortex cingulé, la portion ventrale du caudate-putamen et l'aire septale latérale. Aucune trace de la BK n'a été observée dans les autres régions du cerveau et dans la moelle épinière (Corrêa et al., 1979). Malheureusement, ces études ne fournissent pas des données concernant la réaction croisée possible des anticorps avec les kininogènes, lesquels contiennent le déterminant antigénique pour la BK. Faisant appel à des méthodes chromatographiques, Perry et Snyder (1984) ont observé également une forte concentration de BK immunoréactive dans l'hypothalamus. Ces auteurs démontrèrent aussi un signal dans le cortex cérébral, le cervelet, la protubérance, le corpus striatum, l'hippocampe et, contrairement à l'équipe de Corrêa (1979), dans la moelle épinière. Des études similaires menées par l'équipe de Kariya (1985) ont plutôt trouvé une prédominance de la BK dans la glande hypophyse suivi de la medulla oblongata, du cervelet et du cortex. Dans l'hypophyse, leurs résultats montrent que la concentration la plus forte se trouve dans le lobe postérieur par rapport au lobe antérieur. Ces évidences sont consistantes avec les travaux *in vitro* de Powers et Nasjletti (1983; 1984) qui démontrèrent une forte activité kininogénase dans la partie intermédiaire de la glande hypophyse par rapport au lobe inférieur.



Jusqu'à présent, les études se sont concentrées presque exclusivement sur les différentes régions du cerveau. Cependant, Lopes et Couture (1997) entreprirent des travaux afin de détailler anatomiquement la distribution de la BK à travers les laminae de la moelle épinière. Leur étude a démontré que la BK-immunoréactive (BK-LI) présente dans la moelle épinière du rat est principalement localisée dans la corne ventrale et particulièrement dans le péricarion et les processus proximaux des motoneurones. La BK-LI est aussi retrouvée dans les interneurones de la corne dorsale mais avec une densité plus faible. Cette étude comportait un deuxième objectif, soit celui d'examiner la plasticité de la BK-LI en comparaison avec la localisation du récepteur B<sub>2</sub>, rapportée plutôt par la même équipe. La plus forte densité de ces récepteurs était localisée dans les couches superficielles de la corne dorsale (Lopes et al., 1995).

Un traitement avec la capsaïcine, un agent qui cause la destruction massive et permanente des fibres sensorielles myélinisées de petit diamètre (A $\delta$ ) et non myélinisées (C) qui terminent dans la substance gélatineuse (Fitzgerald, 1983), augmentait significativement la BK-LI dans les laminae I-IV. Une rhizotomie unilatérale ou une lésion périphérique du nerf sciatique produit une augmentation ipsilatérale de la BK-LI dans la corne dorsale, tandis que dans la corne ventrale une diminution de l'immunoréactivité de la BK-LI a été observée dans le péricarion des neurones moteurs et dans le neuropile (Lopes et Couture 1997). Ainsi, une relation inverse a pu être démontrée entre le nombre de sites de liaison (récepteur B<sub>2</sub>) et la BK endogène. Des études antérieures ont montré que l'injection dans les ventricules cérébraux (i.c.v.) de méllitine, un composé retrouvé dans le venin d'abeille et qui active la kallicréine membranaire, augmente de 10

fois les taux de kinines-immunoréactives dans le LCR associée à une élévation concomitante de la pression artérielle (Thomas et al., 1984; Thomas et Hiley, 1988; Yang et al., 1989). Dans l'étude de Lopes et Couture (1997), un traitement chronique avec la méllitine par voie intrathécale induit un accroissement significatif de la densité de la BK-LI dans la moelle épinière du rat, suggérant que la stimulation de la kallicréine dans la moelle épinière permet de former plus de BK.

#### 1.6.1.5 Récepteurs des kinines

Les premières évidences portant sur la localisation du récepteur B<sub>2</sub> dans le SNC ont été fournies par la technique d'autoradiographie par Innis et collaborateurs (1981). Bien qu'ils aient eu de la difficulté à reproduire le marquage, ces auteurs observèrent une liaison saturable de haute affinité pour la [<sup>3</sup>H]-BK sur des préparations membranaires de cerveau complet de rat, de cobaye et de cerveau de bovin. Par la suite, Manning et Snyder (1983) confirmèrent la présence de récepteurs B<sub>2</sub> dans la moelle épinière et les ganglions de la racine dorsale du cobaye et du chien. Une année plus tard, des sites fonctionnels pour la BK ont été montrés sur une population de cellules nerveuses "Murine Neuroblastoma Clone N1E-115" (Snider et Richelson, 1984).

En utilisant des analogues de la BK, la caractérisation des sites de liaison à la BK sur une population de cellules embryonnaires de cerveau a fourni des évidences supplémentaires de l'action possible des kinines endogènes dans le SNC (Lewis et al., 1985). De plus, des sites de haute affinité à la BK ont été démontrés sur des tissus neuronaux adultes (Fujiwara et al., 1988). Au cours

de la même année, la présence de sites de liaison pour la [<sup>3</sup>H]-BK sur les terminaisons des fibres sensorielles de type C a été montrée dans la substance gélatineuse de la corne dorsale et du noyau du trijumeau (Streranka et al., 1988). Fujiwara et ses collègues (1989) complétèrent leurs études des sites de liaison à la BK sur des préparations de tissus cérébraux adultes en caractérisant ces derniers. Ces auteurs démontrèrent une première distribution régionale où la plus forte concentration se trouvait au niveau de la protubérance, de la medulla oblongata et de la moelle épinière, suivi d'une densité modérée dans le cortex cérébral et l'hippocampe et enfin d'une faible densité dans les autres régions du cerveau. D'autres équipes, dont celle de Sharif et Whiting (1991), confirmèrent l'identification du récepteur B<sub>2</sub> ainsi que sa distribution régionale dans le SNC.

L'équipe de Privitera (1992) a démontré par autoradiographie la présence de récepteurs de la BK dans la région de la medulla oblongata, plus spécifiquement dans le noyau du tractus solitaire (NTS), dans l'aire postrema, dans le noyau dorsal moteur du nerf vague (X) ainsi que dans le noyau spinal du trijumeau. Leur étude confirme la distribution régionale observée dans les travaux de Fujiwara (1989) pour la medulla et la protubérance, mais ils n'obtiennent pas de liaison spécifique à la BK dans les autres régions du cerveau comme le cervelet et le cortex cérébral. Selon ces auteurs, il pourrait s'agir de sites de liaison à la BK localisés sur des membranes provenant des vaisseaux sanguins intracrâniens ou d'autres sites diffus dans le tissu du cerveau lui-même.

Lopes et collaborateurs (1993a; 1995) entreprirent une étude détaillée de la distribution anatomique du récepteur B<sub>2</sub> ainsi que sa caractérisation

pharmacologique dans les différentes laminae de la moelle épinière de rat et de cobaye. La plus forte densité observée était localisée dans les couches superficielles de la corne dorsale, particulièrement dans la substance gélatineuse et la lamina 1, tandis que les autres laminae montraient une densité modérée à faible. Ces observations sont en accord avec les travaux préliminaires de la localisation du récepteur B<sub>2</sub> dans la moelle épinière (Steranka et al., 1988; Fujiwara et al., 1989; Sharif et Whiting, 1991). De plus, ils fournissent des informations additionnelles sur la quantité de sites spécifiques à travers les segments cervicaux, thoraciques, lombaires et sacrés de la moelle épinière. Bien que le nombre de sites récepteuriel B<sub>2</sub> soit plus élevé chez le cobaye par rapport au rat, leur distribution segmentaire et lamellaire est similaire chez les deux espèces (Lopes et al., 1993a; 1995).

Un traitement à la capsaïcine chez le rat nouveau-né cause une baisse significative de la densité des sites de liaison à la [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>8</sup>-BK] dans les laminae 1 et 2. Ceci suggère une localisation présynaptique sur les afférences sensibles primaires et vraisemblablement sur des neurones sensoriels de petit diamètre (C et A $\delta$ ) terminant dans les laminae superficielles de la corne dorsale (Lopes et al., 1995). Ces mêmes auteurs démontrèrent qu'un traitement intraspinal avec la 6-hydroxydopamine, une neurotoxine pour les fibres noradrénergiques, provoque une baisse significative des sites de liaison à la BK. Cette observation suggère également la présence de récepteurs de la BK sur des neurones noradrénergiques bulbospinaux.

Enfin, la présence du récepteur B<sub>2</sub> a été suggérée sur les cellules gliales. En effet, la BK stimule le taux de renouvellement des phosphatidylinositols sur

des cultures d'astrocytes et d'oligodendrocytes (Richie et al., 1987; Cholewinski et Wilkin, 1988). De plus, la BK provoque un relâchement de l'acide arachidonique des cellules astrocytaires (Burch et Kniss, 1988). D'autres évidences pour la présence de récepteur B<sub>2</sub> sur les cellules gliales proviennent d'études en autoradiographie qui démontrent des sites de liaison pour la [<sup>3</sup>H]-BK sur des astrocytes en culture (Hösli et al., 1992). La caractérisation du récepteur avec l'aide d'antagonistes a confirmé qu'il s'agissait de récepteur du type B<sub>2</sub> (Cholewinski et al., 1991). Des études préliminaires en électrophysiologie sur des cultures d'astrocytes provenant de la moelle épinière ont montré que la BK dépolarise la majorité des cellules analysées (Hösli et al., 1992).

### *1.6.2 Interaction des kinines avec les cellules immunitaires*

De manière similaire à la périphérie, l'activation et le recrutement des cellules immunitaires se produit dans le SNC. Néanmoins, la microglie cérébrale semble jouer un rôle unique et prépondérant dans la réaction inflammatoire et représente l'effecteur immunitaire principal de la population cellulaire dans le SNC (Perry et al., 1993). Comme nous l'avons mentionné plus tôt, la présence du récepteur B<sub>2</sub> sur la microglie constitue la plus grande signification du lien avec les cellules du système immunitaire. De plus, il a été démontré que les astrocytes et les oligodendrocytes sont activés par la BK qui induit un accroissement du taux de renouvellement des phosphoinositides. De surcroît, la BK provoque l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Richie et al., 1987; Stephens et al., 1993; Gimpl et al., 1992; Hosli et al., 1992; Lin et Chuang, 1992) et le relâchement de l'acide

arachidonique (Burch et Kniss, 1988; Burch et Tiffany, 1989). Enfin, une corrélation positive a été observée entre le nombre de macrophages périvasculaires infiltrés dans le cerveau et les tissus spinaux et la concentration sanguine de BK et de des-Arg<sup>9</sup>-BK dans un modèle expérimental d'encéphalomyélite allergique (Germain et al., 1986; 1988).

## 1.7 Action centrale des kinines

### 1.7.1 Action sur le système cardio-vasculaire

L'administration de la BK dans les ventricules latéraux (i.c.v.) (Graeff et al., 1969; Pearson et Lang, 1969) ou dans la circulation cérébrale (Lang et Pearson, 1968) provoque une augmentation marquée et soutenue de la pression artérielle. Cette réponse hypertensive de la BK a été documentée chez le lapin (Graeff et al., 1969), le rat (Pearson et Lang, 1969), le chat (Lang et Pearson, 1968) et le chien (Pearson et Lang, 1969). Lambert et Lang (1970) ont jeté les premières bases du mécanisme d'action de la BK en rapportant que la réponse pressive de la BK chez le rat était prévenue par un prétraitement à la phentolamine (5 mg/Kg, intra-peritonéale) (bloqueur des récepteurs alpha-adrénergiques) et à la morphine (5mg/Kg sous-cutané), mais restait inchangée avec le propranolol (5mg/Kg, intra-peritonéale) (bloqueur des récepteurs bêta-adrénergiques). Il a été suggéré que la BK pourrait stimuler les nocicepteurs dans les méninges et le plexus choroïde (Sicuteri, 1968). Ainsi, l'hypertension observée après l'injection intraventriculaire de BK pourrait être une réponse nociceptive à l'action irritante de ce peptide. De par leur résultat avec la morphine, Lambert et

Lang (1970) proposèrent aussi une composante nociceptive dans le mécanisme sous-jacent à l'action centrale de la BK. Néanmoins, cette hypothèse fut abandonnée lorsqu'il fut démontré que le traitement de rat à la capsaïcine ne prévenait pas la réaction de la BK (Corrêa et Graeff, 1974). En outre, ces auteurs ont montré que l'élévation de pression artérielle causée par l'injection i.c.v. de BK était partiellement antagonisée par la morphine, la diphenhydramine (i.a.) ou la pyriline (i.c.v.) et abolie par la phentolamine (i.c.v.). Enfin, la réponse pressive demeurait inchangée avec l'atropine, l'hexamethonium et le méthysergide. Leurs résultats suggèrent que la réponse hypertensive causée par l'administration i.c.v. de la BK est relayée par un mécanisme central alpha-adrénergique et histaminergique.

Chez le rat, la réponse pressive de la BK administrée i.c.v. a été attribuée à la stimulation de récepteurs B<sub>2</sub> dans l'aire septale latérale (Corrêa et Graeff, 1975), ou alternativement, dans l'aire adjacente à la portion du troisième ventricule (Lewis et Phillips, 1984). Malgré que des lésions de l'éminence médiane ne modifient pas la réponse pressive, suggérant que la vasopressine n'est pas impliquée dans l'augmentation de pression artérielle (Hoffman et Schmid, 1978), des lésions électrolytiques bilatérales des régions septales latérales réduisent grandement ou abolissent complètement l'effet du peptide (Corrêa et Graeff, 1975; Diz et Jacobowitz, 1984). De plus, l'injection dans l'aire latérale septale de phentolamine bloque l'effet de la BK et le prétraitement avec l'antihistaminique pyriline n'a pas d'effet (Corrêa et Graeff, 1976). Près d'une décennie plus tard, avec quelques éléments nouveaux, Pirola et al., (1987) trouvèrent que l'action pressive de la BK injectée dans l'aire septale latérale était inhibée par une administration centrale de phentolamine, de méthysergide ou de 6-

hydroxydopamine (déafférentation spécifique des fibres noradrénergiques) ou de 5-7 dihydroxytryptamine (déafférentation spécifique des fibres sérotonergiques).

Incluant le fait que la BK injectée i.c.v. réduit le contenu en norépinéphrine dans le tronc cérébral (Graeff et al., 1969), ces observations suggèrent fortement que la BK pourrait provoquer le relâchement de la norépinéphrine et produire une activation subséquente des récepteurs alpha-adrénergiques centraux. De plus, l'injection de norépinéphrine, dans les mêmes conditions expérimentales, provoque aussi une réponse pressive qui est bloquée par une injection de phentolamine (Corrêa et Graeff, 1974).

Il existe aussi des évidences que les augmentations de la pression sanguine et de la fréquence cardiaque observées avec la BK, suite à des microinjections dans des noyaux hypothalamiques (dorsomédial et postérieur), seraient produites par l'inactivation du système nerveux parasympathique (Diz et Jacobowitz, 1984).

L'administration d'indométhacine, un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, abolit presque complètement l'effet presseur de la BK chez des rats traités ou non avec le captopril, un inhibiteur de l'ECA (Kondo et al., 1979). Ces résultats indiquent que l'effet presseur de la BK pourrait être principalement relayé par les prostaglandines dans le SNC. De plus, l'administration de prostaglandines E<sub>2</sub> dans les ventricules latéraux provoque une augmentation de la pression artérielle moyenne. Des résultats similaires ont été obtenus par l'équipe de Kariya (1982).



L'équipe de Lindsey (1988) a obtenu des données qui suggèrent que l'augmentation de la pression artérielle provoquée par la BK serait le résultat de la stimulation de sites à la surface dorsale de la medulla. En effet, l'injection de BK dans la région postérieure du quatrième ventricule provoque une augmentation de la pression artérielle plus marquée, plus longue et avec une période de latence plus courte. L'année suivante, cette même équipe caractérisait le récepteur et confirmait qu'il s'agissait du type B<sub>2</sub> (Lindsey et al., 1989). Parallèlement, aucune évidence suggère l'implication du récepteur B<sub>1</sub> dans la réponse pressive de la BK, puisque les agonistes et antagonistes de ce récepteur n'ont aucun effet sur la pression sanguine. Dans la région rostro ventrolatérale de la medulla, l'administration de tissus contenant la kallicréine provoque une très forte augmentation de la pression artérielle (Privitera et Yates, 1995). Par ailleurs, l'injection i.c.v. de méllitine, un activateur des kallicréines membranaires, cause une élévation soutenue du contenu en kinines centrales conjointement à une augmentation de la pression artérielle (Thomas et al., 1984; Yang et al., 1989). Ces résultats établissent l'existence du système KK dans le LCR.

En résumé, un certain nombre d'évidences suggèrent un rôle homéostatique pour les kinines dans la régulation centrale de la pression sanguine. Bien que l'injection d'antagonistes du récepteur B<sub>2</sub> par la voie i.c.v. n'altère pas la pression sanguine ou la fréquence cardiaque chez le rat normotendu (Yang et al., 1989; Madeddu et al., 1990), le récepteur B<sub>2</sub> est localisé dans des aires associées au contrôle cardio-vasculaire. Le mécanisme responsable de l'effet cardio-vasculaire suite à l'administration centrale de la BK semble dépendre du site de l'injection et pourrait inclure une modulation des systèmes nerveux parasympathique et sympathique. L'action de la BK peut être

secondaire au relâchement de d'autres neurotransmetteurs ou neuromodulateurs. En outre, les catécholamines et les prostaglandines semblent relayer les actions centrales de la BK sur le système cardiovasculaire.

### *1.7.2 Action sur la température corporelle*

Il a été rapporté que l'injection i.c.v. de prostaglandines provoque une augmentation de la température corporelle chez le chat (Milton et Wendlant, 1970) et chez le lapin (Stitt, 1973). McGiff et collaborateurs (1976) ont trouvé que la BK est capable d'engendrer le relâchement des prostaglandines. Plus tard, cette dernière observation fut confirmée par d'autres équipes (Kariya et al., 1982; Kondo et al., 1979). Il était vraisemblable de penser que la BK puisse avoir un effet sur la température. Silva e Almeida et Pela (1978) ont exploré cette hypothèse en montrant que l'injection de BK dans les ventricules latéraux cause une augmentation dose-dépendante de la température rectale chez le lapin. De plus, l'injection i.c.v. d'indométhacine et de paracétamole (inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines) inhibe partiellement l'effet hyperthermique, ce qui suggère que les prostaglandines et possiblement d'autres mécanismes sont impliqués dans cet effet hyperthermique de la BK. Selon ces mêmes auteurs, l'hypothalamus serait le site où la BK produit son effet. Une décennie plus tard, le même effet hyperthermique de la BK i.c.v. a été démontré chez le rat (Mohan Rao et Bhattacharya, 1988). Ces auteurs confirmèrent l'inhibition partielle par l'indométhacine et rajoutèrent l'implication de la sérotonine dans les mécanismes sous-jacents à l'action hyperthermique de la BK.

### *1.7.3 Action sur le comportement*

Lorsqu'injectée i.c.v., la BK produit une réponse comportementale biphasique chez le rat éveillé (Lambert et Lang, 1970; Corrêa et Graeff, 1974). La première phase est caractérisée par une vocalisation, des mouvements rapides saccadés et une piloérection. Cette période peut durer de 2 à 5 minutes. La deuxième phase suivant le comportement d'excitation constitue une période de sédation. Ce comportement ne semble pas dépendre de la douleur produite. Chez le lapin, on assiste à une courte phase d'excitation (20-40 sec) accompagnée d'une vocalisation intense, d'une hyperventilation et de nombreux déplacements erratiques qui seraient attribués à de fortes douleurs intracrâniennes (Sicuteri, 1970). On rapporte aussi une phase de sédation subséquente où l'animal semble complètement dépourvu d'activité spontanée.

### *1.7.4 Action antidiurétique*

De concert avec la réponse pressive de la BK, une réduction de la diurèse a été rapportée chez le rat éveillé (Rocha e Silva et Malnic, 1964; Harris, 1971; Hoffman et Schmid, 1978). Cette manifestation était abolie par lésion de l'éminence médiane, suggérant une implication de la vasopressine. Plus récemment, des travaux ont montré que l'administration de BK (1 à 20 ug) i.c.v. chez le rat éveillé cause des augmentations dose-dépendantes et parallèles de vasopressine plasmatique, de pression artérielle moyenne et de fréquence cardiaque (Brooks et al., 1986). Par contre, l'augmentation

significative de fréquence cardiaque a été obtenue avec l'injection de 20 ug de BK.

#### *1.7.5 Action antinociceptive*

Comme nous l'avons mentionné plutôt, une période de sédation suit l'excitation initiale provoquée par l'injection i.c.v. de BK chez plusieurs espèces. Chez le lapin, Ribeiro et collaborateurs (1971; 1973) ont examiné de plus près cet état sédatif et ont montré que l'injection i.c.v. de BK produit un accroissement dose-dépendant du seuil de la douleur causée par la stimulation électrique de la pulpe dentaire. Cet effet antinociceptif était aboli par un prétraitement avec la réserpine et prolongé avec l'aprotinine et le facteur de potentialisation de la BK, deux inhibiteurs des kininases (Ribeiro et al., 1971). Cependant, les résultats avec l'aprotinine peuvent être sujets à interprétation, car il est maintenant connu que l'aprotinine est un inhibiteur polyvalent des protéases avec une capacité d'inhibition affectant principalement la kallicréine tissulaire (Fritz et Wunderer, 1979). Ces auteurs ont aussi proposé la région périaqueducatale et périventriculaire comme sites potentiels pour l'action antinociceptive de la BK i.c.v. Après une longue période de désintéressement, l'équipe de Pelà (1996) a confirmé l'effet antinociceptif de la BK injectée par la voie i.c.v. chez le rat et a démontré que cet effet était relayé par un récepteur de type B<sub>2</sub>. Toutefois, ces auteurs trouvèrent que l'agoniste B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-BK, avait un effet antinociceptif significatif, quoique moins intense que celui induit par la BK. Germany et ses collègues (1996) ont obtenu des résultats similaires chez la souris et ont lancé les premières hypothèses concernant le mécanisme d'action. Ces auteurs ont suggéré avec un prétraitement avec le NG-nitro-L-

arginine (L-NAME) et le bleu de méthylène (inhibiteurs de la NO synthase), un rôle possible du NO dans l'antinociception induite par l'injection i.c.v. de la BK. En revanche, un prétraitement avec le naloxone n'affecte pas l'effet antinociceptif de la BK, indiquant que les opiacés ne sont pas impliqués.

## **1.8 Action des kinines dans la moelle épinière**

### ***1.8.1 Action antinociceptive***

Laneuville et Couture, (1987) trouvèrent que l'injection i.t. de BK au niveau mi-lombaire augmentait le seuil de la douleur (thermonociception) via un récepteur de type B<sub>2</sub> dans le modèle du tail-flick test. Deux années plus tard, avec différents traitements, cette même équipe suggéra que l'injection i.t. de la BK pouvait produire une analgésie (antinociception) en agissant présynaptiquement sur les terminaisons nerveuses des fibres noradrénergiques bulbospinales (Laneuville et al., 1989).

### ***1.8.2 Action sur le système cardio-vasculaire***

L'injection i.t. de BK, KD et de T-kinine, au niveau du neuvième segment thoracique chez le rat éveillé, provoque une augmentation dose-dépendante de la pression sanguine et contrairement à l'injection i.c.v., une diminution concomitante de la fréquence cardiaque (Lopes et Couture, 1992). Cette réponse cardio-vasculaire est rapide et brève, suggérant une action directe au niveau du segment, puisque la demi-vie de la BK est très courte (Décarie

et al., 1996). Rappelons que l'action périphérique de la BK est une vasodilatation qui se traduit par une chute de pression artérielle.

Un traitement systémique à la morphine ou à la capsaïcine (1 semaine plus tôt) n'a pas affecté la réponse cardio-vasculaire de la BK excluant ainsi toute composante sensorielle (Lopes et Couture, 1992). La réponse pressive était augmentée par le propranolol et suite à une section de la moelle épinière cervicale alors qu'elle était convertie en un effet vasodépresseur par le prazosin (antagoniste des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques). Par ailleurs, la bradycardie était convertie en tachycardie par le prazosin, l'atropine (antagoniste des récepteurs muscariniques), le pentolinium (bloqueur des récepteurs nicotiniques ganglionnaires) et suite à une section de la moelle épinière cervicale. Cependant, la réponse cardio-vasculaire de la BK restait inchangée suite à un traitement avec la diphenhydramine et la cimétidine (antagonistes pour les récepteurs  $H_1$  et  $H_2$ , respectivement), l'indométhacine, l'idazoxan (antagoniste des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques), ou après un traitement i.t. avec la 6-hydroxydopamine (Lopes et Couture, 1992). Ces auteurs ont alors proposé que l'élévation de la pression artérielle moyenne provoquée par l'administration i.t. de la BK était relayée par le système sympatho-surrénalien, tandis que la bradycardie serait attribuable à un réflexe vagal impliquant les fibres sensorielles de type C et un circuit neuronal spinobulbaire. La réponse cardio-vasculaire de la BK était bloquée de manière dose-dépendante et de façon spécifique et réversible par l'administration i.t. d'antagonistes sélectifs pour le récepteur  $B_2$  mais non pour le récepteur  $B_1$  (Lopes et al., 1993b). Ces données fournissent des évidences pharmacologiques que les kinines seraient impliquées dans la régulation cardio-vasculaire au niveau

de la moelle épinière. Après ces études, il a été démontré que l'injection de l'antagoniste HOE-140 dans la moelle épinière thoracique du chat diminue l'intensité de l'augmentation réflexe de la pression sanguine et de la fréquence cardiaque causée par la contraction musculaire au cours de l'exercice (Pan et al., 1993; Stebbins et Bonigut, 1996). Selon ces auteurs, la BK stimulerait les terminaisons nerveuses centrales des afférences musculaires impliquées dans le réflexe cardio-vasculaire.

Puisque la moelle épinière constitue un palier hiérarchique dans l'intégration des changements cardio-vasculaires et locomoteur, la BK peut jouer un rôle déterminant dans la régulation centrale de ces deux systèmes par son action spinale.

### *1.8.3 Action sur le comportement*

En parallèle avec les changements cardio-vasculaires, l'injection i.t. de BK, KD et de T-kinine induit une réponse comportementale (Lopes et Couture, 1992). La réponse initiale, moins d'une minute après l'injection des kinines, est de nature nociceptive et caractérisée par une vocalisation, une activité exploratrice et un mouvement de balancements latéraux sur les membres postérieurs. La vocalisation s'intensifie avec l'injection de doses plus fortes. Cette excitation était absente chez les rats prétraités avec la capsaïcine et la morphine, mais accroît en intensité et en durée chez les animaux traités par voie i.t. avec la 6-hydroxydopamine (Lopes et Couture, 1992). De manière similaire à l'injection dans les ventricules latéraux, une deuxième phase caractérisée par une sédation d'une durée d'environ 15 min succède

l'excitation initiale. Chez plusieurs rats, l'administration répétée de BK amène une paralysie flasque des membres postérieurs.

## **1.9 Implication physiopathologique des kinines**

### ***1.9.1 Kinines et inflammation dans le SNC***

Les inflammations cérébrales peuvent se former lors de différents traumatismes, incluant les blessures à la tête, les ischémies cérébrales, les encéphalites, les méningites et les migraines. L'action des kinines sur la vascularisation cérébrale a été intensément étudiée et les mécanismes sont vraisemblablement similaires à ceux retrouvés suite à l'activation du récepteur B<sub>2</sub> dans la vascularisation périphérique. Après un traumatisme expérimental, Ellis et collaborateurs (1988) démontrèrent que les artérioles du cortex du chat se dilatent, mais ne se contractent pas en réponse à la diminution de la tension artérielle de CO<sub>2</sub>. Toutefois, les artérioles prétraitées avec des antagonistes des kinines se dilatent moins et montrent une réactivité normale au changement de CO<sub>2</sub>. La dilatation des artérioles était accompagnée d'une augmentation de la concentration des kinines de 7 à 10 fois par rapport à la normale et pouvait être diminuée par un prétraitement avec des antagonistes du récepteur B<sub>2</sub> (Ellis et al., 1988). Ces auteurs proposèrent alors que les kinines sont d'importants médiateurs dans la vascularisation systémique et centrale après un traumatisme ou une réaction anormale de la fonction vasculaire. Fournissant des évidences supplémentaires, il a été démontré que la BK peut augmenter la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHC) à de petites molécules (Unterberg et al., 1984; Wahl et al., 1985).



Ainsi, le système kallibréine-kinine semble jouer un rôle important dans la réponse pro-inflammatoire tant sur la vascularisation cérébrale que périphérique. Ce système pourrait être aussi impliqué dans les dommages secondaires cérébraux. Une des conséquences les plus importantes de l'inflammation est l'oedème, une complication sérieuse dans de nombreuses conditions neuropathologiques (Macfarlane et al., 1991). Utilisant un modèle d'ischémie, l'équipe de Maier-Hauff (1984a) observa une augmentation de 60 à 80 % du kininogène plasmatique dans le cortex du chat, pendant que chez le lapin l'inhibition de l'activité kallibréine avec un inhibiteur protéique, l'aprotinine, réduisait significativement la formation de l'oedème suivant la lésion froide (Unterberg et al., 1986). Plus tard, Kamiya et collaborateurs (1990) examinèrent les changements de BK plasmatique en relation avec la progression de l'oedème cérébrale dans le modèle d'ischémie du rat spontanément hypertendu et démontrèrent qu'un traitement avec l'aprotinine et la trypsine "soybean" inhibait significativement la formation de l'oedème. De plus, dans le SNC, il existe une relation fonctionnelle entre les prostaglandines et les kinines rendant ces dernières des médiateurs attractifs dans les dommages cérébraux secondaires (Kondo et al., 1979; Kariya et al., 1982).

D'après l'hypothèse de Maier-Hauff (1984a), la BHC est souvent endommagée lors d'un traumatisme cérébral et l'influx vasogénique produit par l'oedème dans l'aire focale et périfocale du traumatisme y amène toutes les composantes du système KK nécessaires pour l'activer. La formation subséquente des kinines causant des dommages cérébraux secondaires serait due à la perte de la protection de la BHC et ensuite d'un manque de système d'inhibition. Cette hypothèse est soutenue par le fait

que dans le plasma, l'activation spontanée du système KK est prévenue par une série d'inhibiteurs, comme l'inhibiteur de la C-1-estérase, l'alpha<sub>2</sub> macroglobuline, l'alpha<sub>1</sub>-antitrypsine et l'antithrombine III qui sont tous inter-reliés entre la coagulation, l'activation du complément et l'activation des kinines.

Enfin, pour être considérée comme médiateur de la modulation de la perméabilité de la BHC et dans le développement de l'oedème cérébrale, la BK répond aux cinq critères suivants: 1) augmente la perméabilité vasculaire cérébrale, 2) induit une réponse vasomotrice dilatatrice, 3) induit la formation de l'oedème, 4) élévation des concentrations des kinines dans le liquide interstitiel suivant l'événement pathologique, et 5) prévention du processus par des inhibiteurs des kinines et de leurs récepteurs.

### *1.9.2 Kinines et l'hypertension artérielle*

L'équipe de Privitera (1994) a démontré une augmentation de sites de liaison pour la BK dans la région dorsale de la medulla chez le rat spontanément hypertendu (SHR) comparativement au rat Wistar Kyoto normotendu (WKY). Alvarez et ses collègues (1992) observèrent aussi une augmentation du nombre de sites de liaison à la [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>1</sup>]-BK dans la région dorsale de la medulla et l'hypophyse mais une diminution dans la glande pinéale. Ces mêmes auteurs démontrèrent une élévation de la concentration de la BK dans l'hypothalamus, le septum et une diminution dans la région dorsale de la medulla chez le rat hypertendu. De plus, les rats hypertendus présentent une augmentation de la concentration de BK et de kininogène dans le LCR (Alvarez et al., 1992).

Chez le SHR, l'administration de la BK dans les ventricules cérébraux latéraux augmente la pression sanguine ainsi que la fréquence cardiaque, quoiqu'un accroissement de la sensibilité à l'effet presseur de la BK est observé chez le SHR (Unger et al., 1981b; Thomas et al., 1984; Lindsey et al., 1988; Martins et al., 1991). L'équipe de Martins (1991) a observé une période de latence plus courte chez le rat hypertendu. Une sensibilité accrue a aussi été démontrée avec l'injection de la BK dans le quatrième ventricule (Lindsey et al., 1988; Martins et al., 1991) et dans la medulla (Privitera et al., 1994). Le récepteur de la BK impliqué dans cet effet presseur chez le SHR et le rat normotendu serait de type B<sub>2</sub> (Lindsey et al., 1988; 1989; Madeddu et al., 1990; Martins et al., 1991). Ces auteurs ont démontré que les antagonistes B<sub>2</sub> (HOE 140) et B<sub>1</sub> ([Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK) n'altèrent pas l'hypertension au repos et que l'agoniste B<sub>1</sub> n'a pas d'effet cardio-vasculaire apparent suite à son injection i.c.v. ou dans le quatrième ventricule. En revanche, d'autres équipes ont trouvé que l'administration d'antagonistes du récepteur B<sub>1</sub> n'a pas d'effet sur la pression sanguine, mais provoque une diminution de la fréquence cardiaque chez le rat hypertendu de 14 semaines (Unger et al., 1981b; Yang et al., 1988). D'autres auteurs ont observé que l'administration de l'antagoniste B<sub>1</sub>, [Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK, dans les ventricules latéraux provoque une réduction de la pression artérielle moyenne et de la fréquence cardiaque de manière dose-dépendante chez le rat SHR (Alvarez et al., 1992). Ces résultats suggèrent que le récepteur B<sub>1</sub> central peut avoir un rôle physiopathologique dans l'hypertension artérielle. L'inhibition de l'activité kininase avec l'injection i.c.v. de captopril (Unger et al., 1981; Madeddu et al., 1990) ou avec une association d'énalapril et de CPP-Ala-Ala-Phe-pAB (Fior et al., 1992) produit une augmentation de la pression artérielle moyenne chez le SHR, bien qu'aucun changement n'a été observé

chez le rat normotendu. Il est possible que l'inhibition de la kininase II favorise la voie de dégradation de la BK par la kininase I et engendre une augmentation de la production de des-Arg<sup>9</sup>-BK, l'agoniste du récepteur B<sub>1</sub>, qui à son tour augmenterait la pression artérielle (Walker et al., 1995).

Le captopril peut aussi augmenter la pression sanguine en prévenant la dégradation de d'autres peptides, tels l'enképhaline, la neurotensine et la SP (Erdös et Skidgel, 1986). Afin d'exclure ces deux dernières possibilités, Madeddu et collaborateurs (1990) ont démontré que l'effet presseur du captopril ou de l'énalapril est complètement aboli par l'injection concomitante d'antagonistes spécifiques du récepteur B<sub>2</sub>. De plus, l'effet du captopril est non seulement bloqué mais renversé en un effet hypotenseur en présence d'antagoniste B<sub>2</sub>. Il intéressant de noter ici que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sont anti-hypertenseurs (Unger et al., 1984).

Les résultats contradictoires de l'effet des antagonistes du récepteur B<sub>1</sub> chez le SHR peuvent être attribués à la capacité de pénétration de ces derniers dans le cerveau. Madeddu et son équipe (1996) ont utilisé des oligonucléotides antisenses (ODN) complémentaires à la séquence d'ARNm du récepteur B<sub>2</sub> et du kininogène. Cette stratégie a pour but d'interférer avec l'information nécessaire à l'assemblage des protéines. L'injection i.c.v. d'antisense synthétique ODN visant le codon d'initiation de la translation de l'ARNm du kininogène et du récepteur B<sub>2</sub> provoque une élévation de la pression sanguine moyenne plus forte chez le SHR de 9 semaines versus le rat normotendu. L'injection répétée de ODN pour le kininogène amène un effet vasopresseur prolongé. Ces mêmes auteurs ont observé qu'une micro

injection d'antisense ODN pour le récepteur B<sub>2</sub> dans le noyau du tractus solitaire accroît la pression sanguine chez le SHR et prévient l'effet vasopresseur induit par une micro injection intranucléaire de BK. En outre, ces auteurs ont évalué la distribution de ces antisenses en les conjuguant avec la fluorescine isothiocyanate. Un signal fluorescent très fort était observable dans l'hippocampe, le thalamus, l'hypothalamus périventriculaire, le tronc cérébral et le cervelet. Ces résultats indiquent que le système KK peut jouer un rôle dans la régulation de la pression sanguine et suggèrent que ce système peut exercer une action protectrice contre de nouvelles élévations de la pression sanguine chez le SHR. Pour l'instant, ces résultats sont difficilement conciliables avec ceux obtenus avec les antagonistes des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>. Aussi d'autres études seront nécessaires afin d'élucider les interactions complexes au niveau des différents noyaux du cerveau.

### *1.9.3 Kinines et l'hyperthermie*

La BK injectée dans les ventricules latéraux provoque une augmentation de la température corporelle (Almeida e Silva et Pelà, 1978; Mohan Rao et Bhattacharya, 1988). Cependant, un grand nombre de peptides causent l'hyperthermie lorsqu'ils sont injectés dans le cerveau et il a été démontré qu'ils peuvent tous avoir un rôle physiologique dans la thermogénèse (pour une revue, voir Rothwell, 1994). Pour déterminer si les kinines sont importantes dans la thermogénèse, le groupe de Walker (1996) s'est servi du modèle d'induction de l'hyperthermie par les endotoxines. En effet, il a été démontré que l'injection de LPS (1 µg i.c.v.) induit une élévation de la température corporelle du rat qui atteint un maximum entre 6 et 8 h après

l'injection de LPS (Luheshi et al., 1993). De plus, l'injection i.c.v. de LPS provoque une réponse inflammatoire caractérisée par l'infiltration des neutrophiles et des macrophages dans les ventricules, le plexus choroïde et l'espace sous-arachnoïde, mais pas dans le parenchyme du SNC (Andersson et al., 1992).

En utilisant ce modèle, Walker et al., 1996 trouvèrent que la co-administration de l'antagoniste du récepteur B<sub>2</sub> (HOE 140) avec les LPS prévient le développement de l'hyperthermie. Dans leur étude, la co-injection d'antagonistes B<sub>1</sub> n'a pas d'effet sur le développement de l'hyperthermie. Cependant, des études sur l'inflammation persistante en périphérie ont montré que le récepteur B<sub>1</sub> est induit dans les stades plus avancés de l'inflammation (Regoli et al., 1986; Hall, 1992; Perkins et Kelly 1993; Davis et Perkins, 1994). Coelho et ses collaborateurs (1997) ont vérifié cette possibilité en montrant que l'injection d'un agoniste B<sub>1</sub> (des-Arg<sup>9</sup>-BK), 24 h après l'injection de LPS i.v., provoque une augmentation de la température corporelle. Cet effet du des-Arg<sup>9</sup>-BK non reproduit par la BK dans la phase tardive de l'inflammation était inhibé par la co-administration d'antagonistes B<sub>1</sub> avec les LPS. En tenant compte du fait que la dégradation de la BK par la kininase I engendre la des-Arg<sup>9</sup>-BK qui active le récepteur B<sub>1</sub>, ces auteurs proposèrent que les récepteurs B<sub>2</sub> et B<sub>1</sub> centraux sont impliqués respectivement dans l'induction et la maintenance de la fièvre induite par les LPS. La désensibilisation et /ou l'internalisation du récepteur B<sub>2</sub> et la sur-expression et/ou l'induction du récepteur B<sub>1</sub> dans le SNC après un traitement au LPS pourraient jouer un rôle physiopathologique dans l'induction et la maintenance de la fièvre (Coelho et al., 1997).

#### *1.9.4 Autres évidences de la présence du récepteur B<sub>1</sub> en situation physiologique et pathologique*

Bien que le récepteur B<sub>1</sub> humain ait été récemment cloné à partir de fibroblastes du poumon (Menke et al., 1994), ce récepteur est normalement exprimé durant les stades pathologiques, après un dommage tissulaire, ou durant l'incubation des tissus *in vitro* pendant quelques heures dans un médium physiologique à 37°C. Toutefois, dans des conditions normales, les deux récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> relayent aussi bien l'action vasodilatatrice des kinines sur l'artère rénale isolée du chien (Rhaleb et al., 1989) que la vasorelaxation responsable de l'élévation du flux sanguin rénal chez le chien *in vivo* (Lortie et al., 1992). De plus, Nakhostine et collaborateurs (1993) ont démontré une réponse hypotensive due à l'activation du récepteur B<sub>1</sub> suite à l'injection intraveineuse de des-Arg<sup>9</sup>-BK chez le chien. Une réponse électrophysiologique a été obtenue sur une muqueuse isolée du colon chez cette même espèce (Rangachari et al., 1993).

Mise à part ces résultats chez le chien, le récepteur B<sub>1</sub> semble plutôt jouer un rôle dans les stades variés de l'inflammation. L'induction de l'oedème après l'injection intraplantaire de carragénine est un modèle standard pour étudier l'activité des drogues anti-inflammatoires (Winter et al., 1962). Il a été démontré que le polysaccharide carragénine peut activer le système de contact, lequel amène une production de kinines (Hargreaves et al., 1988). Notre laboratoire a montré une augmentation de la production de BK et de des-Arg<sup>9</sup>-BK suite à l'injection intraplantaire de carragénine chez le rat (Décarie et al., 1996a). Bien que la concentration de des-Arg<sup>9</sup>-BK soit plus grande (5 fois) que celle de la BK, le récepteur B<sub>1</sub> ne joue pas de rôle

significatif dans l'oedème produit par la carragénine. Par contre, le récepteur B<sub>1</sub> serait impliqué dans la régulation de la production des taux hépatiques du T-kininogène dans ce même modèle (Raymond et al., 1996).

L'agoniste du récepteur B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-BK, injecté par la voie intraveineuse s'est montré inactif chez le rat, le cobaye, et le lapin. Toutefois, l'injection intra-artérielle ou intraveineuse de des-Arg<sup>9</sup>-BK est accompagnée d'une baisse dose-dépendante de pression sanguine chez le lapin traité 5 h plus tôt avec des doses sous léthales de LPS (Regoli et al., 1981; Marceau et al., 1984). Plus tard, des effets vasodépresseurs similaires ont été démontrés chez le rat Brown/Norway déficient en kininogène prétraité au LPS (Tokumasu et al., 1995; Ueno et al., 1995). Chez le rat Wistar anesthésié, Nicolau et collaborateurs (1996) ont rapporté une diminution de tension artérielle suite à l'injection de l'agoniste du récepteur B<sub>1</sub> résistant au métabolisme, Sar[D-Phe<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK, sur une période de 18 à 24 h après pré-traitement au LPS.

L'injection i.c.v. de LPS provoque le développement de l'hyperthermie chez le rat et il a été démontré que les kinines sont impliquées dans ce processus (Silva e Almeida et Pela, 1978; Mohan Rao et Bhattacharya, 1988; Walker et al., 1996; Coelho et al., 1997). En effet, le récepteur B<sub>2</sub> serait impliqué dans l'induction de la fièvre alors que le récepteur B<sub>1</sub> se manifesterait dans la phase tardive de la fièvre. Cependant, aucune étude n'a encore démontré les effets centraux des kinines et des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> sur le système cardiovasculaire après traitement au LPS.

La streptozotocine (STZ) a été largement utilisée pour induire le diabète sucré du type I chez les animaux. Cette maladie expérimentale se caractérise



par une légère inflammation des îlots de Langerhans (Kolb-Bachofen et al., 1988). Les kinines étant considérées comme d'importants médiateurs pro-inflammatoires dans la pathogénèse de plusieurs maladies, il est possible que ces dernières aient un rôle dans le développement du diabète. Or, il a été démontré que les souris diabétiques (STZ) traitées avec l'antagoniste du récepteur B<sub>1</sub>, [Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK, avaient une glycémie normale et une normalisation complète de la diurèse et de l'excrétion de kallikréines, de nitrites et de protéines (Zuccollo et al., 1996). Récemment, Pheng et al (1997) ont montré que le récepteur B<sub>1</sub> était surexprimé dans le fundus de l'estomac de la souris diabétique traitée avec la STZ.

Il a été suggéré que le récepteur B<sub>1</sub> jouerait un rôle important dans les mécanismes de contrôle de l'hyperalgésie mécanique (Perkins et al., 1992; Davis et Perkins, 1994) et thermique (Perkins et Kelly, 1993). Comme mentionné à la section 1.9.2, le récepteur B<sub>1</sub> central serait possiblement impliqué dans l'hypertension. De plus, Chakir et collaborateurs (1995b) ont démontré une hypersensibilité du récepteur B<sub>1</sub> sur la veine porte du rat spontanément hypertendu (SHR). Enfin, tout récemment, Lagneux et Ribuoat (1997) ont observé l'induction du récepteur B<sub>1</sub> qui se manifeste par l'apparition d'un effet hypotenseur suite à l'administration i.v. de des-Arg<sup>9</sup>-BK chez le rat anesthésié ayant subi un stress thermique.

---

## *2.0 Objectifs généraux du mémoire*

Ce mémoire vise à mettre au point des modèles expérimentaux pour étudier l'action centrale des kinines sur le récepteur B<sub>1</sub>. Notre hypothèse est que le récepteur B<sub>1</sub> peut aussi être exprimé centralement dans des modèles

d'animaux où le récepteur B<sub>1</sub> est induit en périphérie. Cette hypothèse sera évaluée par des études fonctionnelles où l'on mesure les réponses comportementales et cardio-vasculaires suite à l'injection i.c.v. et i.t. de kinines chez le rat non anesthésié. Dans un premier temps, deux modèles d'inflammation seront utilisés: a) celui de la carragénine injectée par voie intraplantaire dans les deux pattes postérieures de l'animal; b) celui du LPS injecté par voie systémique ou centrale. Enfin, l'implication des kinines via le récepteur B<sub>1</sub> central sera analysée chez un modèle de rat diabétique utilisant la STZ pour l'induction du diabète du type I.

---

# Chapitre II

## Matériels et méthodes

---

## *2.0 Animal*

La présente étude a été réalisée chez des rats Wistar mâles de 275-325 g (Charles River, St. Constant, Québec, Canada). Les animaux ont libre accès à la nourriture et à l'eau et sont soumis à un cycle journalier de 12 heures de luminosité et de noirceur (luminosité à 06:00-18:00 h).

## *2.1 Procédures chirurgicales*

Les cathéters de polyéthylène (PE) (Intramedic, Clay Adam, NJ., U.S.A.) sont préparés un jour avant la chirurgie. Toutes les canules sont remplies avec du silicone (100%) (Sigmacote, Sigma, MO., U.S.A.) puis rincées après 10 minutes avec une solution isotonique au sang (0.9% de NaCl P/V). Ce traitement prévient l'adsorption des peptides au PE et prévient la coagulation sanguine ou la formation de thrombus dans les cathéters. Avant la chirurgie, tous les rats sont anesthésiés au pentobarbital (65 mg/Kg, i.p.) (Somnotol; MTC pharmaceutical, Mississauga, Ont., Canada).

### *2.1.1 Implantation intrathécale*

Une canule est installée de façon permanente dans l'espace sous-arachnoïdien chez le rat. Cette technique a d'abord été décrite par Yaksh et Rudy (1976) puis modifiée dans notre laboratoire. Sous anesthésie au pentobarbital (65 mg/Kg, i.p.), une incision de 3 cm est pratiquée dans la peau qui recouvre la partie dorsale du cou. Les deux premières couches musculaires sont dégagées à l'aide de pinces à bouts pointus, puis la

troisième couche est incisée avec des micro-ciseaux sur la ligne médiane. Après l'incision, à l'aide d'un petit rétracteur, on peut visualiser facilement la membrane atlanto-occipitale composée d'une couche fasciale superficielle plus épaisse et de la dure-mère qui couvre la cisterna magna de l'espace sous-arachnoïdien. On pratique une fine incision médiane de la fascie superficielle avec la partie lamellaire d'une aiguille no.23. On tamponne les gouttelettes de sang qui peuvent apparaître, puis avec la pointe de la même aiguille, on perfore la dure-mère qui est blanche et luisante. La perforation est adéquate lorsque le LCR s'y échappe. Une canule intramédullaire, en polyéthylène (PE-10), est introduite par l'orifice et poussée très soigneusement par un mouvement de rotation du cathéter entre l'index et le pouce jusqu'au neuvième segment thoracique (T-9). Il est important de ne sentir aucune résistance dans la poussée du cathéter afin d'éviter des dommages tissulaires pouvant causer un déficit moteur ou même la paralysie. Pour repérer la région où se trouve le neuvième segment thoracique, on palpe la colonne vertébrale à partir des segments cervicaux afin de sentir les apophyses épineuses. Vers le milieu du dos, on peut repérer une région plate surélevée par rapport aux apophyses précédentes. Le neuvième segment thoracique se situe juste avant ce plateau et est identifié avec un stylo feutre. La longueur du cathéter à insérer est déterminée par la distance entre cette marque de crayon et l'orifice dans la membrane atlanto-occipitale.

---

La canule est alors fixée au crâne comme suit: à la surface pariétale, deux petits segments (5 mm) d'un tube en polyéthylène (PE-60) sont collés en parallèle dans l'axe rostrocaudal avec de la colle cyanoacrylate (Krazy glue, Chicago, Illinois). Le bout libre de la canule i.t. est passé, tour à tour, dans

les deux segments de PE-60 de manière à lui assurer une orientation caudale. La canule est alors collée en place. On procède à la suture des muscles et de la peau. Le bout libre de la canule est enroulé sur lui-même et cette formation en boucle est maintenue avec un ruban adhésif, empêchant ainsi l'animal d'agripper le cathéter et de le mordiller. Le volume mort de cette canule est rempli avec 10  $\mu$ l de LCR artificiel.

Une période postopératoire de trois jours est allouée aux animaux. Ceux qui présentent un déficit moteur au cours de cette période seront sacrifiés dans une chambre à gaz ( $\text{CO}_2$ ). Après les expériences, la position exacte de la canule i.t. est vérifiée en postmortem en injectant du bleu d'Evans dans le cathéter pour le rendre visible après laminectomie.

### 2.1.2 Implantation d'un cathéter intracérébroventriculaire

Sous anesthésie au pentobarbital (65 mg/Kg, i.p.), la tête du rat est fixée avec un appareil stéréotaxique (David Kopf Instrument, Tujunga, CA, U.S.A.). Une incision médiane dans l'axe rostrocaudal est pratiquée dans le cuir chevelu. À l'aide d'un porte coton imbibé de peroxyde ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) on assèche et nettoie la surface exposée du crâne pour identifier les sutures crâniennes bregma et lambda qui servent de points de références pour les coordonnées stéréotaxiques. Après la perforation du crâne avec une drille, une canule PE-20 (d'une longueur pouvant accueillir un volume de 4  $\mu$ l) est implantée à l'aide d'un guide dans le ventricule latéral droite selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes: 0.6 mm caudal à la bregma, 1.3 mm latéral droite à partir de la ligne médiane et 5 mm de profondeur à partir de la surface du crâne. Le bout extérieur de la canule est délimité par

l'enroulement d'un ruban adhésif (1.5 cm de longueur et 3 mm de largeur) formant une bague pour éviter qu'elle puisse s'enfoncer. Deux bouts de tubes (PE-60) disposés parallèlement dans l'axe rostrocaudal sur le crâne et ayant un point de contact sur la bague de ruban adhésif sont collés avec de la colle cyanoacrylate. Cette manoeuvre a pour but de donner un point d'encrage supplémentaire au ciment dentaire (Reliance Dental MFG Co., Worth, IL. U.S.A.) qui fixe le tout. La peau est suturée et l'aire chirurgicale est nettoyée avec une tige à bout de coton. Une période postopératoire de cinq jours est allouée aux animaux.

Pour confirmer l'emplacement de la canule, 25 pmoles d'angiotensine II sont injectées i.c.v. à la fin des expériences. De 90 à 100% des animaux manifestent un comportement de dipsomanie pendant près de 15 minutes. De plus, le bleu d'Evans est injecté pour la coloration des ventricules.

### 2.1.3 Implantation intra-vasculaire

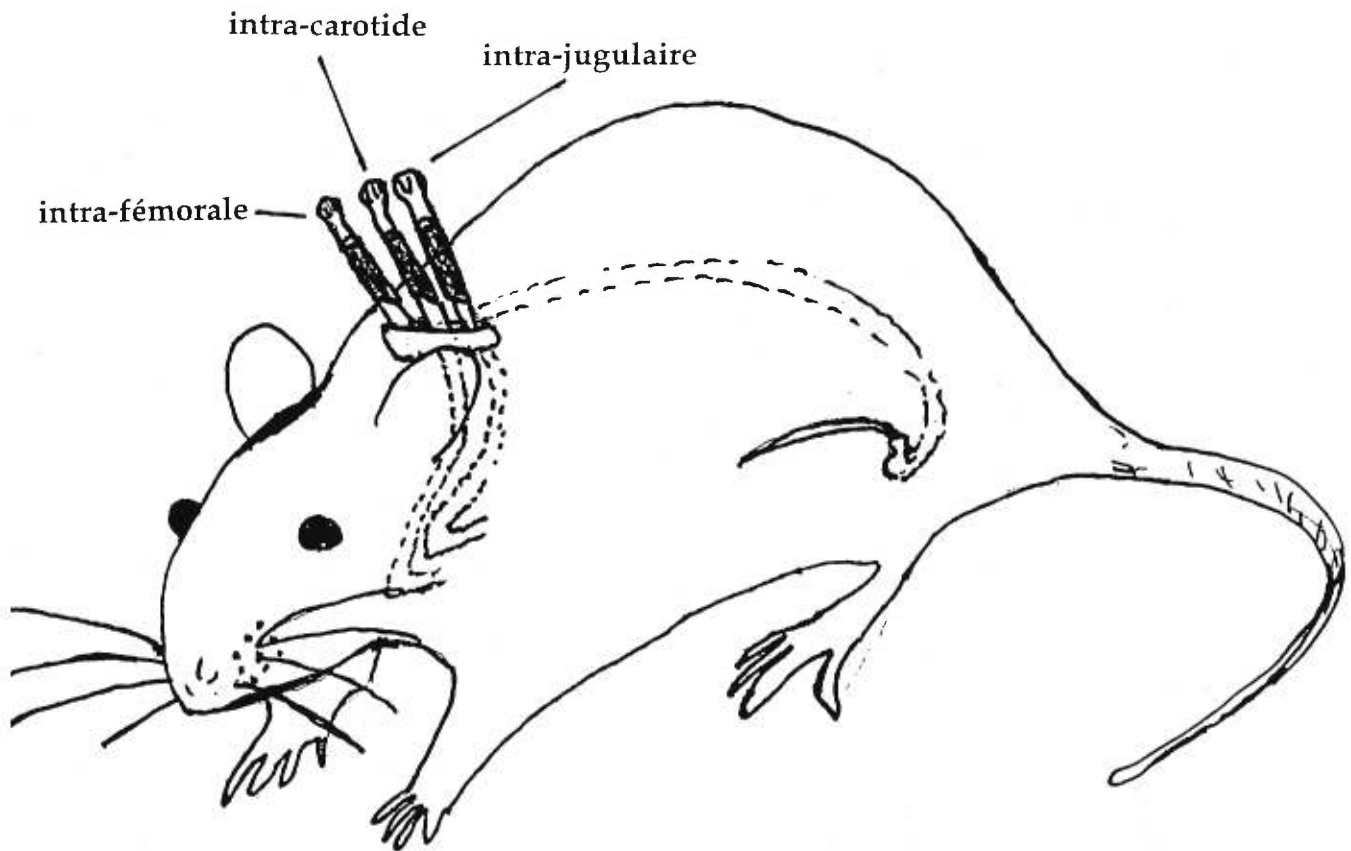
Une veine jugulaire et une artère carotide sont canulées avec un cathéter de polyéthylène siliconé (PE-50) contenant une solution isotonique (0.9% de NaCl P/V) contenant de l'héparine (100 U.I./ml). Ainsi, ces deux canules permettront de procéder à des injections vers le coeur par la voie artérielle ou par la voie veineuse. Un autre cathéter siliconé (PE-50 étiré) est inséré dans l'aorte descendante via l'artère fémorale, afin de mesurer les paramètres cardio-vasculaires, soit la pression artérielle directe et la fréquence cardiaque.

Les cathéters sont passés dans un tunnel sous-cutané puis extériorisés au niveau de la nuque. Les canules ont une conformation en L pour diminuer la torsion des vaisseaux et sont fixées à la peau. Le bout extérieur des canules mesure environ 2 cm et est bloqué à l'aide d'un bouchon maison. Lorsqu'il y a plusieurs canules extériorisées par la nuque, ces dernières sont alignées parallèlement et fixées ensemble avec un ruban adhésif (Figure 6). Ce montage permet à l'animal d'être complètement libre dans sa cage tout en protégeant les canules. L'implantation de cathéters intravasculaire se fait le jour précédant l'expérimentation. Une période minimale de 24 h est respectée entre la fin de la chirurgie et le début de l'expérience, afin de permettre aux animaux de se remettre de l'anesthésie et du stress subi pendant la chirurgie.

#### 2.1.4 Soins post-chirurgicaux

Après la chirurgie, les animaux sont réchauffés sous une lampe jusqu'au moment où ils commencent à se réveiller, ce qui permet de compenser pour les baisses de température corporelle dues à l'anesthésie. De façon à prévenir la coagulation dans les cathéters, on injecte environ 0.3 ml de saline héparinée (100 U.I./ml) par la canule qui accède à l'artère fémorale. Si les animaux sont gardés plusieurs jours, cette manoeuvre est répétée à chaque jour avant et à la fin de chaque expérience. Les rats sont gardés dans des cages individuelles et ont libre accès à l'eau et à la nourriture.





**Figure 6:** Représentation schématique de l'implantation des canules i.c., i.v. et intra-fémorale

## *2.2 Mesure des paramètres cardio-vasculaires*

Les paramètres cardio-vasculaires sont mesurés à l'aide d'un transducteur de pression (Statham modèle P231D) et d'un tachomètre cardiaque (modèle 7P4) (le signal de la fréquence cardiaque est déclenché par les pulses de pression artérielle), couplés à un polygraphe Grass de modèle 79D (Grass Instruments Co., Quincy, MA., U.S.A.). Avant de procéder à l'enregistrement, 0.3 ml de saline héparinée (100 U.I./ml) est injectée par le cathéter intra-fémoral. Ensuite, une extension tubulaire (PE-60) relie le cathéter au transducteur. Une heure d'enregistrement sans injection est nécessaire pour laisser agir l'héparine et pour permettre à l'animal de s'habituer à son nouvel environnement. Pendant l'enregistrement, l'eau et la nourriture sont retirées des cages. Ces expériences sont réalisées le jour dans une chambre isolée des bruits où seul l'expérimentateur est présent. Toutes les expériences sont réalisées chez le rat éveillé.

Lorsque la pression artérielle moyenne (PAM) et la fréquence cardiaque (FC) sont stables, on procède à l'injection des véhicules, tels la saline et le LCR. Le volume et la composition du véhicule correspondent à ceux contenant la substance qui sera injectée. Les volumes d'injections sont de 10  $\mu$ l (i.t.), 1  $\mu$ l (i.c.v.) et de 150  $\mu$ l (i.v. et i.a.). Le temps d'injection est de 5 sec (i.c.v.) et de 30 sec (i.t., i.v. et i.a.). Le temps d'enregistrement correspond à celui qui permet de couvrir l'effet de la substance jusqu'au retour des valeurs de base. Lorsque la PAM et la FC sont de retour aux valeurs initiales, on rince la canule avec le véhicule afin de nettoyer cette dernière des peptides qui auraient pu s'adsorber au PE. Les injections centrales sont faites au moyen d'une seringue Hamilton ayant un volume de 50  $\mu$ l.

Pendant l'expérience, les peptides sont conservés sur la glace puis réchauffés dans la main avant l'injection.

### *2.3 Protocoles expérimentaux*

#### **2.3.1 Effets central et périphérique du des-Arg<sup>9</sup>-BK sur le système cardio-vasculaire après un traitement à la carragénine**

Le récepteur B<sub>1</sub> serait impliqué dans la régulation des taux hépatiques du T-kininogène dans le modèle du rat traité à la carragénine (injection intraplantaire 0.1%) (Raymond et al., 1996). Notre hypothèse est que le récepteur B<sub>1</sub> peut être exprimé à la fois centralement et en périphérie. L'agoniste B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-BK, est injecté par la carotide et par la jugulaire pour évaluer son action périphérique sur le système cardio-vasculaire. Son effet central est évalué par l'injection i.t. au niveau du neuvième segment thoracique. Ces expériences sont menées chez trois groupes de rats: groupe 1, injection par l'artère carotide, groupe 2, injection i.t. et groupe 3, injection par la jugulaire. Dans un premier temps, chaque rat reçoit l'injection du véhicule, soit 10 µl de LCR pour les injections i.t. et 150 µl de saline pour les injections intravasculaires. Quinze minutes plus tard, les trois groupes reçoivent une injection de des-Arg<sup>9</sup>-BK (6.5 nmoles/rat) par leur canule respective. Les paramètres cardio-vasculaires (PAM et FC) sont enregistrés pendant une période de 15 min, puis l'animal est débranché du transducteur et reçoit une injection intraplantaire de 50 µl de carragénine lambda (1% dilué dans de la saline 0.9%) dans chaque patte postérieure. Les effets i.v. et i.c. du des-Arg<sup>9</sup>-BK (6.5 nmoles/rat) sur le système cardio-vasculaire seront mesurés à nouveau à 3 h, 6 h et 12 h après le traitement à la carragénine, alors que les

effets i.t. de l'agoniste (6.5 nmoles/rat) seront mesurés à 3 h, 6 h, 12 h et 24 h après le traitement à la carragénine.

La carragénine est préparée au moins 24 h d'avance afin d'obtenir des oedèmes plus reproductibles (Décarie et al., 1994). L'injection de carragénine est toujours réalisée entre 08:00 et 09:00 A.M. pour éviter les variations circadiennes possibles sur la formation de l'oedème (Loubaris et al., 1983).

### 2.3.2 Effets central et périphérique du des-Arg<sup>9</sup>-BK sur le système cardiovasculaire après un traitement i.a. au LPS chez le rat

Cette étude comporte trois groupes de rats implantés avec une canule intra-fémorale pour l'enregistrement de la PAM et de la FC. Les rats du premier groupe ont une canule dans la carotide (i.c.) et dans l'espace intrathécal (i.t.). Le deuxième groupe dans la veine jugulaire (i.v.) et le troisième groupe de rats possède une canule implantée dans le ventricule droite (i.c.v.). Tous les groupes reçoivent d'abord le véhicule LCR (i.t. et i.c.v.) ou la saline (i.v. et i.a.). Ensuite, 15 min plus tard, l'agoniste des-Arg<sup>9</sup>-BK est injecté à 0.65 nmoles/rat (i.c.v.), 6.5 nmoles/rat (i.t.) et 65 nmoles/rat (i.v. et i.c.). Une période de 20 à 30 minutes sépare l'injection i.c. et i.t. L'injection de l'agoniste sera répétée à 12 h et 24 h après l'injection de LPS (100µg/kg via l'artère fémorale). Seuls les rats avec la canule i.v. et i.c.v. auront une injection à 48 heures après LPS. Les LPS sont dilués dans la saline (100µg/ml) et préparés quelques minutes avant injection entre 09:00h et 10:00h A.M.

### 2.3.3 Effets central et périphérique de l'agoniste résistant Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK sur le système cardio-vasculaire après un traitement systémique au LPS chez le rat

#### 2.3.3.1 Traitement i.v. au LPS

Cette expérience comporte un seul groupe de rats possédant quatre canules: l'artère fémorale (mesure de la PAM et de la FC), l'artère carotide, la veine jugulaire et le ventricule droit. Tous les groupes reçoivent d'abord le véhicule LCR (i.c.v.) ou la saline (i.v. et i.c.). Ensuite, 15 min plus tard, l'agoniste Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK est injecté à 0.65 nmoles/rat (i.c.v.) et 10.25 nmoles/Kg (i.v. et i.c.). Une période de 20 à 30 minutes sépare les injections intravasculaires et i.c.v. L'injection de l'agoniste sera répétée à 12 h et 24 h après l'injection de LPS (100µg/kg i.v.). Les LPS sont dilués dans la saline (100µg/ml) et préparés quelques minutes avant injection entre 09:00h et 10:00h A.M.

#### 2.3.3.2 Traitement i.a. au LPS

Cette expérience comporte un seul groupe de rats possédant trois canules: l'artère fémorale (mesure de la PAM et de la FC), l'artère carotide (i.c.) et l'espace intrathécal (i.t.). Tous les groupes reçoivent d'abord le véhicule LCR (i.t.) ou la saline (i.c.). Ensuite, 15 min plus tard, l'agoniste Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK est injecté à 6.5 nmoles/rat (i.t.) et à 30 nmoles/Kg (i.c.). Une période de 20 à 30 minutes sépare les injections i.c. et i.t. L'injection de l'agoniste sera répétée à 12 h, 24 h et 48 h après l'injection de LPS (100µg/kg i.a.). De plus, le Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK est injecté à 65 nmoles/rat (i.t.) à

24 h et 48 h et à 60 nmoles/Kg à 12 h (i.c.). Les LPS sont dilués dans la saline (100µg/ml) et préparés quelques minutes avant injection entre 09:00h et 10:00h A.M.

### 2.3.4 Effets centraux des kinines sur le système cardio-vasculaire après un traitement central au LPS chez le rat

#### 2.3.4.1 Effets i.c.v. et i.t. du des-Arg<sup>9</sup>-BK après traitement central au LPS

Cette étude comporte deux groupes de rats: groupe 1, injection dans le ventricule droit (i.c.v.); groupe 2, injection i.t. Dans un premier temps, chaque rat reçoit l'injection du véhicule, soit 10 µl de LCR pour les injections i.t. et 1µl de LCR pour les injections i.c.v. Quinze min plus tard, les deux groupes reçoivent une injection de des-Arg<sup>9</sup>-BK 6.5 nmoles/rat (i.t.), 0.65 nmole/rat (i.c.v.). L'injection de l'agoniste est répétée à 6 h, 12 h et 24 h après traitement au LPS (groupe 1: 1µg i.c.v.; groupe 2: 10µg i.t.). Seuls les rats du groupe 1 ont aussi une injection à 48 h après traitement au LPS. Les LPS sont dilués dans le LCR (1mg/1ml) et préparés quelques minutes avant injection entre 09:00h-10:00h A.M.

---

#### 2.3.4.2 Effets i.c.v. de l'agoniste B<sub>1</sub> (Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK) et des agonistes B<sub>2</sub> (BK et Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK) après injection i.c.v. de LPS

Dans cette étude, les paramètres cardio-vasculaires sont enregistrés suite à l'injection i.c.v. des agonistes avant et à 6, 24 et 48 heures après l'injection i.c.v. de LPS (75 µg/rat) dans le ventricule droit. Au jour 1, les effets du véhicule LCR et des agonistes sont mesurés. L'injection des LPS se fait au jour 2 entre 09:00h et 10:00h A.M. Les doses d'agonistes sont de 1.025 nmole/rat pour le Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK, de 0.85 nmole/rat pour le Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK et de 0.94 nmole/rat pour la BK. Ces doses correspondent à 1 µg de chacune de ces substances. Ces injections sont réalisées sur les mêmes rats à intervalles de 30 minutes et l'ordre d'injection est différent pour chaque rat de façon à éviter les interactions possibles entre les agonistes. Chez un autre groupe de rats témoins où il n'y a pas de traitement au LPS, les effets de la BK et du Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK sont aussi mesurés en suivant le même protocole.

#### 2.3.5 Effet i.c.v. de l'agoniste Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK en présence d'atropine

L'enregistrement des effets cardio-vasculaires contrôles suite à l'injection i.c.v. du véhicule (LCR) et de l'agoniste Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK (0.85 nmole i.c.v.) a lieu la première journée. La deuxième journée, l'atropine (1mg/Kg) est injectée via l'artère fémorale, puis l'injection i.c.v. de l'agoniste Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK est effectuée 15-20 min après.

### 2.3.6 Effets i.c.v. de la SP sur la réponse comportementale et les paramètres cardio-vasculaires suite à un traitement i.c.v. au LPS

Lorsqu'injectée i.c.v., la SP provoque une augmentation de la pression sanguine et de la fréquence cardiaque et une réponse comportementale caractéristique (Picard et al., 1994). Cette expérience a pour but d'examiner l'effet de la fièvre induite par l'injection i.c.v. de LPS sur la réponse cardio-vasculaire et comportementale induite par la SP. L'utilisation de cet agoniste appartenant à la classe des tachykinines servira à démontrer si l'effet de la fièvre sur la réponse cardio-vasculaire induite par les kinines est spécifique ou pas. Le protocole est le même que celui qui a été décrit dans la section 2.3.4.2. Toutefois, l'activité comportementale est mesurée sur une période de 30 min à intervalles de 15 sec suivant l'injection i.c.v. de 25 pmoles de SP selon la procédure de Gispen et al. (1975). Pour chaque intervalle consécutif de 15 sec, une valeur de 1 ou 0 est donnée dépendant de la présence (1) ou de l'absence (0) du comportement (nettoyage de la région faciale (Face Washing, (FW)), grattage de la tête avec les pattes postérieures (Head Scratching, (HS)), nettoyage des pattes arrières et du dos (Grooming, (G)), activité exploratrice par l'odorat (Sniffing, (S)), remuage de la litière (Digging, (D)) et secousses corporelles (Wet Dog Shake, (WDS)). L'intensité, la durée et la fréquence de chaque comportement durant l'intervalle de 15 sec ne sont pas considérées. Le pointage théorique maximum est de 120 pour chaque comportement.

---



### 2.3.7 Effets i.c.v. de la SP sur les réponses comportementales et cardio-vasculaires en présence d'indométhacine avant et après traitement au LPS

Cette expérience débute par l'injection i.c.v. du véhicule (LCR) et de 25 pmoles de SP la première journée. Lors de la deuxième journée, l'indométhacine (5mg/Kg) est injectée via l'artère fémorale puis 25 pmoles de SP i.c.v. 1 heure après. Lors de la troisième journée, les LPS sont injectés i.c.v. (75µg/rat) et 5 h après, l'indométhacine est injectée à nouveau (5mg/Kg via l'artère fémorale). La SP (25 pmoles) est injectée 6 h après l'injection de LPS. Enfin, la SP (25 pmoles) est injectée seule la quatrième journée (24 h après LPS).

### 2.3.8 Effets i.c.v. de la SP sur les réponses comportementales et cardio-vasculaires en présence d'indométhacine après traitement au LPS

Dans cette étude, les paramètres cardio-vasculaires sont enregistrés suite à l'injection i.c.v. de la SP (25 pmoles) avant et à 6, 24 et 48 heures après l'injection i.c.v. de LPS (75 µg/rat) dans le ventricule droit. Au jour 1, les effets du véhicule LCR et de la SP (25 pmoles) sont mesurés. L'injection des LPS se fait au jour 2 entre 09:00h et 10:00h A.M. L'indométhacine (5mg/Kg i.a.) est injectée 30 min après l'injection de la SP (25 pmoles) au jour 2 et celle-ci est réadministrée à nouveau 1 h après l'indométhacine. Enfin, la SP est injectée 24 h et 48 h après traitement au LPS.

---

### 2.3.9 Effets i.c.v., i.t. et périphérique des agonistes Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK et des-Arg<sup>9</sup>-BK sur le système cardio-vasculaire du rat diabétique

Notre étude comporte un groupe de rats témoins et un deuxième dont les rats sont traités avec la STZ (65 mg/Kg, i.p.). La STZ est diluée dans un tampon de citrate de sodium (pH 4.5). Les rats du groupe témoin reçoivent uniquement le tampon citrate de sodium (100µl/Kg i.p.). Les expériences sont réalisées de 8 à 11 jours après traitement à la STZ. La glycémie est prise à chaque jour et lorsque les rats traités présentent un glycémie supérieure à 20 mM (Chakir et al., 1995a) généralement après 3 jours, on procède à l'implantation de la canule i.c.v. Puis, 2 jours plus tard, on procède à l'implantation de la canule i.t. sur les mêmes rats. Enfin, quatre jours après l'implantation i.c.v., on installe les canules suivantes: i.c. (carotide), i.v. (jugulaire) et intra- fémorale. Les expériences sont effectuées 24 h plus tard. Précédés par l'injection du véhicule LCR ou saline, les agonistes Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK et des-Arg<sup>9</sup>-BK sont injectés par les quatre premières canules. Si aucun effet est observé, on procède 15 min plus tard à la prochaine injection, sinon on attend que les paramètres cardio-vasculaires retournent à la ligne de base avant la prochaine injection de l'agoniste. Chaque rat recevra deux doses différentes de chaque agoniste: Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK (10.25 nmoles/Kg et 1025 nmoles/Kg) et de des-Arg<sup>9</sup>-BK (10.37 nmoles/Kg et 1037 nmoles/Kg) par voie i.v. et i.c. Une seule dose sera administrée i.t. (6.5 nmoles/10µl) et i.c.v. (0.65 nmole/1µl) pour Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK et des-Arg<sup>9</sup>-BK. Ces injections sont réalisées sur les mêmes rats de façon aléatoire pour exclure les interactions possibles entre les agonistes.

### 2.3.10 Effet cardio-vasculaire de plusieurs doses de des-Arg<sup>9</sup>-BK (0.65 à 65 nmoles/10µl i.t.) après 18 jours de traitement à la STZ

Notre étude comporte un groupe de rats témoins et un deuxième dont les rats sont traités avec la STZ (65 mg/Kg, i.p.). Les rats du groupe témoin reçoivent uniquement le tampon citrate de sodium (100µl/Kg i.p.). Les expériences sont réalisées 18 jours après traitement à la STZ ou au véhicule. La glycémie est mesurée à 15 jours et lorsque les rats traités présentent un glycémie supérieure à 20 mM, on procède à l'implantation de la canule i.t. La canule intra-fémorale est implantée au 17<sup>e</sup> jour. Précédé par l'injection du véhicule LCR ou saline, l'agoniste des-Arg<sup>9</sup>-BK est injecté via la canule i.t. à des doses croissantes (0.65, 3.2, 6.5, 32.5 et 65 nmoles/10µl) séparées par des périodes de 20 min.

### 2.4 Solution, peptides et autres composés

La solution aqueuse de LCR utilisée est constituée de NaCl 128.6 mM, KCl 2.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.4 mM et MgCl<sub>2</sub> 2.0 mM. Le pH du LCR est ajusté à 7.4 avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH 10N) et la solution est conservée à 4°C. Tous les agonistes et antagonistes des kinines utilisés ont été obtenus gracieusement du laboratoire du Dr. D. Regoli de l'université de Sherbrooke. La SP a été achetée chez Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA, USA).

Les LPS (*Escherichia coli* serotype 0127:B8), la STZ (N-[methylnitrosocarbamoyl] D-glucosamine), l'indométhacine, la carragénine

et l'atropine (sulfate) ont été achetés chez Sigma (Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Tous les peptides utilisés dans nos expériences ont été dilués dans le LCR et divisés en aliquots de 1 ml pour les injections intravasculaires (carotide et jugulaire), de 100  $\mu$ l pour les injections i.t. et de 10  $\mu$ l pour les injections i.c.v. dans des tubes Eppendorf et gardés à une température de -20°C. Les LPS et l'atropine ont été dilués dans la saline ou le LCR et injectés immédiatement. La carragénine était préparée 24 h à l'avance dans la saline. La STZ était diluée dans un tampon de citrate de sodium (pH 4.5) à l'abri de la lumière pour utilisation immédiate. L'indométhacine était dissoute premièrement dans le tétraméthylène sulfone (concentration finale étant de 10 %), puis diluée dans le tampon trizma base (0.2M, Sigma).

## *2.6 Analyse statistique*

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les différences statistiques entre les courbes temporelles ont été évaluées par l'analyse de variance ANOVA à deux voies suivi du test de Dunnett. Les différences statistiques dans les réponses comportementales ont été évaluées avec le test associé aux valeurs non-paramétriques de Kruskal-Wallis suivi du test de Wilcoxon Mann-Whitney. Les différences statistiques seront représentées par les symboles \* et + (\* pour les comparaisons avec le véhicule, + pour les comparaisons avec les premières injections des différents agonistes). Les niveaux de signification seront représentés comme suit: \*,+ p < 0.05; \*\*,++ p < 0.01; \*\*\*,+++ p < 0.001.

## **Chapitre III**

### **RÉSULTATS**

---

Ce chapitre est constitué de 9 sections (3.1-3.9). Les 4 premières sections représentent différents résultats obtenus avec des animaux traités avec des agents inflammatoires en périphérie. Ainsi, la section 3.1 est consacrée au traitement à la carragénine et les autres sections au traitement avec les LPS injectés i.a. (3.2 et 3.4) et i.v. (3.3).

### 3.1 Effets cardio-vasculaires central et périphérique du des-Arg<sup>9</sup>-BK après un traitement à la carragénine

Le **tableau III** résume les changements maximaux de la PAM et de la FC suite à l'administration de l'agoniste du récepteur B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-BK, chez trois groupes de rats; groupe 1; 6.5 nmoles/150 µl i.c.; groupe 2: 6.5 nmoles/10 µl i.t.; groupe 3: 6.5 nmoles/150 µl i.v. Dans les groupes 1 et 3, l'effet est enregistré avant et à 3, 6, 12 h après l'injection intraplantaire de 50µl de carragénine (1%) dans les deux pattes postérieures. Pour le groupe 2, le protocole implique un enregistrement de plus à 24 h après l'injection de carragénine. Dans ce tableau, on observe aussi les changements maximaux suite à l'injection des véhicules (saline et LCR) et les valeurs de base de la PAM et de la FC avant et après l'injection de la carragénine. La des-Arg<sup>9</sup>-BK n'a produit aucun effet cardio-vasculaire significatif par rapport au véhicule quel que soit le site d'injection avant et après (3-24h) le traitement à la carragénine. De plus, la carragénine n'a pas modifié les valeurs basales de PAM et de FC, 3h (**tableau III**) et 24 h après le traitement (résultats non montré).

**Tableau III** : Changements maximaux de la pression artérielle moyenne (PAM) et de la fréquence cardiaque (FC) induits par l'injection de 6.5 nmoles de des-Arg<sup>9</sup>-BK à différents sites après un traitement à la carragénine (1% intraplantaire) chez le rat éveillé.

Site d'injection des-Arg <sup>9</sup> -BK	influence de la carragénine				Effet du des-Arg <sup>9</sup> -BK											
	avant		3h après		LCR ou Saline				avant carragénine							
	PAM	FC	PAM	FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	3 h	6 h	12 h	24 h				
Groupe 1 intra-carotide (6.5nmoles/ 150 µl)	120±9 (n=6)	367±17 (n=6)	119±10 (n=6)	380±11 (n=6)	1±1 (n=6)	-8±3 (n=6)	2±1 (n=6)	-8±5 (n=6)	-5±3 (n=6)	-13±10 (n=5)	-20±20 (n=5)	-5±4 (n=5)	-24±17 (n=5)			
Groupe 2 intra-thécal (6.5nmoles/ 10 µl)	99±4 (n=7)	386±6 (n=7)	100±5 (n=6)	392±11 (n=6)	2±1 (n=7)	-10±4 (n=7)	5±2 (n=7)	-12±11 (n=7)	4±2 (n=6)	-22±8 (n=6)	7±6 (n=6)	11±6 (n=6)	6±5 (n=5)	-10±5 (n=5)	5±2 (n=5)	-30±8 (n=5)
Groupe 3 intra-jugulaire (6.5nmoles/ 150 µl)	109±12 (n=4)	415±21 (n=4)	112±13 (n=4)	397±13 (n=4)	-3±2 (n=4)	-4±2 (n=4)	3±3 (n=4)	12±11 (n=4)	1±1 (n=4)	-7±5 (n=4)	5±4 (n=4)	-25±11 (n=4)	-3±3 (n=4)	7±15 (n=4)		

Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les changements (Δ) mesurés de PAM (mmHg) et de FC (battements/min) expriment les changements maximaux observés sur un période d'enregistrement de 15 minutes. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR ou saline) ont été évaluées avec le test de Dunnett. Aucune différence statistique significative n'a été trouvée entre les valeurs du des-Arg<sup>9</sup>-BK et du véhicule pour les 3 sites d'injection.

### 3.2 Effets cardio-vasculaires central et périphérique du des-Arg<sup>9</sup>-BK après traitement i.a. au LPS

**Le tableau IV** résume les changements maximaux sur la PAM et la FC induits par l'administration de l'agoniste B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-BK, chez trois groupes de rats éveillés: groupe 1; 6.5 nmoles/10µl i.t. et 65 nmoles/150µl i.c.; groupe 2: 65 nmoles/150 µl i.j.; groupe 3: 0.65 nmole/1µl i.c.v. Dans le groupe 1, l'effet est enregistré avant et à 12 et 24 heures après l'injection de LPS (100 µg/Kg) via l'artère fémorale. Pour les groupes 2 et 3, le protocole implique un enregistrement de plus à 48 h après l'injection de LPS. Dans ce tableau, on observe aussi les changements maximaux suite à l'injection des véhicules (saline et LCR) et les valeurs de base de la PAM et de la FC avant et après l'injection de LPS.

La des-Arg<sup>9</sup>-BK injectée par la voie i.t. provoque une diminution significative de la FC de  $-34 \pm 9$  battements/min ( $P < 0.05$ ,  $n=4$ ) 24 h après l'injection de LPS. En revanche, la des-Arg<sup>9</sup>-BK n'a produit aucun effet cardio-vasculaire significatif après administration intra-vasculaire ou i.c.v. avant ou après traitement au LPS. De plus, le traitement au LPS n'a pas altéré les valeurs basales de PAM et de FC de 3-48h (voir valeurs à 12 h post-traitement dans le **tableau IV**).

---



**Tableau IV :** Changements maximaux de la pression artérielle moyenne (PAM) et de la fréquence cardiaque (FC) induits par l'injection de des-Arg<sup>9</sup>-BK à différents sites après un traitement au Lipopolysaccharide (LPS) (100µg/Kg i.a) chez le rat éveillé.

Site d'injection des-Arg <sup>9</sup> -BK	influence du LPS				Effet du des-Arg <sup>9</sup> BK							
	avant		12 h après		LCR ou Saline				avant LPS			
	PAM	FC	PAM	FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	12 h	24 h	48 h	
<u>Groupe 1</u> intra-carotide (65nmoles/ 150 µl)	112±9 (n=4)	380±25 (n=4)	102±9 (n=4)	442±18 (n=4)	-2±2 (n=4)	-5±9 (n=4)	2±1 (n=4)	5±5 (n=4)	2±1 (n=4)	10±6 (n=4)	1±1 (n=4)	7±12 (n=4)
Intrathécal (6.5nmoles/ 10 µl)	113±8 (n=4)	390±22 (n=4)	106±7 (n=4)	440±12 (n=4)	2±3 (n=4)	-8±5 (n=4)	4±2 (n=4)	-20±21 (n=4)	3±2 (n=4)	6±6 (n=4)	6±2 (n=4)	-34±9* (n=4)
<u>Groupe 2</u> intra-jugulaire (65nmoles/ 150 µl)	107±2 (n=7)	350±21 (n=7)	110±5 (n=3)	420±30 (n=3)	2±1 (n=6)	6±7 (n=6)	2±1 (n=7)	-9±5 (n=7)	3±1 (n=3)	3±3 (n=3)	-4±1 (n=3)	-7±3 (n=3)
<u>Groupe 3</u> intra-cerebral (0.65nmoles/1 µl)	108±3 (n=6)	N.D. (n=6)	108±5 (n=6)	N.D. (n=6)	2±1 (n=6)	N.D. (n=6)	1±1 (n=6)	N.D. (n=6)	3±2 (n=6)	N.D. (n=6)	-3±2 (n=6)	N.D. (n=6)
												-2±2 (n=3)

Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les changements (Δ) mesurés de PAM (mmHg) et de FC (battements/min) expriment les changements maximaux observés sur un période d'enregistrement de 15 minutes. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR ou saline) ont été évaluées avec le test de Dunnett. Les différences statistiques significatives sont indiquées par \* $P < 0.05$ . N.D. Non déterminé à cause d'un problème technique.

Dans cette section, nous avons voulu vérifier que l'absence de réponse cardio-vasculaire ne dépendait pas de la dégradation rapide de la des-Arg<sup>9</sup>-BK. Pour ce faire, nous avons testé l'effet d'un agoniste stable et plus résistant au métabolisme.

### 3.3 Effets cardio-vasculaires central et périphérique du Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK après traitement i.v. au LPS

**Le tableau V** résume les changements maximaux sur la PAM et la FC induits par l'administration de l'agoniste B<sub>1</sub>, Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK, chez un groupe de rats éveillés ayant reçu: 0.65 nmole/1µl i.c.v., 10.25 nmoles/Kg i.c. et i.v. Les effets sont enregistrés avant et à 12 et 24 heures après l'injection de LPS (100 µg/Kg) via la veine jugulaire. Dans ce tableau, on observe aussi les changements maximaux suite à l'injection des véhicules (saline et LCR) et les valeurs de base de la PAM et de la FC avant et après l'injection de LPS. Les résultats montrent que le Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK n'affecte pas les paramètres cardio-vasculaires lorsqu'injecté par voie i.c.v. ou intra-vasculaire avant et après traitement au LPS. De plus, le traitement au LPS n'a pas modifié les valeurs basales de PAM et de FC.

---

**Tableau V :** Changements maximaux de la pression artérielle moyenne (PAM) et de la fréquence cardiaque (FC) induits par l'injection de Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK à différents sites après traitement au Lipopolysaccharide (LPS) (100 µg/Kg i.v.) chez le rat éveillé.

Site d'injection Sar[D-Phe <sup>8</sup> ] des-Arg <sup>9</sup> -BK	influence du LPS				Effet du Sar[D-Phe <sup>8</sup> ] des-Arg <sup>9</sup> -BK							
	avant		12h après		LCR ou Saline		avant LPS		12 h		24 h	
	PAM	FC	PAM	FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
Intra-carotide (10.25mmoles /Kg)	111±7 (n=5)	390±17 (n=5)	106±4 (n=5)	418±15 (n=5)	5±1 (n=5)	20±9 (n=5)	5±4 (n=5)	10±4 (n=5)	-4±2 (n=5)	-20±7 (n=5)	6±7 (n=4)	-12±12 (n=4)
Intra-jugulaire (10.25mmoles /Kg)	111±8 (n=5)	398±15 (n=5)	102±7 (n=5)	418±18 (n=5)	1±3 (n=5)	8±6 (n=5)	4±1 (n=5)	-16±7 (n=5)	4±2 (n=5)	-14±6 (n=5)	6±4 (n=4)	27±14 (n=4)
Intra-cérébral (0.65mmoles/1ul)	108±9 (n=5)	360±10 (n=5)	104±2 (n=5)	422±17 (n=5)	3±3 (n=5)	16±7 (n=5)	3±2 (n=5)	16±12 (n=5)	1±1 (n=5)	-8±4 (n=5)	2±2 (n=4)	17±14 (n=4)

Voir légende du tableau IV.

**Le tableau VI** résume les changements maximaux sur la PAM et la FC induits par l'administration de l'agoniste B<sub>1</sub>, Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK, chez un groupe de rats éveillés ayant reçu: 6.5 nmoles/10 µl i.t. et 30 nmoles/Kg i.c. Les effets sont enregistrés avant et à 12h, 24h et 48 h après l'injection de LPS (100 µg/Kg) via l'artère fémorale. Pour l'injection i.t., une dose (65 nmoles/10 µl) supplémentaire est faite à 24 et 48 h après traitement au LPS. Pour l'injection i.c., une dose (60 nmoles/Kg) supplémentaire est faite à 12 h après traitement au LPS. Dans ce tableau, on observe aussi les changements maximaux suite à l'injection des véhicules (saline et LCR) et les valeurs de base de la PAM et de la FC avant et après l'injection de LPS. Les résultats indiquent que le Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK ne modifie pas la PAM et la FC quelque soit la dose et son site d'injection avant et après traitement i.a. au LPS, lequel est aussi sans effet sur les paramètres cardio-vasculaires.

---

**Tableau VI :** Changements maximaux de la pression artérielle moyenne (PAM) et de la fréquence cardiaque (FC) induits par l'injection de Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK à différents sites après traitement au Lipopolysaccharide (LPS) (100 µg/Kg i.a.) chez le rat éveillé.

Site d'injection Sar[D-Phe <sup>8</sup> ] des- Arg <sup>9</sup> -BK	Influence du LPS				Effet du Sar[D-Phe <sup>8</sup> ] des-Arg <sup>9</sup> -BK									
	avant		12h après		LCR ou Saline		avant LPS		12 h		24 h		48 h	
	PAM	FC	PAM	FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	DFC
Intra-carotide (30 nmoles/ Kg)	114±5	406±12	95±3	442±6	-2±1	-8±6	-2±1	-10±4	5±3	17±6	5±2	-17±14	3±4	7±7
(60 nmoles/ Kg)	(n=5)	(n=5)	(n=3)	(n=3)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	-5±3	10±4	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
Intrathécal (6.5 nmoles/ 10 µl)	111±6	396±9	96±6	452±9	1±1	-6±4	1±1	6±4	2±2	-17±9	3±2	-27±9	-2±2	10±6
(65 nmoles/ 10 µl)	(n=5)	(n=5)	(n=3)	(n=3)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=4)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)

Voir légende du tableau IV.

La section suivante est réservée aux traitements centraux avec les LPS. Dans la sous section 3.5.1, les réponses cardio-vasculaires à l'agoniste B<sub>1</sub> ont été mesurées à différents temps après un traitement i.c.v. et i.t. au LPS.

### 3.5 Effets centraux des kinines sur le système cardio-vasculaire après un traitement central au LPS chez le rat

#### 3.5.1 Effets i.c.v. et i.t. du des-Arg<sup>9</sup>-BK après traitement au LPS

**Le tableau VII** résume les changements maximaux sur la PAM et la FC induits par l'administration de l'agoniste B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-BK, chez deux groupes de rats éveillés: groupe 1; 0.65 nmole/1 µl i.c.v.; groupe 2: 6.5 nmoles/10 µl i.t.. Dans le groupe 1, l'effet est enregistré avant et à 6, 12, 24 et 48 h après l'injection de LPS (1 µg/1 µl i.c.v.). Pour le groupe 2, le protocole implique un enregistrement avant et à 6, 12 et 24 h après l'injection de LPS (10 µg/10 µl i.t.). Dans ce tableau, on observe aussi les changements maximaux suite à l'injection du véhicule (LCR) et les valeurs de base de la PAM et de la FC avant et après l'injection de LPS. Les résultats indiquent qu'aucun effet cardio-vasculaire significatif n'est induit par l'injection i.t. ou i.c.v. du des-Arg<sup>9</sup>-BK avant et après traitement central au LPS, lequel est aussi sans effet sur les valeurs de base de PAM et de FC.

---

**Tableau VII :** Changements maximaux de la pression artérielle moyenne (PAM) et de la fréquence cardiaque (FC) induits par l'injection de des-Arg<sup>9</sup>-BK à différents sites après traitement au Lipopolysaccharide (LPS) (10 µg i.t. ou 1µg i.c.v.) chez le rat éveillé.

Site	influence LPS				Effet du des-Arg <sup>9</sup> BK											
	avant		6h après		LCR		avant LPS		6 h		12 h		24 h		48 h	
injection des-Arg <sup>9</sup> -BK	PAM	FC	PAM	FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
<u>Groupe 1</u> intra-cérébral (0.65 nmole/ 1 µl)	104±4 (n=10)	401±12 (n=10)	104±5 (n=8)	412±20 (n=8)	-1±1 (n=10)	4±4 (n=10)	-1±2 (n=9)	9±3 (n=9)	3±1 (n=8)	-11±5 (n=7)	3±2 (n=7)	-6±7 (n=7)	3±2 (n=4)	6±5 (n=4)	4±1 (n=4)	19±12 (n=4)
<u>Groupe 2</u> intrathécal (6.5 nmoles/ 10 µl)	98±7 (n=4)	392±22 (n=4)	101±11 (n=4)	383±12 (n=4)	3±2 (n=4)	10±8 (n=4)	3±1 (n=4)	-40±18 (n=4)	3±1 (n=4)	-10±6 (n=4)	-5±2 (n=3)	-10±6 (n=3)	-5±2 (n=3)	-7±7 (n=3)	-	-

Voir légende du tableau IV.

Dans la sous section 3.5.2, nous avons laissé de côté le traitement i.t. et utilisé à nouveau le traitement i.c.v. au LPS avec une dose plus forte. Ce protocole comporte plusieurs injections d'agonistes B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> échelonnées sur quatre jours. Par conséquent, nous avons d'abord performé le protocole en l'absence de LPS pour vérifier l'éventualité d'une désensibilisation des récepteurs B<sub>2</sub>. Ces études ont aussi été menées avec l'utilisation de l'agoniste B<sub>2</sub> stable, Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK, afin de déterminer la participation du métabolisme dans les effets centraux de BK.

### 3.5.2 Effets cardio-vasculaires centraux du Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK, de la BK et du Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK après injection i.c.v. de LPS

**La figure 7** montre que le Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK ne provoque pas de changements significatifs sur la PAM et la FC à une dose de 1.025 nmole/1 µl i.c.v. avant et à 6, 24 et 48 h après l'injection de LPS (75 µg i.c.v.).

**La figure 8** montre que l'administration i.c.v. de BK (0.94 nmole/1 µl i.c.v. provoque une augmentation significative de pression artérielle moyenne à 2 min au jour 1, entre 1 et 5 min au jour 2, entre 1 et 3 min au jour 3 et entre 1 et 2 min au jour 4. Ainsi, la réponse pressive au jour 2 est plus prolongée et aucune désensibilisation de cette réponse n'est observée lorsque le peptide est administré à intervalles de 24 h.

---



**Figure 7**

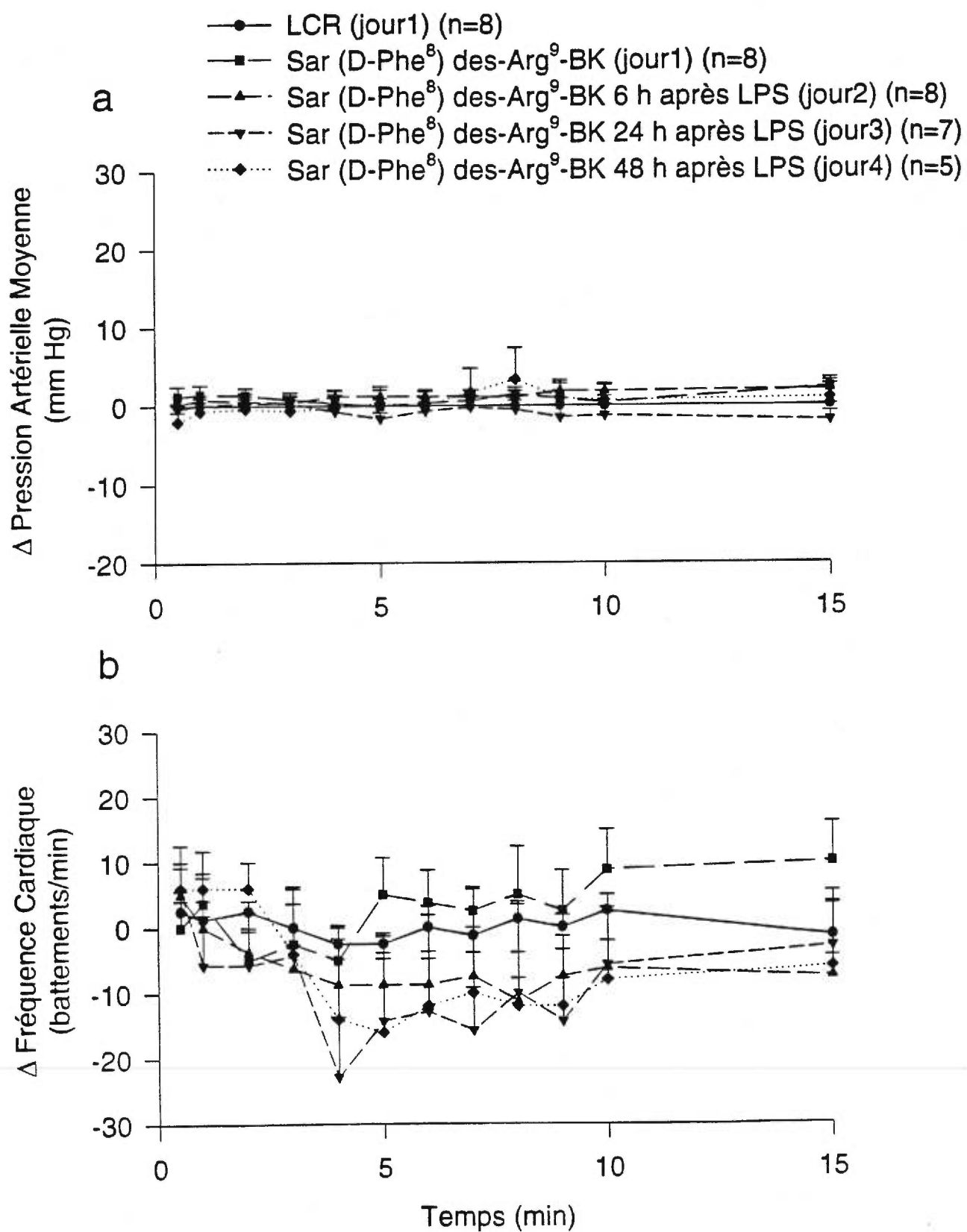
Courbes temporelles montrant l'absence d'effet cardio-vasculaire de l'agoniste B<sub>1</sub>, Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK, (1.025 nmole/1 µl i.c.v.) avant et à 6, 24 et 48 h après l'injection de LPS (75 µg i.c.v.).

En ordonnée:       (a)    Δ Pression Artérielle Moyenne (mmHg)  
                         (b)    Δ Fréquence Cardiaque (battements/min)

En abscisse:                Temps (min)

Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) ont été évaluées avec l'ANOVA à deux voies. Aucune différence statistique n'a été observée entre les courbes.

---



**Figure 8**

Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire de quatre injections de BK (0.94 nmole/1  $\mu$ l i.c.v.) administrées à intervalles de 24 h.

En ordonnée:       (a)  $\Delta$  Pression Artérielle Moyenne (mmHg)  
                         (b)  $\Delta$  Fréquence Cardiaque (battements/min)

En abscisse:               Temps (min)

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) ont été évaluées avec l'ANOVA à deux voies suivi du test de Dunnett.

Les calculs statistiques donnent les résultats suivants:

-Comparaisons de la BK avec le véhicule

(PAM)BK (jour 1) 2 min,  $p < 0.01$

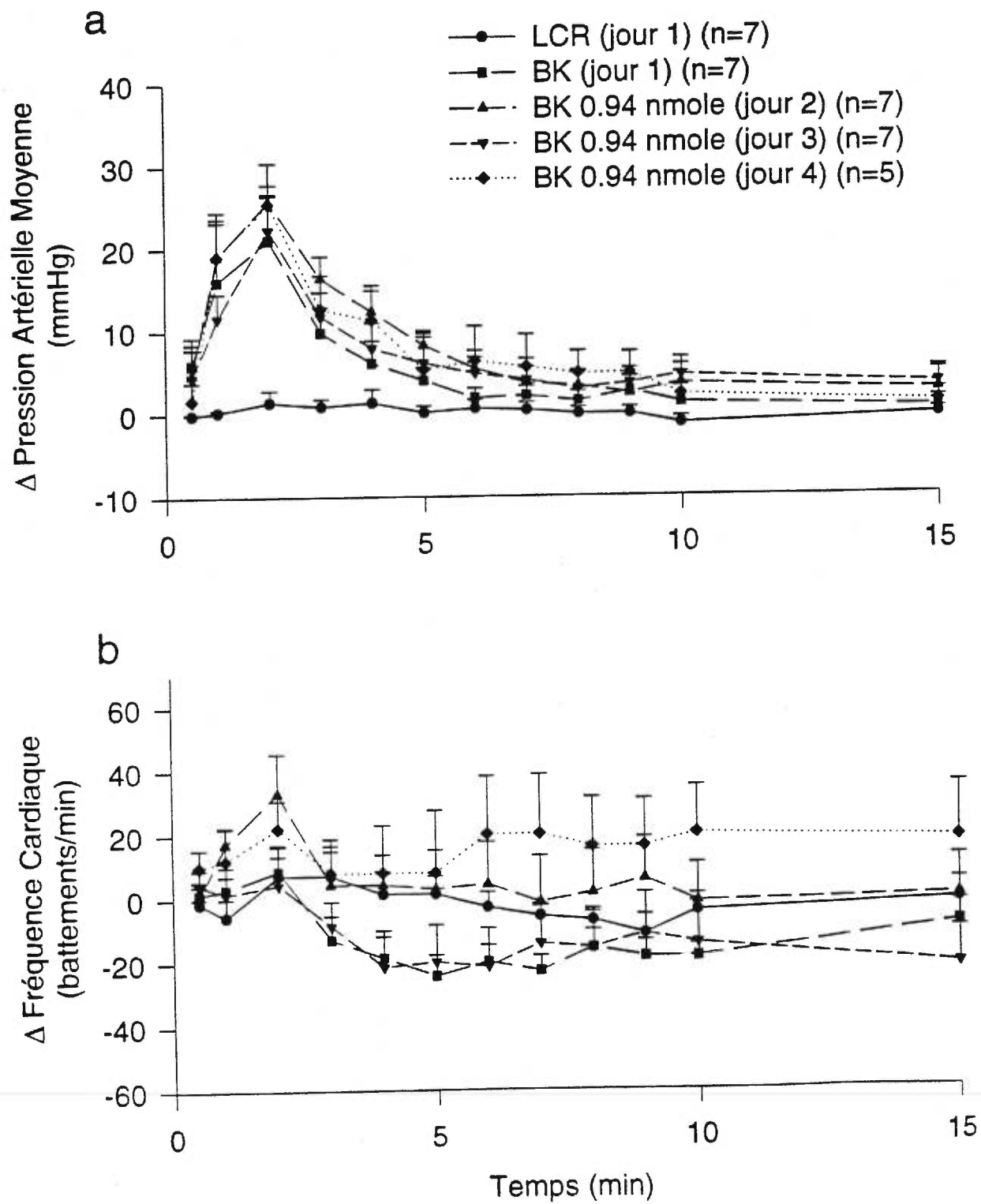
          BK (jour 2) 1-5 min,  $p < 0.05$

          BK (jour 3) 1-3 min,  $p < 0.05$

          BK (jour 4) 1-2 min,  $p < 0.05$

(FC) Les changements ne sont pas significatifs

---



Au jour 1, l'administration i.c.v. de BK (0.94 nmole) provoque une augmentation significative de pression artérielle moyenne entre 1 et 5 min, mais n'induit pas de changement significatif de la FC (**figure 9**). Au jour 2, l'effet presseur de la BK est absent, 6 h après l'injection de LPS (75 ug i.c.v.), alors qu'une bradycardie apparaît 4-10 min après l'injection de BK. Au jour 3, 24 h après traitement au LPS, 5 rats sur 10 retrouvent une réponse pressive à la BK qui est similaire aux valeurs contrôles et 6 rats sur 8 au jour 4. Ces effets sont significatifs de 1 à 10 min et de 1 à 7 min, respectivement. Ainsi, l'effet presseur de la BK mesuré 24 h et 48 h après les LPS est de plus longue durée que celui mesuré avant le traitement au LPS.

Au jour 1, l'administration i.c.v. du Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK (0.85 nmole) induit une augmentation significative de pression artérielle moyenne entre 2 et 6 min et, contrairement à son homologue non résistant au métabolisme BK (**figure 8**), une bradycardie significative entre 5 et 30 min (**figure 10**). L'effet presseur de cet agoniste résistant au métabolisme ne se désensibilise pas à la deuxième, troisième et quatrième journée d'injection avec des valeurs significatives entre 1 à 9 min, 2 à 10 min et 1 à 5 min. Au contraire, l'effet presseur du Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK mesuré à 24 h (jour 2) et 48 h (jour 3) est de plus longue durée que celle de la première injection. Toutefois, la diminution significative de la FC obtenue lors de la première injection n'est pas observée lors des trois jours subséquents, suggérant une désensibilisation de ce paramètre.

---

### Figure 9

Courbes temporelles montrant l'effet de la BK (0.94 nmole/1  $\mu$ l i.c.v.) sur la PAM et la FC avant et à 6, 24 et 48 h après l'injection de lipopolysaccharides (LPS) (75  $\mu$ g i.c.v.).

En ordonnée:       (a)  $\Delta$  Pression Artérielle Moyenne (mmHg)  
                              (b)  $\Delta$  Fréquence Cardiaque (battements/min)  
 En abscisse:               Temps (min)

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) et à la BK avant l'injection de LPS ont été évaluées d'abord avec l'ANOVA à deux voies puis avec le test de Dunnett.

Les calculs statistiques donnent les résultats suivants:

-Comparaisons de la BK avec le véhicule

(PAM)BK (jour 1) 1-5 min,  $p < 0.05$

BK (jour 2) non significatif

BK (jour 3) 1-10 min,  $p < 0.05$

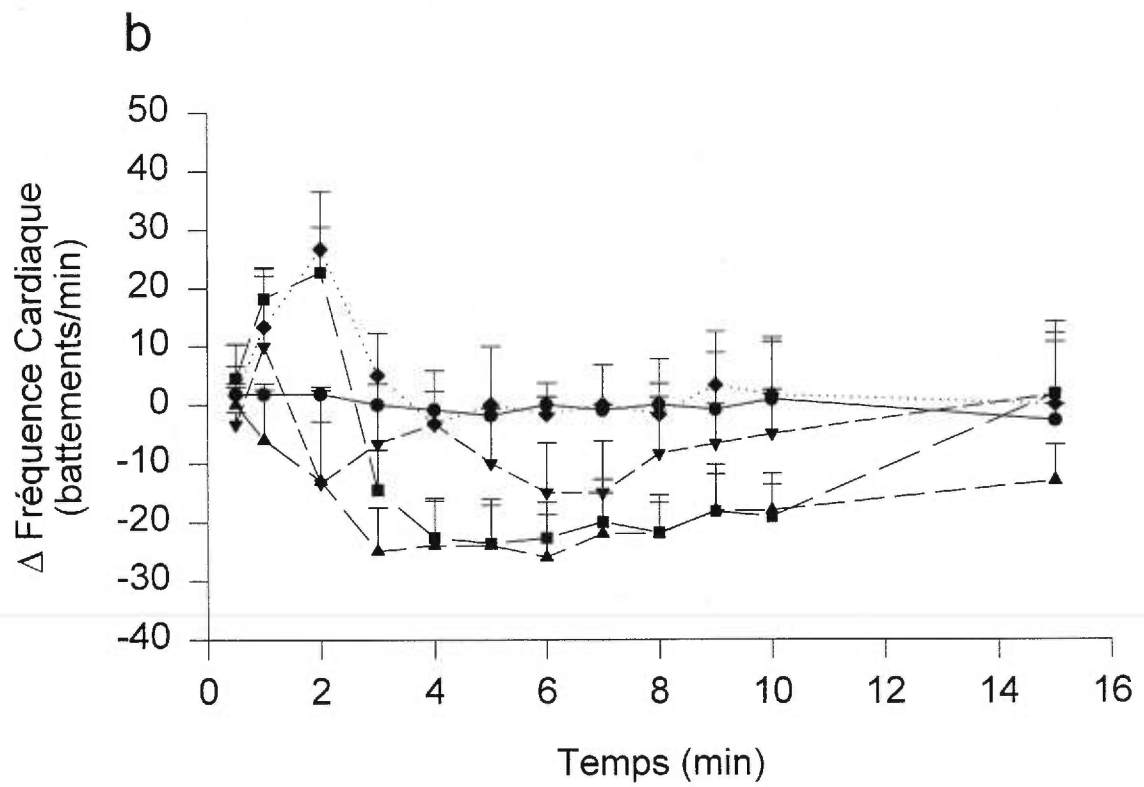
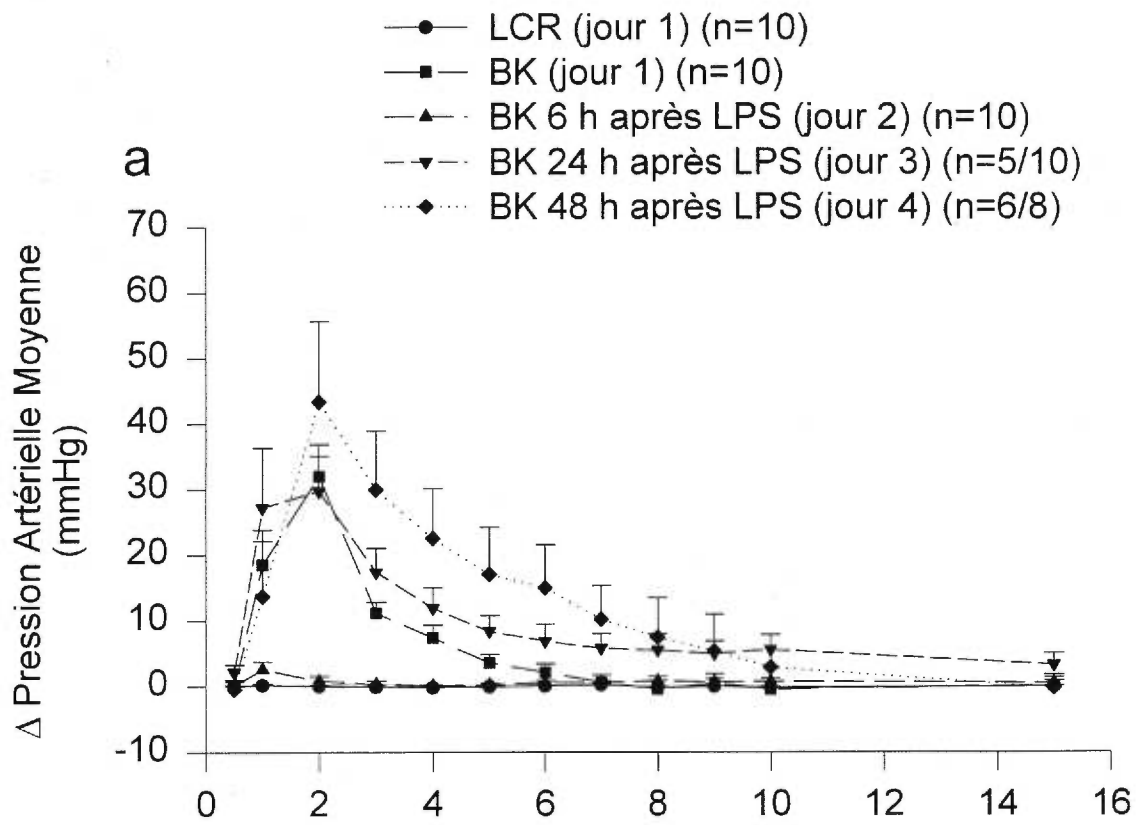
BK (jour 4) 1-7 min,  $p < 0.05$

(FC) BK (jour 2) 4-10 min,  $p < 0.05$

-Comparaisons avec la BK (jour1)

(PAM) BK (jour 2) 1-5 min,  $p < 0.05$

BK (jour 4) à 3 min,  $p < 0.01$  et à 5,7 et 10 min,  $p < 0.05$



### Figure 10

Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire de quatre injections du Phe<sup>8</sup>  $\psi$  (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK (0.85 nmole/1  $\mu$ l i.c.v.) administrées à intervalles de 24 h.

En ordonnée: (a)  $\Delta$  Pression Artérielle Moyenne (mmHg)  
 (b)  $\Delta$  Fréquence Cardiaque (battements/min)  
 En abscisse: Temps (min)

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) ont été évaluées d'abord avec l'ANOVA à deux voies puis avec le test de Dunnett.

Les calculs statistiques donnent les résultats suivants:

Comparaisons du Phe<sup>8</sup>  $\psi$  (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK avec le véhicule

(PAM)(jour 1) 2-6 min,  $p < 0.05$

(jour 2) 1-9 min,  $p < 0.01$

(jour 3) 2-10 min,  $p < 0.01$

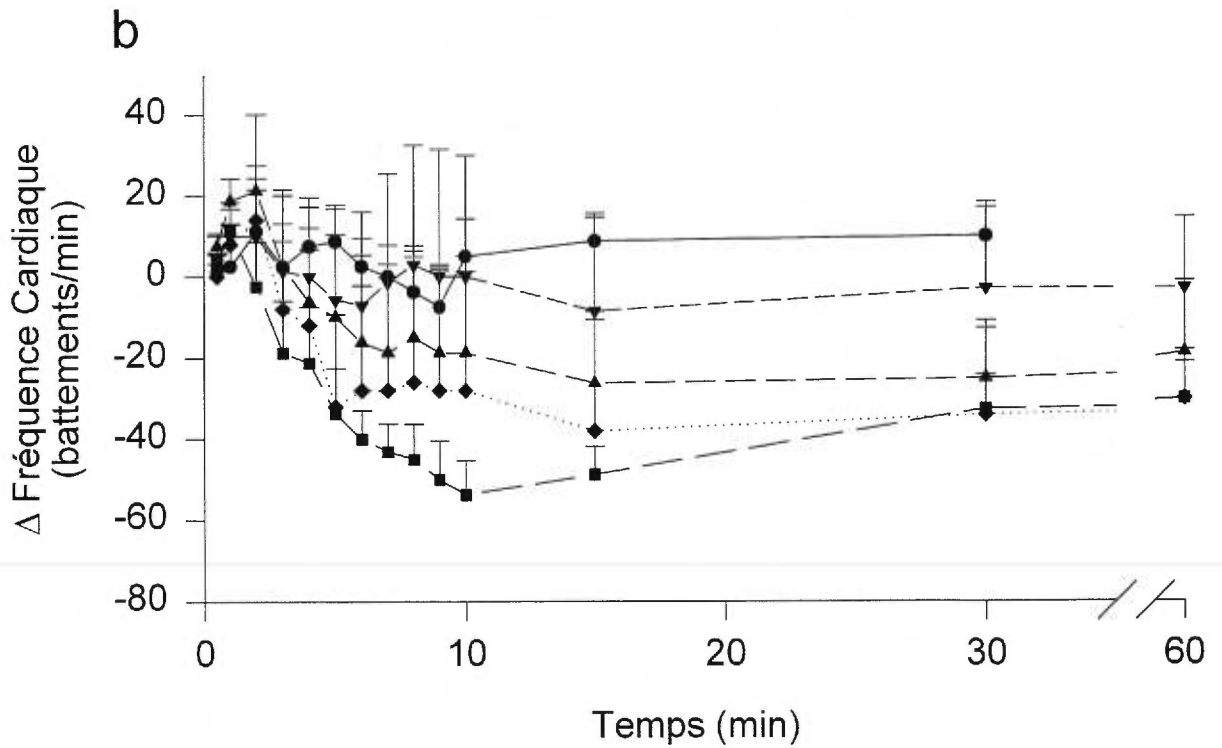
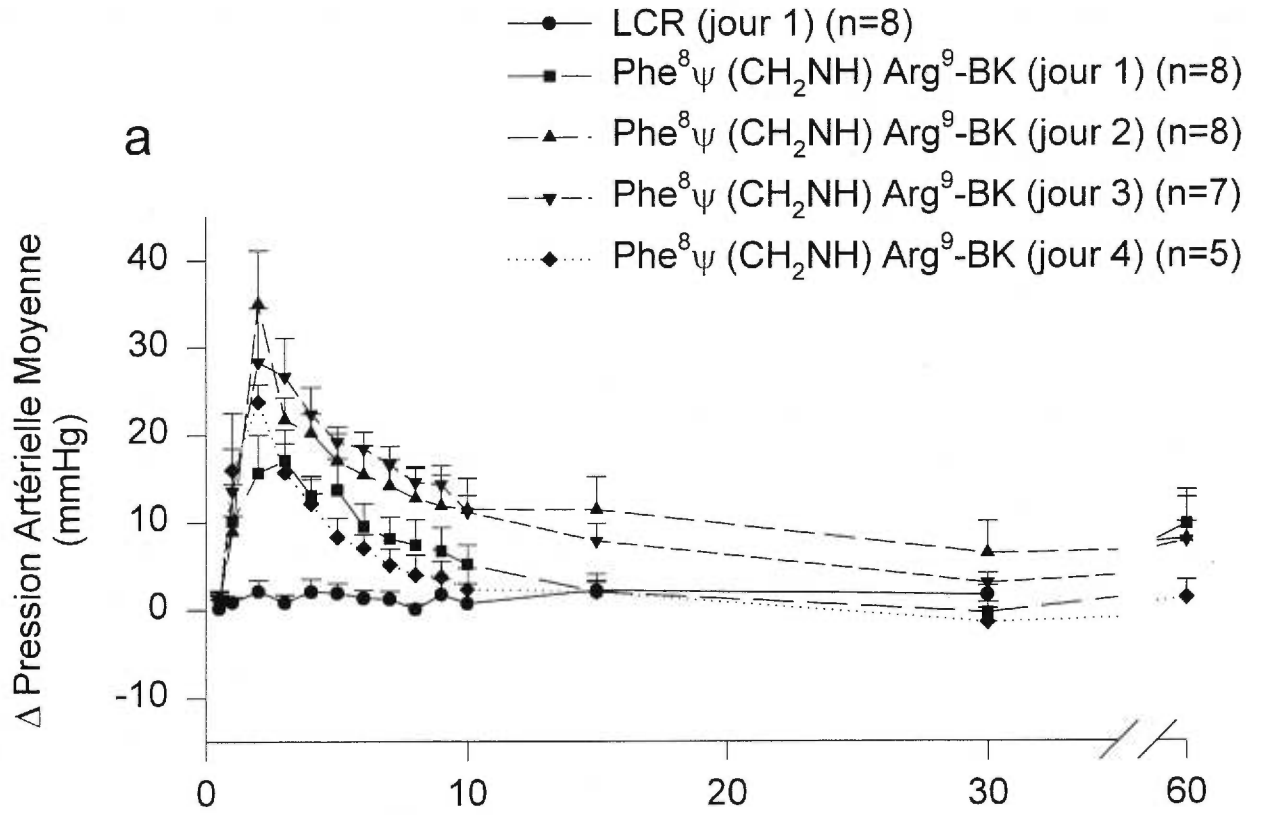
(jour 4) 1-5 min,  $p < 0.05$

(FC) (jour 1) 5-30 min,  $p < 0.05$

Comparaisons avec le Phe<sup>8</sup>  $\psi$  (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK (jour 1)

(PAM) (jour 3) 6 min,  $p < 0.05$





Au jour 1, l'administration i.c.v. du Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK (0.85 nmole) provoque une augmentation significative de PAM entre 1 et 10 min et induit une diminution significative de la FC entre 8 et 30 min (**figure 11**). Au jour 2, le Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK n'induit plus d'effet presseur, 6 h après l'injection de LPS (75 µg i.c.v.), bien que la bradycardie soit toujours présente entre 5-30 min après l'injection du Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK. La réponse pressive du Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK retourne aux valeurs contrôles à 24 et 48 h après traitement au LPS et ces effets sont significatifs entre 0.5 et 15 min et entre 2 et 9 min, respectivement. Contrairement aux rats témoins, la bradycardie n'est pas affectée à 24 h et 48 h après le traitement au LPS et demeure semblable à celle observée lors de la première injection (jour 1).

Puisque l'agoniste Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK est utilisé pour la première fois dans le SNC et qu'une bradycardie observée avec cet agoniste n'a pas été reproduite avec la BK, nous avons vérifié l'implication du système nerveux parasympathique (nerf vague) dans cette dernière réponse en bloquant les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine avec l'atropine.

### 3.5.3 Effet de l'agoniste Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK en présence d'atropine

Au jour 1, l'administration i.c.v. du Phe<sup>8</sup> ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK (0.85 nmole) provoque une augmentation significative de pression artérielle moyenne entre 1 et 9 min et induit un changement biphasique significatif de la FC de 1 à 2 min (tachycardie) et de 8 à 15 min (bradycardie) (**figure 12**).

### Figure 11

Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire du Phe<sup>8</sup>  $\psi$  (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK (0.85 nmole/1  $\mu$ l i.c.v.) avant et à 6, 24 et 48 h après l'injection de LPS (75  $\mu$ g i.c.v.).

En ordonnée:       (a)     $\Delta$  Pression Artérielle Moyenne (mmHg)  
                              (b)     $\Delta$  Fréquence Cardiaque (battements/min)  
 En abscisse:                Temps (min)

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) et au Phe<sup>8</sup>  $\psi$  (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK avant l'injection de LPS ont été évaluées d'abord avec l'ANOVA à deux voies puis avec le test de Dunnett. Les calculs statistiques donnent les résultats suivants:

Comparaisons du Phe<sup>8</sup>  $\psi$  (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK avec le véhicule

(PAM) (jour 1) 1-10 min, p < 0.05

(jour 2) non significatif

(jour 3) 0.5-15 min, p < 0.05

(jour 4) 2-9 min, p < 0.05

(FC) (jour 1) 8-30 min, p < 0.05

(jour 2) 5-30 min, p < 0.01

(jour 3) 9-30 min, p < 0.05

(jour 4) 6-30 min, p < 0.05

Comparaisons avec le Phe<sup>8</sup>  $\psi$  (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK (jour 1)

(PAM) (jour 2) 2-15 min, p < 0.05

- LCR (jour 1) (n=10)
- Phe<sup>8</sup>ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK (jour 1) (n=10)
- ▲— Phe<sup>8</sup>ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK 6 h après LPS (jour 2) (n=10)
- ▼— Phe<sup>8</sup>ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK 24 h après LPS (jour 3) (n=8)
- ◆— Phe<sup>8</sup>ψ (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK 48 h après LPS (jour 4) (n=6)

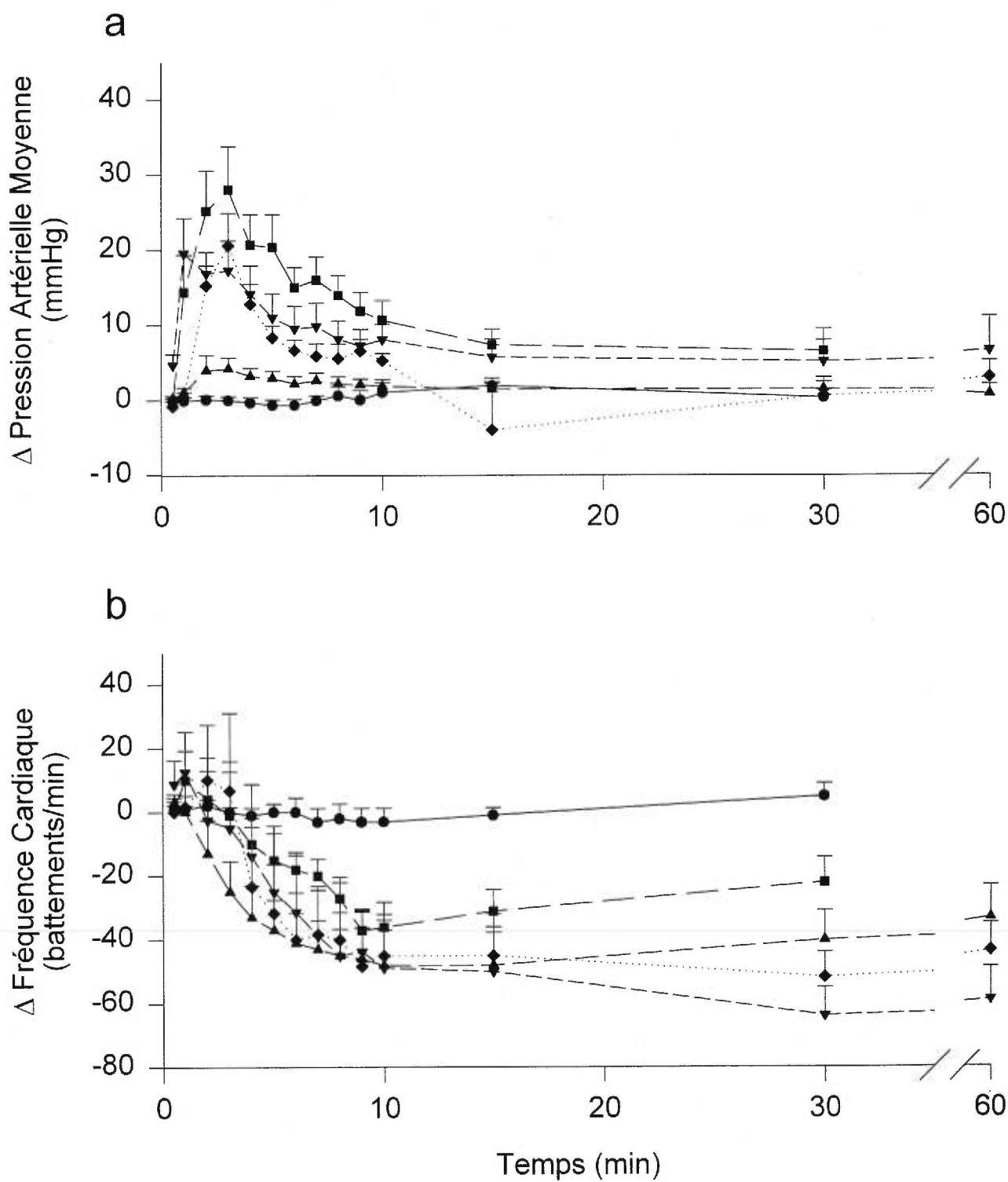


Figure 12

Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire du Phe<sup>8</sup>  $\psi$  (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK (0.85 nmole/1 $\mu$ l i.c.v.) avant et après l'injection d'atropine (1 mg/Kg i.a.).

En ordonnée: (a)  $\Delta$  Pression Artérielle Moyenne (mmHg)  
 (b)  $\Delta$  Fréquence Cardiaque (battements/min)  
 En abscisse: Temps (min)

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) et le Phe<sup>8</sup>  $\psi$  (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK avant l'injection d'atropine ont été évaluées d'abord avec l'ANOVA à deux voies puis avec le test de Dunnett. Les calculs statistiques donnent les résultats suivants:

Comparaisons du Phe<sup>8</sup>  $\psi$  (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK avec le véhicule

(PAM) (jour 1) 1-9 min,  $p < 0.01$

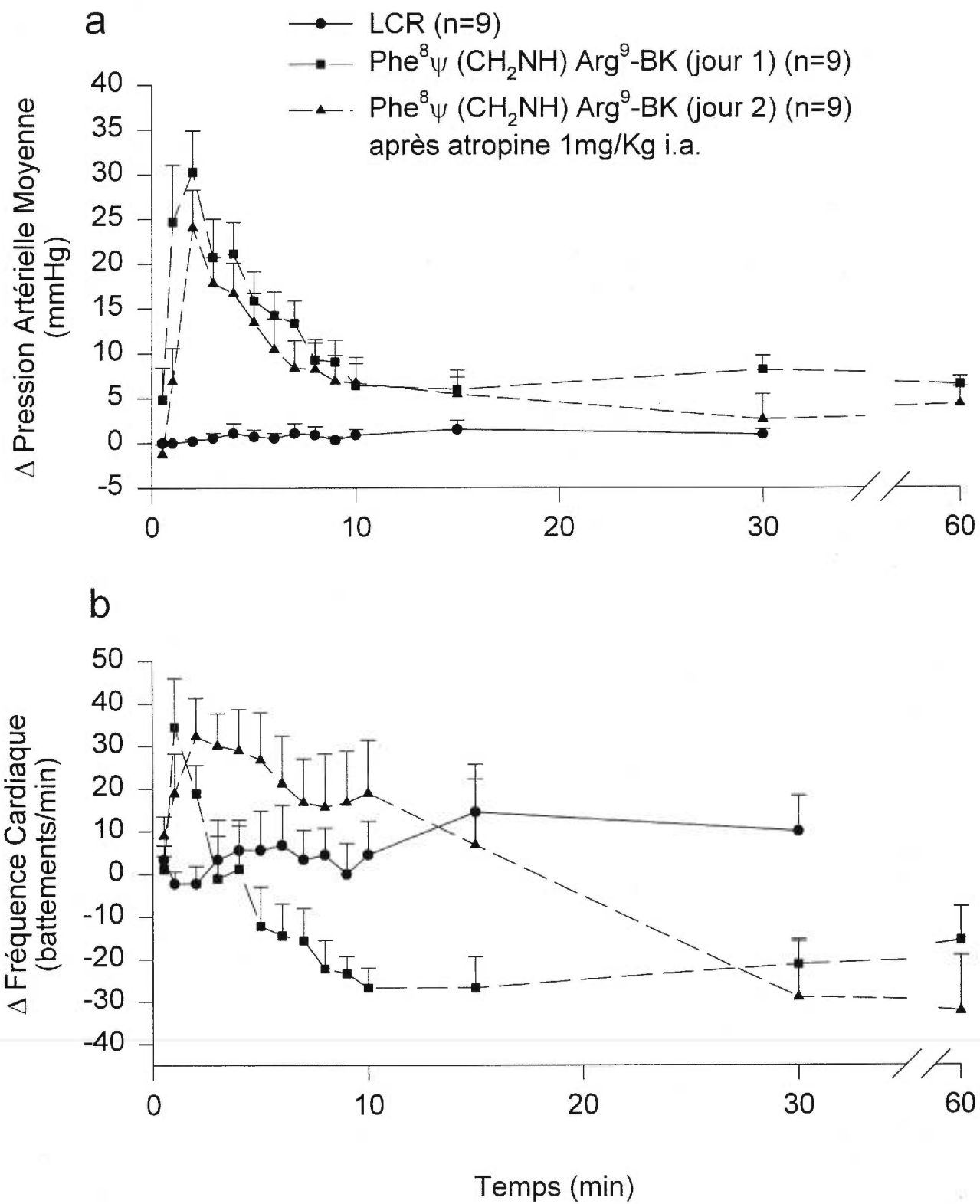
(jour 2) 2-6 min,  $p < 0.01$

(FC) (jour 1) 1-2 min et de 8-15 min,  $p < 0.05$

(jour 2) non significatif

Comparaisons avec le Phe<sup>8</sup>  $\psi$  (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK (jour 1)

(FC) (jour 2) 6-15min,  $p < 0.05$



Au jour 2, 20 min après l'injection de l'atropine (1 mg/Kg i.a.), le Phe<sup>8</sup>  $\psi$  (CH<sub>2</sub>NH) Arg<sup>9</sup>-BK provoque une augmentation de pression artérielle moyenne qui n'est pas différente significativement de celle du témoin (jour 1). Par contre, la bradycardie induite par l'agoniste est complètement bloquée entre 6 et 15 min et la tachycardie résultante n'est pas significative par rapport aux valeurs du LCR.

Dans les sections 3.6 à 3.8, nous avons voulu déterminer la spécificité de l'inhibition des réponses cardio-vasculaires aux kinines par les LPS. Pour ce faire, nous avons mesuré l'effet de la SP en absence et en présence de LPS.

### 3.6 Effets i.c.v. de la SP sur la réponse comportementale et les paramètres cardio-vasculaires suite à un traitement i.c.v. au LPS

Au jour 1, l'administration i.c.v. de la SP (25 pmoles) provoque une augmentation significative de pression artérielle moyenne entre 2 et 15 min et de la FC entre 2 à 10 min (**figure 13**). La réponse comportementale est caractérisée par une augmentation des activités suivantes: FW, G, S, D et WDS (**figure 14**). Au jour 2, 6 h après l'injection de LPS (75 ug i.c.v.), l'effet presseur et la tachycardie sont absents et seule le FW est observé quoique significativement réduit. La réponse cardio-vasculaire de la SP retourne aux valeurs contrôles à 24 h après traitement au LPS et cet effet est significatif de 2-4 min pour la PAM et de 2-8 min pour la FC. En plus d'observer un nouveau comportement, soit le HS, tous les comportements reviennent à la normale 24 h après le LPS. Toutefois, on remarque que l'effet presseur de la SP et le S sont à nouveau inhibés à 48 h. En revanche, la tachycardie induite par la SP est comparable à celle obtenue au jour 1 ainsi que les comportements suivants: FW, HS, G, D, WDS.

**Figure 13**

Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire de la SP (25 pmoles/1  $\mu$ l i.c.v.) avant et à 6, 24 et 48 h après l'injection de LPS (75  $\mu$ g i.c.v.).

En ordonnée:       (a)  $\Delta$  Pression Artérielle Moyenne (mm Hg)  
                           (b)  $\Delta$  Fréquence Cardiaque (battements/min)  
 En abscisse:        Temps (min)

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) et la SP avant l'injection de LPS ont été évaluées d'abord avec l'ANOVA à deux voies puis avec le test de Dunnett. Les calculs statistiques donnent les résultats suivants:

Comparaisons de la SP avec le véhicule

(PAM) (jour 1) 2-15 min,  $p < 0.05$

(jour 2) non significatif

(jour 3) 2-4 min,  $p < 0.05$

(FC) (jour 1) 2-10 min,  $p < 0.01$

(jour 2) non significatif

(jour 3) 2-8 min,  $p < 0.05$

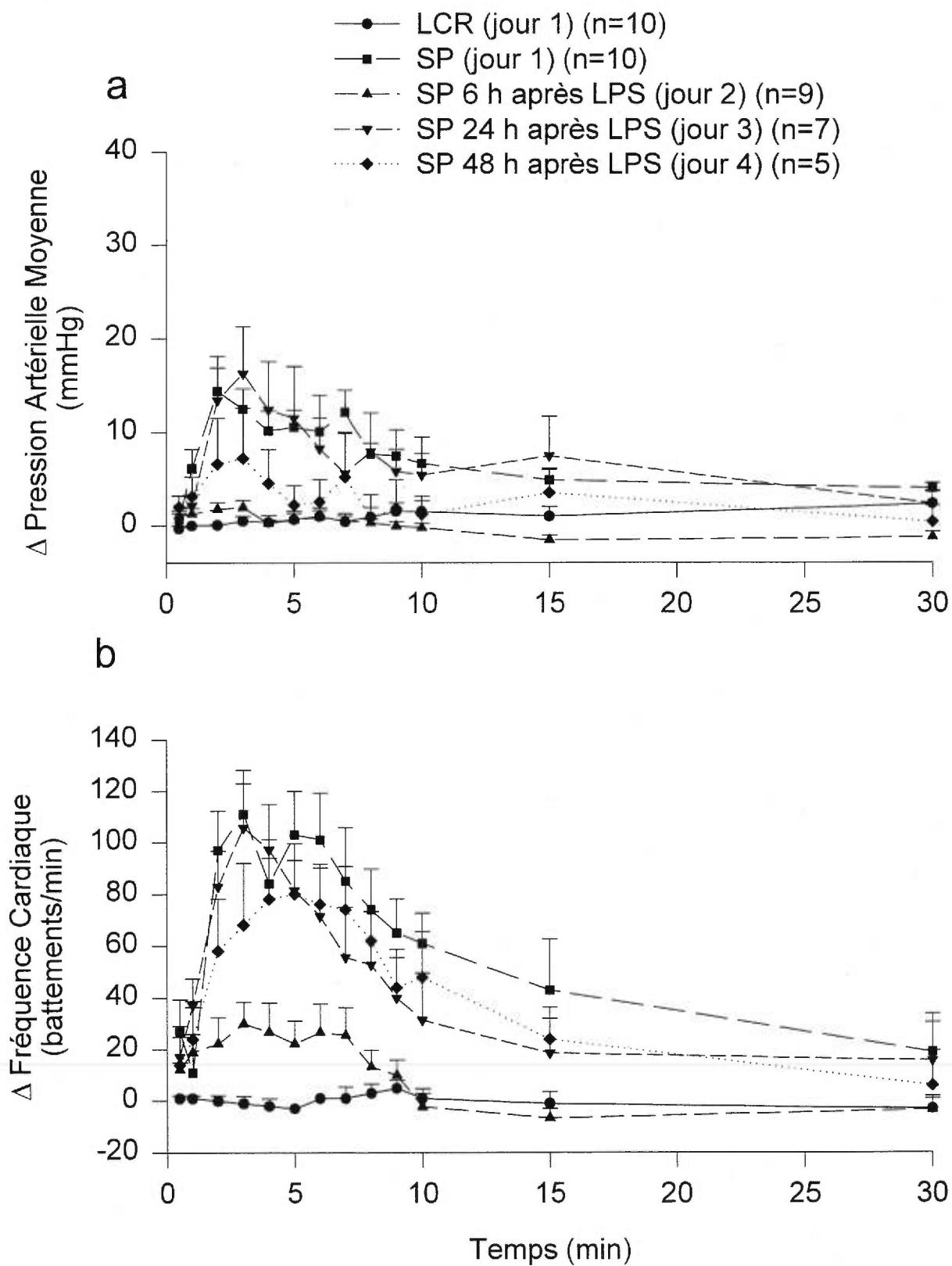
(jour 4) 2-10 min,  $p < 0.01$

Comparaisons avec la SP (jour 1)

(PAM) (jour 2) 3-30 min,  $p < 0.01$

(FC) (jour 2) 2-15 min,  $p < 0.05$





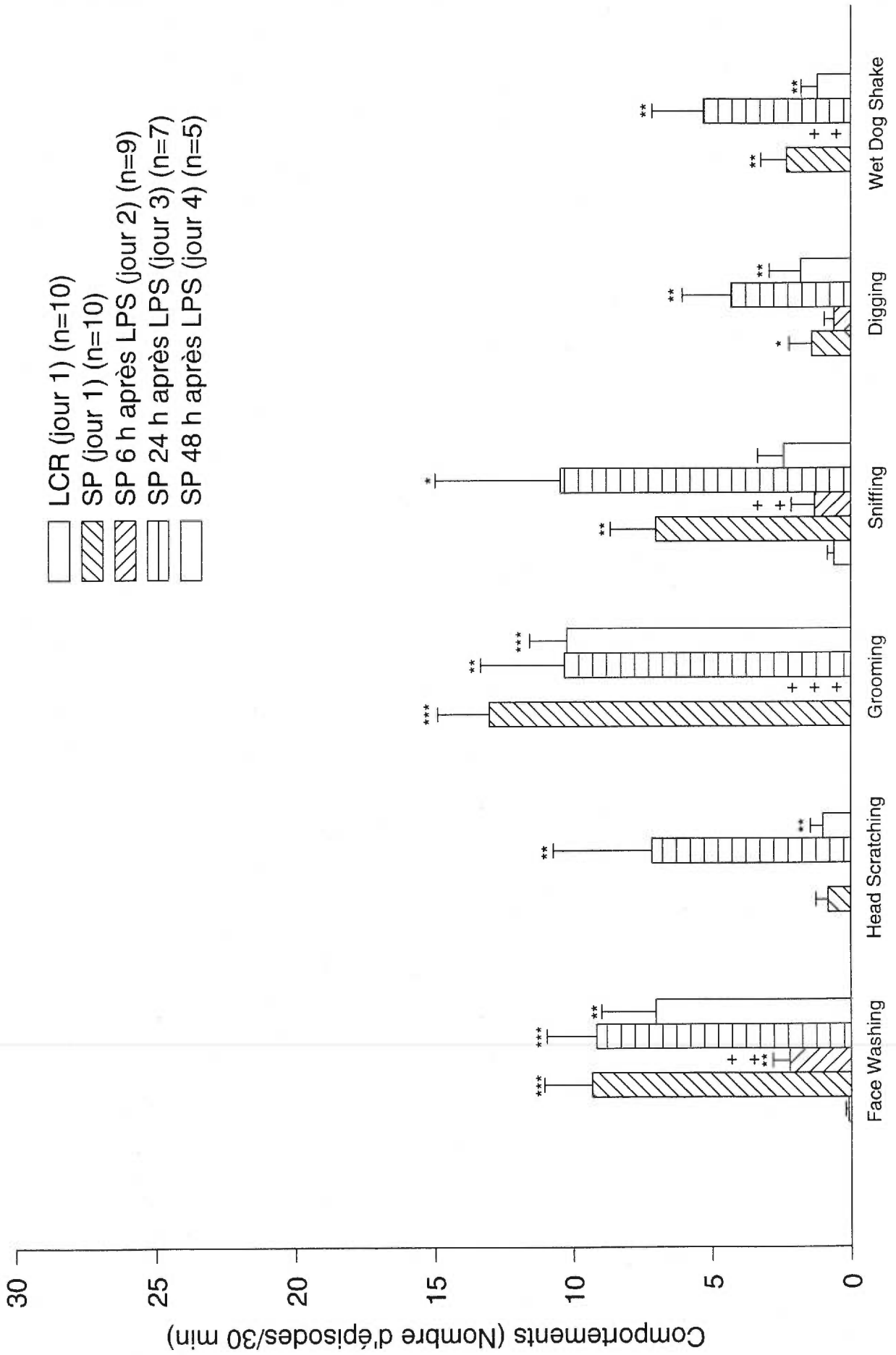
**Figure 14**

Effets i.c.v. de la SP (25 pmoles) sur la réponse comportementale avant et à 6, 24 et 48 h après l'injection de LPS (75 µg i.c.v.).

En ordonnée: Comportements (épisodes/30 min)

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) et \* ( $p < 0.05$ ) et la SP avant l'injection de LPS (+++) ( $p < 0.001$ ), ++ ( $p < 0.01$ ) ont été évaluées d'abord avec le test de Kruskal-Wallis pour des valeurs non paramétriques suivi du test de Wilcoxon Mann-Whitney.

---



Afin de vérifier l'implication possible des prostaglandines dans la perte de la réponse à la SP, 6 h après traitement au LPS, nous avons utilisé l'indométhacine, un inhibiteur de la cyclooxygénase. Nous avons vérifié d'abord l'effet de l'indométhacine sur la réponse à la SP en l'absence de LPS, puis, 6 h après traitement au LPS chez les mêmes animaux.

### 3.7 Effets i.c.v. de la SP sur les réponses comportementales et cardiovasculaires en présence d'indométhacine avant et après traitement au LPS

Au jour 1, l'administration i.c.v. de la SP (25 pmoles) provoque une augmentation significative de la PAM entre 2 et 15 min et de la FC entre 2 et 9 min (**figure 15**). La SP augmente aussi les activités comportementales suivantes: FW, G, S, D et WDS (**figure 16**). Au jour 2, 1 h après l'injection d'indométhacine (5 mg/Kg i.a.), la SP provoque un effet presseur (2 à 10 min) et une tachycardie (30 sec à 10 min) quelque peu accentués. L'indométhacine fait apparaître un nouveau comportement, HS, en présence de la SP et potentialise celui du WDS. Les autres comportements ne sont pas significativement altérés. Au jour 3, l'injection de SP, 6 h après l'injection de LPS (75 µg i.c.v.) ne provoque plus d'effet presseur et de tachycardie, même si précédé 1 heure avant par une injection d'indométhacine (5 mg/Kg). Certains comportements demeurent inchangés (G, S, D et WDS) alors que d'autres sont significativement réduits (FW et HS). Les comportements induits par la SP 24 h plus tard ne sont pas significativement différents de ceux observés en absence d'indométhacine au jour 1. En revanche, les effets de la SP sur la PAM et la FC demeurent bloqués 24 h après traitement au LPS.

### Figure 15

Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire de la SP (25 pmoles/1  $\mu$ l i.c.v.) suite à l'injection d'indométhacine avant et après traitement au LPS.

En ordonnée: (a)  $\Delta$  Pression Artérielle Moyenne (mmHg)  
 (b)  $\Delta$  Fréquence Cardiaque (battements/min)  
 En abscisse: Temps (min)

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) et la SP avant l'injection de LPS ont été évaluées d'abord avec l'ANOVA à deux-voies puis avec le test de Dunnett. Les calculs statistiques donnent les résultats suivants:

Comparaisons de la SP avec le véhicule

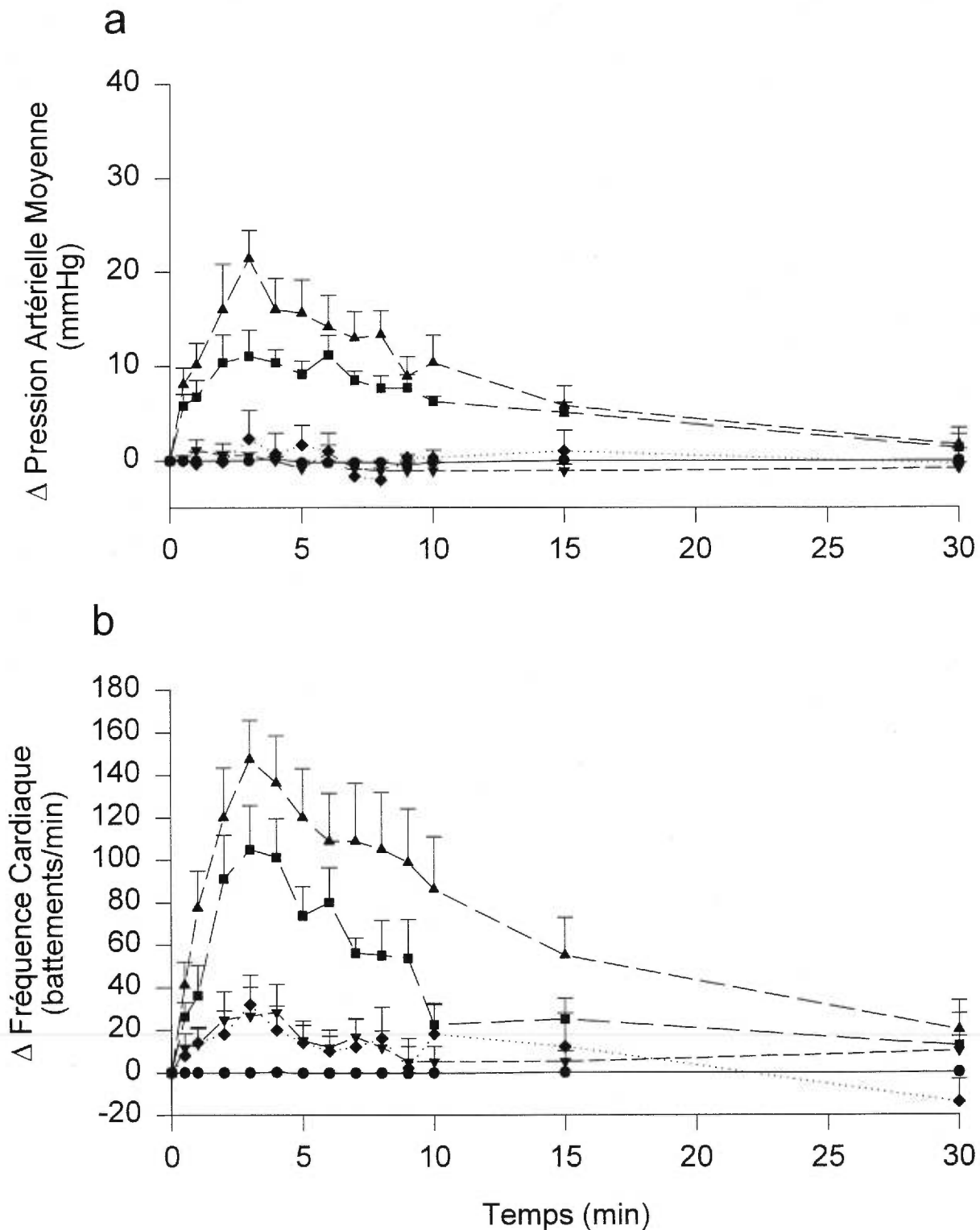
(PAM) (jour 1) 2-15 min,  $p < 0.01$   
 (jour 2) 2-10 min,  $p < 0.01$   
 (FC) (jour 1) 2-9 min,  $p < 0.05$   
 (jour 2) 0.5-10 min,  $p < 0.05$

Comparaisons avec la SP (jour 1)

---

(PAM) (jour 3) 0.5-15 min,  $p < 0.01$   
 (jour 4) 4-10 min,  $p < 0.01$   
 (FC) (jour 3) 3-7 min,  $p < 0.05$   
 (jour 4) 4-7 min,  $p < 0.05$

- LCR (n=8)
- SP (jour 1) (n=8)
- ▲ SP 1h après indométhacine (jour 2) (n=8)
- ▼ SP 6 h après LPS et 1h après indométhacine (jour 3) (n=6)
- ◆ SP 24 h après LPS (jour 4) (n=5)



**Figure 16**

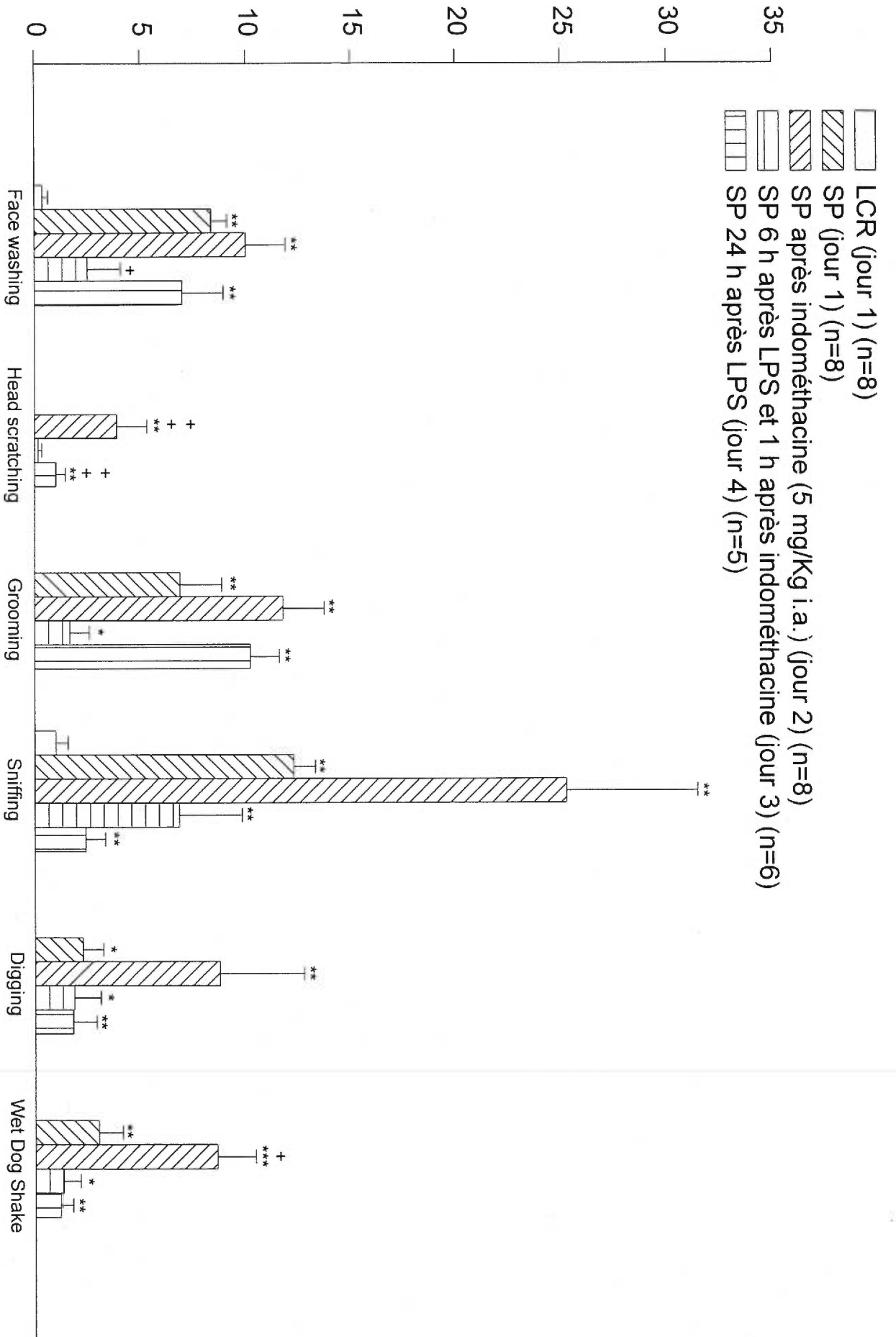
Effets i.c.v. de la SP sur les réponses comportementales suite à l'injection d'indométhacine avant et après traitement au LPS.

En ordonnée: Comportements (épisodes/30 min)

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) et \* ( $p < 0.05$ ) et la SP avant l'injection de LPS (++) ( $p < 0.01$ ), + ( $p < 0.05$ ) ont été évaluées d'abord avec le test de Kruskal-Wallis pour des valeurs non-paramétriques suivi du test de Wilcoxon Mann-Whitney.

---

Comportements (Nombre d'épisodes/30 min)





Dans la section suivante, nous présentons des résultats à partir d'un protocole similaire à celui de la section 3.7, mais avec une seule injection d'indométhacine après traitement au LPS.

### 3.8 Effets i.c.v. de la SP sur les réponses comportementales et cardiovasculaires en présence d'indométhacine après traitement au LPS

Au jour 1, l'administration i.c.v. de la SP (25 pmoles) provoque une augmentation significative de la PAM (2-10 min) et de la FC entre 2 et 7 min (**figure 17**). On observe aussi une augmentation significative des réponses comportementales suivantes: FW, G, S et WDS (**Figure 18**). Au jour 2, soit 6 h après l'injection de LPS (75 µg i.c.v.), la SP ne provoque plus d'effet presseur et de tachycardie, seule la valeur à 3 min est significative pour l'augmentation de la FC. Aussi, tous les comportements sont abolis. Si la SP est ré-injectée à 7:45 h post-LPS, mais cette fois-ci en présence d'indométhacine (5 mg/Kg), une tachycardie significative est alors observée entre 3 et 6 min et certains comportements reviennent à la normale: FW, G, S, WDS. De plus, le D apparaît en présence de SP. L'effet presseur et la tachycardie engendrés par la SP reviennent aux valeurs initiales à 24 h et 48 h après traitement au LPS. Les réponses comportementales retournent également aux valeurs contrôles bien que certaines sont potentialisées à 24 h (FW, HS, D et WDS) et à 48 h (WDS).

---

Figure 17

Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire de la SP (25 pmoles/1  $\mu$ l i.c.v.) suite à l'injection d'indométhacine après traitement au LPS

En ordonnée: (a)  $\Delta$  Pression Artérielle Moyenne (mmHg)  
 (b)  $\Delta$  Fréquence Cardiaque (battements/min)  
 En abscisse: Temps (min)

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) et la SP avant l'injection de LPS ont été évaluées d'abord avec l'ANOVA à deux voies puis avec le test de Dunnett. Les calculs statistiques donnent les résultats suivants:

Comparaisons de la SP avec le véhicule

(PAM) (jour 1) 2-10 min,  $p < 0.05$

(jour 2 après indométhacine) 5 min,  $p < 0.05$

(jour 3) 2-5 min,  $p < 0.05$

(jour 4) 2 min,  $p < 0.05$

(FC) (jour 1) 2-7 min,  $p < 0.01$

(jour 2 après indométhacine) 3 min,  $p < 0.01$  et 4-6 min,  $p < 0.05$

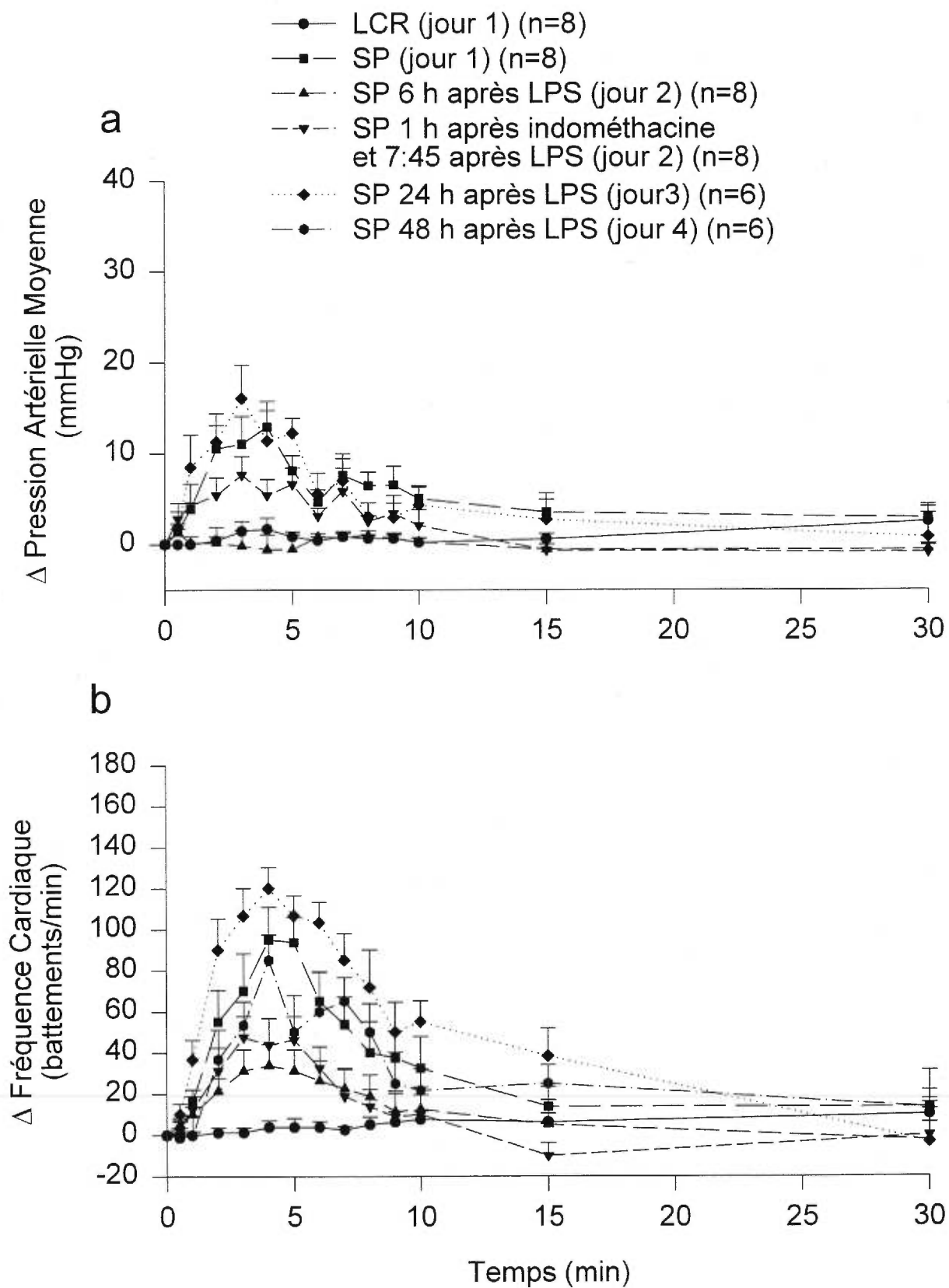
(jour 3) 1-9 min,  $p < 0.05$

(jour 4) 3-9 min,  $p < 0.05$

Comparaisons avec la SP (jour1)

(PAM) (jour 2) 1-8 min,  $p < 0.05$

(FC) (jour 2) 4-5 min,  $p < 0.05$



**Figure 18**

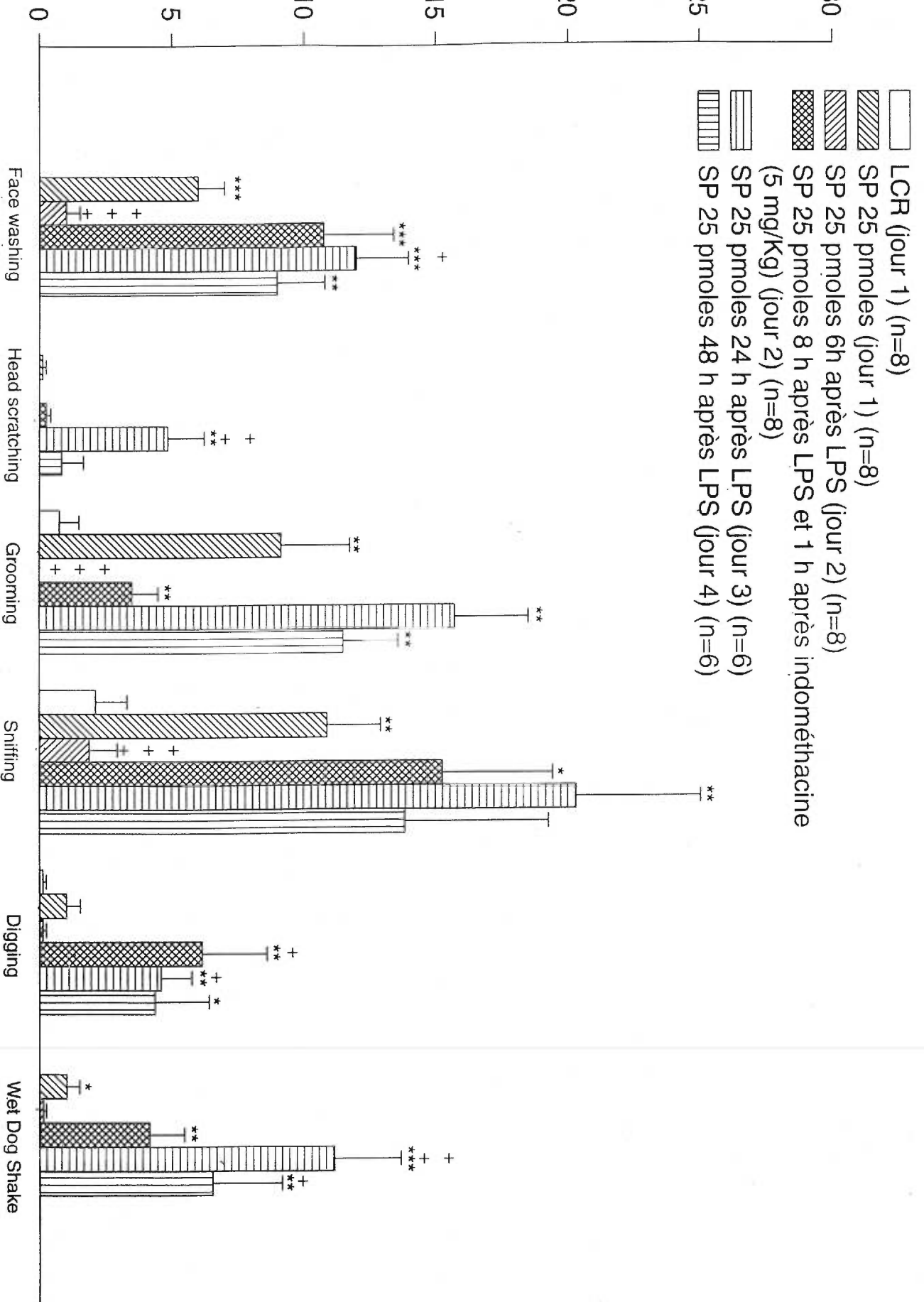
Effets i.c.v. de la SP sur les réponses comportementales suite à l'injection d'indométhacine après traitement au LPS.

En ordonnée: Comportements (épisodes/30 min)

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) et \* ( $p < 0.05$ ) et la SP avant l'injection de LPS (+++) ( $p < 0.001$ ), ++ ( $p < 0.01$ ), + ( $p < 0.05$ ) ont été évaluées d'abord avec le test de Kruskal-Wallis pour des valeurs non-paramétriques suivi du test de Wilcoxon Mann-Whitney.

---

## Comportements (Nombre d'épisodes/30 min)



Cette dernière section présente les résultats obtenus avec les rats diabétiques et témoins. L'hypothèse est que le diabète permet l'expression du récepteur B<sub>1</sub> au niveau central et en périphérie sur les vaisseaux sanguins. Les réponses cardio-vasculaires à l'agoniste B<sub>1</sub> classique et à l'agoniste B<sub>1</sub> stable seront mesurées en périphérie et centralement.

### 3.9 Effets cardio-vasculaires central et périphérique du Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK et du des-Arg<sup>9</sup>-BK après traitement à la STZ (65 mg/Kg i.p.)

L'implantation d'une canule au niveau i.t. i.c.v. i.c. et i.v. nous a permis d'étudier les effets spinal, supra-spinal et périphérique d'agonistes du récepteur B<sub>1</sub> sur le système cardio-vasculaire du rat diabétique. Quatre rats traités à la STZ sur six ont manifesté un changement cardio-vasculaire caractérisé par une élévation de la PAM et la FC suite à l'injection du des-Arg<sup>9</sup>-BK (6.5 nmoles/10 µl) au niveau du neuvième segment thoracique (i.t.) (figure 19).

Le **tableau VIII** résume les changements maximaux sur la PAM et la FC induits par l'administration i.a. et i.v. des agonistes B<sub>1</sub>, Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK et des-Arg<sup>9</sup>-BK chez un groupe de rats éveillés. Les effets de deux doses sont enregistrés pendant une période de 15 min entre 8 et 11 jours après le traitement à la STZ (65 mg/Kg, i.p.). Les résultats montrent que le Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK et le des-Arg<sup>9</sup>-BK n'affectent pas significativement les paramètres cardio-vasculaires lorsqu'injectés en périphérie après traitement à la STZ.

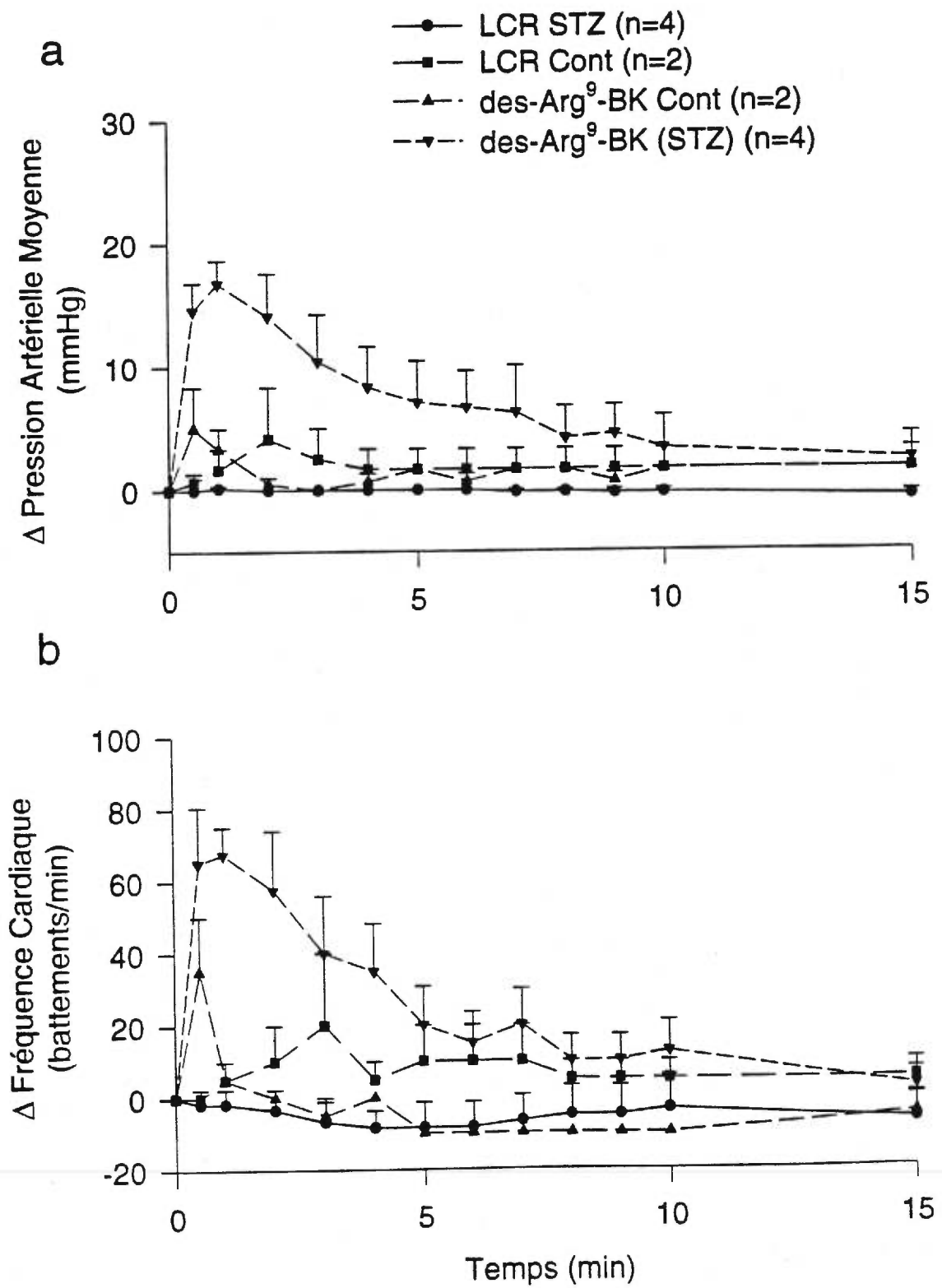
**Figure 19**

Courbes temporelles montrant l'effet cardio-vasculaire du des-Arg<sup>9</sup>-BK (6.5 nmoles/10  $\mu$ l i.t.) après traitement à la STZ (mêmes animaux qu'aux tableaux VIII-X)

En ordonnée:       (a)  $\Delta$  Pression Artérielle Moyenne (mmHg)  
                          (b)  $\Delta$  Fréquence Cardiaque (battements/min)  
En abscisse:         Temps (min)

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) n'ont pas été effectuées en raison d'un échantillonnage insuffisant.

---





**Tableau VIII** : Changements maximaux de la pression artérielle moyenne (PAM) et de la fréquence cardiaque (FC) induits par l'injection i.a. et i.v. de Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK et de des-Arg<sup>9</sup>-BK après traitement à la Streptozotocine (65mg/Kg i.p.) (8-11jours) chez le rat éveillé.

Site d'injection	Saline	Effets du Sar[D-Phe <sup>8</sup> ] des-Arg <sup>9</sup> -BK (nmoles/Kg)				Effets du des-Arg <sup>9</sup> -BK (nmoles/Kg)				
		Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	
		10,25		1025		10,37		1037		
Intra-carotide	2±2 (n=6)	15±9 (n=6)	2±2 (n=6)	10±4 (n=3)	4±4 (n=3)	33±12 (n=5)	-2±1 (n=5)	-10±5 (n=3)	4±3 (n=3)	37±9 (n=3)
Intra-jugulaire	2±1 (n=6)	8±4 (n=6)	2±1 (n=6)	12±6 (n=3)	6±3 (n=3)	40±18 (n=5)	1±1 (n=5)	-8±5 (n=3)	3±2 (n=3)	37±19 (n=3)

Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les changements (Δ) mesurés sur la PAM (mmHg) et la FC (battements/min) expriment les valeurs maximales observées sur un période d'enregistrement de 15 minutes. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (saline) ont été évaluées avec le test de Dunnett. Aucune valeur n'est significative.

**Tableau IX:** Changements maximaux de la pression artérielle moyenne (PAM) et de la fréquence cardiaque (FC) induits par l'injection i.c.v. de Sar[D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK et de des-Arg<sup>9</sup>-BK après traitement à la Streptozotocine (65mg/Kg i.p.) (8-11jours) chez le rat éveillé.

Site	LCR		Sar[D-Phe <sup>8</sup> ] des-Arg <sup>9</sup> -BK (0.65nmole/1µl)		des-Arg <sup>9</sup> -BK (0.65nmole/1µl)	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
Intra- cérébral	0±0 (n=6)	-13±4	1±2 (n=5)	-16±10	1±1 (n=6)	8±9

Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les changements (Δ) mesurés sur la PAM (mmHg) et la FC (battements/min) expriment les changements maximaux observés sur un période d'enregistrement de 15 minutes. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) ont été évaluées avec le test de Dunnett. Aucune valeur n'est significative.

**Tableau X:** Effets sur le poids corporel et le taux sanguin de glucose après traitement à la streptozotocine (65 mg/Kg, i.p.).

	Avant (jour 1)	Après (8-11 jours)
Poids (grammes)	297.14 ± 3.8	267.1 ± 6.7 **
Glycémie (mM/ml)	4.27 ± 0.4	19.83 ± 0.9 ***

Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de (6) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au jour 1 ont été évaluées avec le test de Dunnett. Les différences statistiques significatives sont indiquées par \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Le **tableau IX** résume les changements maximaux sur la PAM et la FC induits par l'administration i.c.v. de 0.65 nmol/1  $\mu$ l de Sar [D-Phe<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-BK et de des-Arg<sup>9</sup>-BK chez le même groupe de rats représenté dans le tableau VIII et montre que les deux agonistes sont aussi sans effets. Le **tableau X** indique que les rats traités à la STZ ont subi une baisse significative de poids corporel et une élévation significative de la glycémie.

Pour exclure l'influence possible de l'implantation de plusieurs canules sur l'effet hypertenseur et la tachycardie provoqués par l'injection i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK, l'effet de l'injection i.t. de 6.5 nmoles des-Arg<sup>9</sup>-BK chez un groupe de rats possédant seulement une autre canule dans l'artère fémorale (pour la prise des paramètres cardio-vasculaires) a été étudié. Premièrement, la durée de traitement à la STZ a été maintenue à 10-11 jours. Chez ces animaux, en utilisant des doses croissantes, l'effet hypertenseur et la tachycardie sont observés seulement avec l'injection de 32.5 nmoles de des-Arg<sup>9</sup>-BK (résultats non montrés). En prolongeant le temps d'action de la STZ à 18 jours, l'effet hypertenseur et la tachycardie sont observés à partir de 3.2 nmoles de des-Arg<sup>9</sup>-BK (**figure 20**). Ainsi, on observe une plus grande réponse avec l'agoniste B<sub>1</sub> chez les rats traités 18 jours plus tôt avant avec la STZ. L'effet presseur est maximum à 6.5 nmoles, tandis que celui de la tachycardie l'est à 3.2 nmoles de des-Arg<sup>9</sup>-BK. Chez les rats traités avec le véhicule (100  $\mu$ l/Kg i.p. de tampon de citrate de sodium) 18 jours avant, l'injection i.t. du des-Arg<sup>9</sup>-BK provoque un effet presseur de faible intensité qui ne varie pas avec la dose et provoque plutôt une bradycardie (**figure 21**).

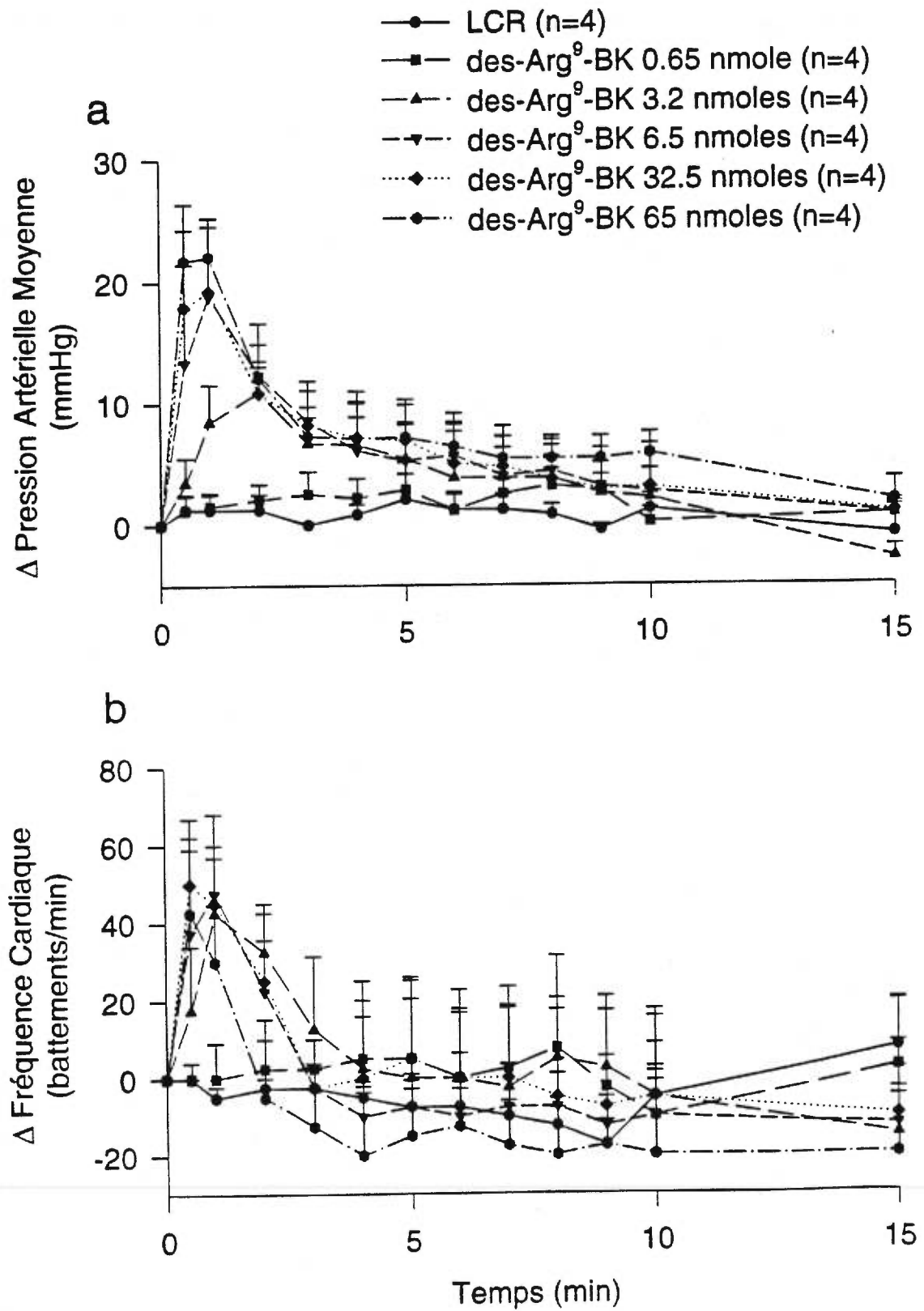
**Figure 20**

Effet cardio-vasculaire de plusieurs doses de des-Arg<sup>9</sup>-BK (0.65 à 65 nmoles/10  $\mu$ l i.t.) après 18 jours de traitement à la STZ.

En ordonnée:       (a)  $\Delta$  Pression Artérielle Moyenne (mmHg)  
                          (b)  $\Delta$  Fréquence Cardiaque (battements/min)  
En abscisse:         Temps (min)

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) n'ont pas été effectuées en raison d'un échantillonnage insuffisant.

---



**Figure 21**

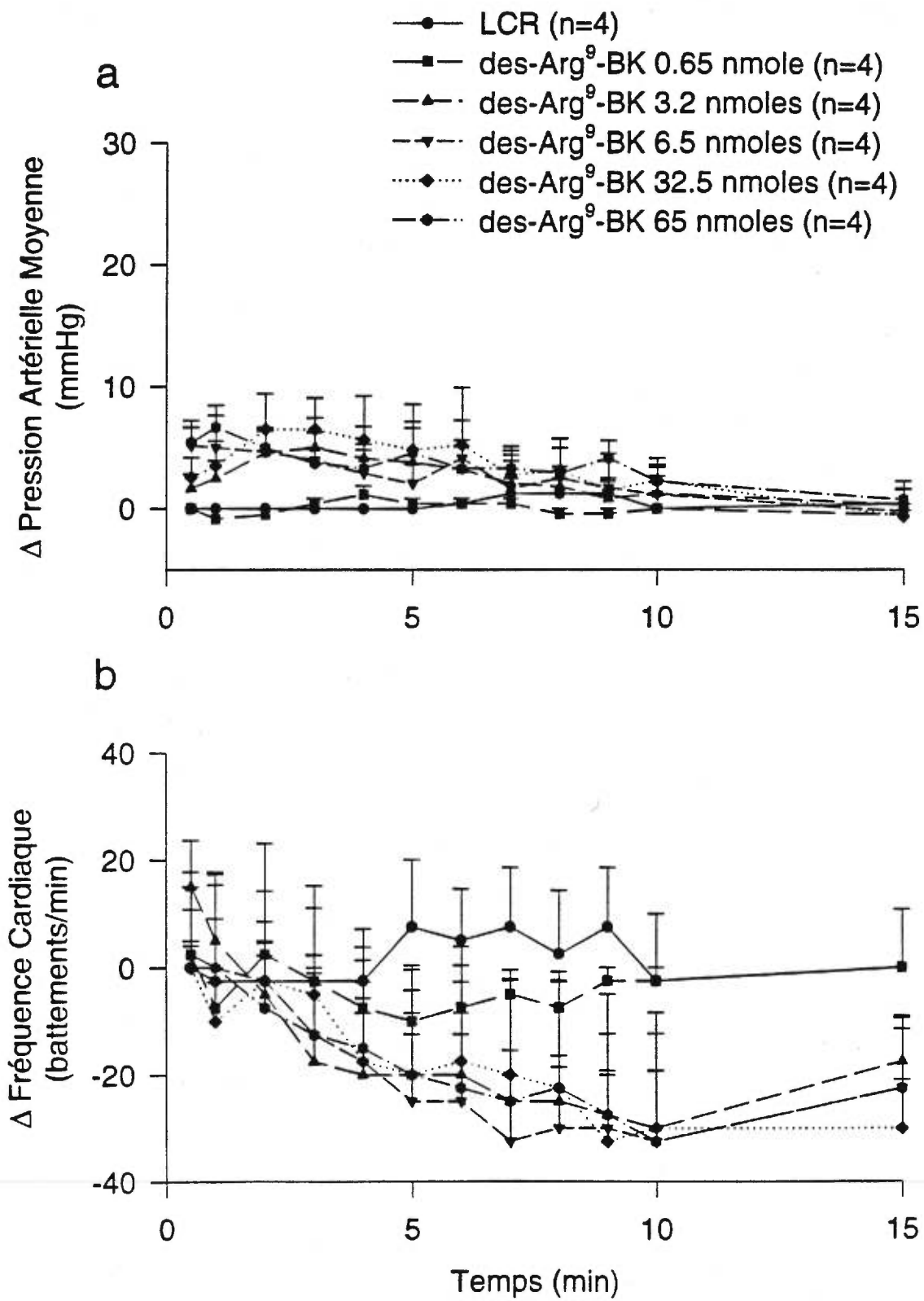
Effet cardio-vasculaire de plusieurs doses de des-Arg<sup>9</sup>-BK (0.65 à 65 nmoles/10 µl i.t.) chez un groupe de rats témoins.

En ordonnée:       (a)    Δ Pression Artérielle Moyenne (mmHg)  
                             (b)    Δ Fréquence Cardiaque (battements/min)

En abscisse:                Temps (min)

Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de (n) rats. Les comparaisons statistiques par rapport au véhicule (LCR) n'ont pas été effectuées en raison d'un échantillonnage insuffisant.

---





## **Chapitre IV**

### **Discussion**

---

#### *4.1 Modèle de l'œdème à la carragénine*

L'induction de l'œdème après l'injection intraplantaire de carragénine est un modèle standard pour étudier l'activité des drogues anti-inflammatoires (Winter et al., 1962). Il a été démontré que le polysaccharide carragénine peut activer le système de contact, lequel amène une production de kinines (Hargreaves et al., 1988). Il a été démontré récemment que l'œdème locale induite par l'injection de carragénine chez le rat est relayée exclusivement par l'activation d'un récepteur de type B<sub>2</sub> malgré que les taux endogènes de des-Arg<sup>9</sup>-BK sont de 5 fois plus élevés que ceux de la BK au site de l'inflammation (Décarie et al., 1996a). Par contre, dans ce même modèle à la carragénine, notre laboratoire a aussi démontré que le récepteur B<sub>1</sub> est impliqué dans la régulation de la production des taux hépatiques du T-kininogène (Raymond et al., 1996). Ce modèle a donc été utilisé pour déterminer si le récepteur B<sub>1</sub> pouvait aussi être induit centralement. Nos résultats montrent que l'agoniste classique du récepteur B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-BK, ne produit aucun effet cardio-vasculaire significatif par rapport au véhicule avant et après (3-24h) le traitement à la carragénine lorsqu'injecté par la jugulaire, la carotide et par la voie i.t. De plus, la carragénine n'a pas modifié les valeurs basales de PAM et de FC, 3-24 h après le traitement. Par conséquent, notre recherche d'un modèle d'induction du récepteur B<sub>1</sub> dans le système nerveux central s'est tournée vers le modèle d'inflammation par les LPS où il existe de nombreuses évidences de l'induction du récepteur B<sub>1</sub> en périphérie.

---

#### *4.2 Modèle de l'inflammation systémique par l'injection en périphérie de LPS*

Un effet hypotenseur suite à l'administration i.v. de des-Arg<sup>9</sup>-BK a été rapporté chez le lapin 5 heures après l'injection i.v. d'une dose sous-léthale de lipopolysaccharides bactérien (LPS) (Regoli et al., 1981; Marceau et al., 1984) et 24 h après traitement au LPS chez le rat Brown/Norway (Tokumasu et al., 1995; Ueno et al., 1995) et le rat Wistar (Nicolau et al., 1996). Dans notre étude, l'injection par la jugulaire et par la carotide de Sar[D-Phe<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK ou de des-Arg<sup>9</sup>-BK, 12-48 h après traitement au LPS (100 µg/Kg i.v. ou i.a.), n'a provoqué aucun changement significatif sur la PAM et la FC chez le rat Wistar. Nos résultats chez le rat éveillé ne confirment pas ceux de Nicolau et al., (1996) chez le rat anesthésié à l'uréthane qui rapportent un effet vasodépresseur avec le Sar[D-Phe<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK, 24 h après traitement au LPS (100 µg/Kg i.v.). D'ailleurs, nous n'avons pas réussi à reproduire ces mêmes résultats chez le rat anesthésié à l'uréthane, car des doses 1000 fois plus élevées de Sar[D-Phe<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK étaient nécessaires pour induire des réponses vasodépressives (résultats non montrés). La cause de ces divergences n'est pas claire car notre source d'agoniste B<sub>1</sub> est la même.

Au niveau central, nos résultats montrent que l'administration i.c.v. de Sar[D-Phe<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK ou de des-Arg<sup>9</sup>-BK est sans effet cardio-vasculaire chez des rats traités au LPS (100 µg/Kg i.v. ou i.a.). En revanche, 24 h après traitement au LPS (100 µg/Kg i.a.), l'injection i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK provoque une bradycardie significative qui coïncide avec le temps où une réponse centrale ou périphérique des récepteurs B<sub>1</sub> a été observée chez le rat (Tokumasu et al., 1995; Ueno et al., 1995; Coelho et al., 1997). Tout récemment, Coelho et al (1997) ont démontré l'implication centrale du

récepteur B<sub>1</sub> dans la phase tardive de la fièvre induite par l'administration i.v. de LPS (0.5 µg/Kg). Dans nos travaux, nous avons seulement utilisé une forte dose de LPS (100 µg/Kg i.v. et i.a.). L'ajout d'une faible dose de LPS (0.5 µg/Kg) à notre protocole serait opportun afin d'établir une meilleure comparaison avec les effets centraux déjà rapportés par Coelho et al (1997).

#### *4.3 Modèle de l'hyperthermie induite par l'injection centrale de LPS*

Il a été démontré que l'administration centrale de LPS (0.02-150 µg i.c.v.) provoque une élévation de la température corporelle du rat qui atteint un maximum entre 6 et 8 h après l'injection (Luheshi et al., 1993; Walker et al., 1996). Ces mêmes auteurs ont démontré que le développement de l'hyperthermie suivant l'administration centrale de LPS implique l'activation centrale du récepteur B<sub>2</sub>. Dans notre étude, aucun effet sur les paramètres cardio-vasculaires n'a été observé suite à l'injection i.t. ou i.c.v. de des-Arg<sup>9</sup>-BK chez des groupes de rats ayant reçu respectivement un traitement i.t. (10 µg) ou i.c.v. (1 µg) au LPS. Par la suite, notre étude s'est concentrée sur l'inflammation centrale causée par l'injection i.c.v. de LPS à une dose plus forte (75 µg), laquelle induit une plus grande élévation de température corporelle chez le rat (Walker et al., 1996). À cette dose, l'injection de l'agoniste B<sub>1</sub> résistant Sar[D-Phe<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK n'a pas provoqué de réponse cardio-vasculaire à 6, 24 et 48h après traitement au LPS.

---

L'injection i.c.v. de BK provoque une élévation de la PAM qui demeure stable au cours de trois injections successives à intervalles de 20 min chez le même animal (Corrêa et Graeff, 1974; étude présente). Toutefois, cette

réponse pressive n'est plus observée lorsque la BK est injectée 6 h après le traitement au LPS (75 µg, i.c.v.). De plus, on observe une bradycardie significative en présence de BK qui n'est pas significative chez le rat témoin. L'intensité de la réponse pressive à la BK revient graduellement aux valeurs contrôles à 24 h et 48 h bien que la durée augmente en parallèle. Par contre, la bradycardie n'est plus observée à 24 et 48 h post-traitement.

L'absence de réponse pressive à la BK 6 h après l'injection i.c.v. de LPS pourrait être causée par une augmentation de l'activité des kininases impliquées dans la dégradation de la BK. Cependant, cette hypothèse n'explique pas la bradycardie engendrée par la BK au même temps. De plus, l'agoniste B<sub>2</sub> résistant au métabolisme, Phe<sup>8</sup>ψ(CH<sub>2</sub>NH)Arg<sup>9</sup>-BK, perd également son action pressive. Cette perte de réponse pourrait alors être due à une désensibilisation et/ou une internalisation du récepteur B<sub>2</sub>. Cette hypothèse n'explique pas non plus la persistance d'une bradycardie à 6 h avec la BK ou l'agoniste résistant B<sub>2</sub>. De plus, cette perte de réponse n'est pas spécifique aux kinines sur le récepteur B<sub>2</sub> puisque que la SP perd aussi son action sur la PAM, la FC et les comportements. La perte des réponses comportementales et cardio-vasculaires est réversible 24 h après le traitement au LPS. Il est intéressant de noter ici que, contrairement aux kinines, on note que la SP perd à la fois son effet sur la PAM et la FC. La réponse cardio-vasculaire induite par l'injection i.c.v. de SP a été associée à une élévation de l'activité sympatho-surrénalienne (Unger et al., 1981; Takano et al., 1990) ainsi que la réponse pressive de la BK (Lambert et Lang, 1970; Correa et Graeff, 1974; Thomas et al., 1987). Il est alors vraisemblable de croire que les LPS peuvent affecter la composante sympathique du mécanisme d'action de la BK et de la SP et non la composante

parasymphathique (bradycardie) de la BK. Les LPS peuvent influencer le relâchement de neurotransmetteurs à partir de terminaisons nerveuses, tel que montré *in vivo* sur des terminaisons nerveuses du nerf phrénique innervant le diaphragme (Liu et al., 1995).

#### 4.3.1 Mécanisme d'action de la réponse centrale de la BK

La bradycardie obtenue suite à l'injection i.c.v. de BK n'atteint des valeurs significatives que 6 h après l'injection de LPS. Cette réponse est donc démasquée lorsque la réponse pressive et l'activité sympathique sont réduites. Cette composante semble réelle puisque l'injection i.c.v. de l'agoniste B<sub>2</sub>, Phe<sup>8</sup>ψ(CH<sub>2</sub>NH)Arg<sup>9</sup>-BK, provoque une forte bradycardie en absence de LPS.

Nos études préliminaires sur le mécanisme d'action de cette bradycardie montrent que l'atropine bloque significativement cet effet qui est renversé en une tachycardie non significative. Ce résultat suggère une implication du système nerveux parasympathique (nerf vague). Il est peu probable que la bradycardie soit due à l'activation réflexe du nerf vague puisqu'elle est observée en absence de changement de pression artérielle. La dissociation de l'effet presseur et de la bradycardie suggère deux sites d'action pour la BK. Le site responsable de l'effet presseur (sympathique) serait plus accessible que celui relayant la bradycardie (parasympathique) suite à l'injection i.c.v. de BK. Ainsi, il est possible que l'agoniste Phe<sup>8</sup>ψ(CH<sub>2</sub>NH)Arg<sup>9</sup>-BK résistant à la dégradation puisse atteindre les deux sites à plus forte concentration que la BK et ainsi causer les deux réponses.

L'utilisation de doses plus fortes de BK pourrait renforcer ou écarter cette hypothèse.

Contrairement aux rats témoins, la bradycardie provoquée par l'injection i.c.v. de Phe<sup>8</sup>ψ(CH<sub>2</sub>NH)Arg<sup>9</sup>-BK chez les rats traités aux LPS ne se désensibilise pas après 3 injections à intervalles réguliers de 24 h. Ainsi, les LPS semblent favoriser l'activation du système nerveux parasympathique au détriment du système nerveux sympathique dans ce modèle d'inflammation.

Walker et al (1996) ont montré que l'administration systémique d'indométhacine réduit l'hyperthermie induite par l'administration i.c.v. de LPS. Dans notre étude, l'implication des prostaglandines dans la modulation de la réponse centrale de la BK chez les rats traités aux LPS est difficile à étudier puisqu'un traitement systémique à l'indométhacine, un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, bloque l'effet presseur de la BK chez les rats témoins (Kondo et al., 1979; Kariya et al., 1982). En effet, l'injection i.a. d'indométhacine ne prévient pas la perte de la réponse pressive chez le rat traité 6 h plus tôt au LPS (résultats non montrés).

Aucune étude n'a rapporté de liens directs entre les prostaglandines et la SP. Dans notre étude, l'indométhacine a tendance à potentialiser l'effet cardiovasculaire de la SP bien que les valeurs n'atteignent pas le degré de signification. Ce traitement fait cependant apparaître un nouveau comportement, le head scratching, en présence de la SP et potentialise celui du wet dog shake. Il est possible que ces derniers effets soient causés par l'indométhacine elle-même. Bien que nous n'ayons pas mesuré

quantitativement l'effet de l'indométhacine sur les comportements, les animaux ayant reçu une injection systémique d'indométhacine présentaient un comportement d'agitation et les manifestations comportementales du head scratching et du wet dog shake.

Lorsque l'indométhacine est administrée avant le traitement au LPS, elle ne prévient pas la perte des effets centraux de la SP. De plus, les effets cardio-vasculaires de la SP demeurent inhibés pour une période prolongée (24 h après LPS) ce qui n'est pas le cas si les animaux ne reçoivent pas d'indométhacine. Ces résultats suggèrent donc que les prostaglandines antagonisent la réponse inflammatoire causé par les LPS et qu'elles sont protectrices. Ainsi, leur inhibition par l'indométhacine semble plutôt exacerber la perte des fonctions centrales de la SP. Part contre, lorsque l'indométhacine est administrée après le traitement au LPS, elle diminue la perte des effets centraux de la SP et permet une récupération plus rapide des réponses cardio-vasculaires et comportementales de la SP à 24 h.

Nos résultats nous amènent à se poser la question suivante: pourquoi l'indométhacine, lorsqu'injectée 5 h après le traitement au LPS, ne permet pas le retour de la réponse cardio-vasculaire de la SP mesurée à 6 h post-LPS, alors que l'indométhacine injectée 6:45 h après l'injection des LPS tend à faire réapparaître la réponse cardio-vasculaire et comportementale de la SP mesurée à 7:45 post-LPS. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la fièvre tend à diminuer à partir de 6 h et que nous avons montré que l'indométhacine semble potentialiser l'effet de la SP. Ainsi, conjointement, ces deux facteurs pourraient contribuer à une récupération plus rapide des réponses cardio-vasculaires et comportementales provoquées par



l'administration i.c.v. de SP. Quoi qu'il en soit, les expériences effectuées avec l'indométhacine semblent exclure la participation des prostaglandines à l'effet suppresseur du LPS observé 6 h post-injection sur la réponse cardio-vasculaire de la SP.

L'injection i.c.v. de LPS provoque une réponse inflammatoire caractérisée par l'infiltration des neutrophiles et des macrophages dans les ventricules, le plexus choroïde et l'espace sous-arachnoïde (Andersson et al., 1992). Cette activation du système immunitaire et la production et le relâchement de cytokines pyrogéniques, tels l'interleukine-1, l'interleukine-6 et le tumour necrosis factor- $\alpha$  TNF (Tiffany et Burch, 1989; Banati et al., 1993), sont connus pour être une importante composante dans l'induction de la thermogénèse (Rothwell et Hopkins, 1995). L'administration locale (i.c.v.) de ces agents ou d'antagonistes contre les cytokines pyrogéniques pourront aider à clarifier le mécanisme d'action responsable de la perte de réponse cardio-vasculaire à la BK et à la SP après traitement central au LPS.

#### *4.4 Modèle de l'induction du diabète par la streptozotocine*

Dans le modèle de l'induction du diabète par l'injection i.p. de STZ chez la souris, il a été démontré que les souris traitées parallèlement avec l'antagoniste du récepteur B<sub>1</sub>, [Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK, ont une glycémie normale et une normalisation complète de la diurèse et de l'excrétion de kallikréines, de nitrites et de protéines (Zuccollo et al., 1996). Une action myotrope suite à la stimulation du récepteur B<sub>1</sub> a été montrée dans le fundus de l'estomac de la souris normale (Nsa Allogho et al., 1995). Cette

réponse  $B_1$  est amplifiée chez la souris traitée avec la STZ (Pheng et al., 1997). Cependant, il existe très peu d'études sur l'aspect central du contrôle cardio-vasculaire et l'implication des kinines pendant le diabète. Nos résultats montrent que les agonistes du récepteur  $B_1$ , des-Arg<sup>9</sup>-BK et Sar[D-Phe<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK, ne produisent aucun effet cardio-vasculaire significatif périphérique ou i.c.v. par rapport au véhicule entre 8 et 10 jours après le traitement à la STZ. Par contre, chez ces mêmes animaux, l'injection i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK produit une hypertension et une tachycardie. Tous les rats ayant été traités avec la STZ 8-10 jours auparavant avaient un poids significativement inférieur et un taux de glucose sanguin significativement plus élevé par rapport au premier jour du traitement à la STZ, ce qui confirme leur état diabétique.

Pour exclure l'influence possible de l'implantation des autres canules sur l'effet hypertenseur et la tachycardie provoqués par l'injection i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK, nous avons repris ce protocole en excluant les implantations dans la carotide, dans la jugulaire et dans le ventricule droit (i.c.v.). De plus, deux autres aspects ont été examinés: l'influence de doses croissantes et l'influence de la progression de la glycémie dans le temps. Tout d'abord, nos résultats montrent que les rats injectés uniquement par voie i.t. manifestent aussi une réponse pressive et une tachycardie suite à l'injection de des-Arg<sup>9</sup>-BK. Cette réponse cardio-vasculaire est dose-dépendante. Une plus grande sensibilité à l'agoniste  $B_1$  est observée lorsque les injections i.t. sont effectuées 18 jours après le traitement à la STZ. Bien que le nombre d'animaux soit insuffisant pour des analyses statistiques, ces rats présentaient une glycémie augmentée et un poids diminué par rapport au jour 1 du traitement. Par apposition, les rats témoins répondent par de

petites élévations de PAM et une bradycardie dose-indépendante suite à l'injection i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK. Le poids des rats témoins a augmenté et la glycémie est demeurée stable. Ces résultats préliminaires suggèrent que le récepteur B<sub>1</sub> des kinines est induit dans la moelle épinière du rat diabétique et son activation entraîne une élévation de la pression sanguine et de la fréquence cardiaque. Le mécanisme d'action sous-jacent aux effets spinaux de l'agoniste B<sub>1</sub> demeure à être étudié. Il est possible qu'il soit relié à l'activation du système nerveux sympatho-surrénalien. Cette observation revêt un intérêt certain dans la compréhension de la pathologie du diabète et de l'hypertension artérielle, deux maladies intimement associées.

---

## **SOMMAIRE ET CONCLUSIONS**

---

Ce mémoire visait à mettre au point des modèles expérimentaux pour étudier l'action cardio-vasculaire centrale des kinines sur le récepteur B<sub>1</sub>.

Les points originaux à retenir sont les suivants:

1. L'utilisation de différents modèles d'inflammation périphérique, systémique et centrale chez le rat éveillé, n'a pas permis d'induire une réponse cardio-vasculaire relayée par l'activation centrale d'un récepteur B<sub>1</sub> des kinines. Ainsi, l'expression de ce récepteur dans les différents modèles utilisés serait limitée à la périphérie ou encore le récepteur B<sub>1</sub> n'est pas associé à la fonction cardio-vasculaire centrale.

2. Le modèle d'hyperthermie causée par l'injection i.c.v. de LPS a permis d'observer une perte fonctionnelle de la réponse pressive à la BK i.c.v. et des réponses cardio-vasculaires et comportementales à la SP i.c.v. 6 h après traitement au LPS. Bien que la nature de cette inhibition non spécifique qui affecte la composante sympathique et non parasympathique de la réponse cardio-vasculaire aux agonistes demeure encore à déterminer, elle ne serait pas liée aux prostaglandines, à l'action des kininases ou à la désensibilisation des récepteurs. La prochaine avenue à explorer demeure celle des cytokines.

3. L'injection i.c.v. d'un agoniste stable du récepteur B<sub>2</sub>, Phe<sup>8</sup>ψ(CH<sub>2</sub>NH)Arg<sup>9</sup>-BK, a permis de mettre en évidence une bradycardie prolongée d'origine parasympathique, non réflexe, et qui est difficilement mesurée avec la BK. Ce résultat nous a amené à suggérer deux sites d'action, l'un sympathique (effet presseur) et l'autre parasympathique (bradycardie) pour les kinines sur le récepteur B<sub>2</sub> dans le SNC.

4. Le modèle du rat diabétique obtenu avec un traitement à la streptozotocine a permis d'obtenir une réponse pressive et une tachycardie relayées par l'activation des récepteurs  $B_1$  des kinines dans la moelle épinière. Ceci constitue la première manifestation de la présence d'un récepteur  $B_1$  des kinines au niveau central chez des animaux où le récepteur  $B_1$  est présent en périphérie. Bien que la signification physiopathologique de cette observation demeure pour le moment inconnue, la présence de ce récepteur ouvre des nouvelles avenues de recherche dans l'élucidation des causes de cette maladie et des affections cardio-vasculaires sous-jacentes.

La réponse pressive et la tachycardie provoquées par l'injection i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK demeurent à être caractérisées par une approche pharmacologique au moyen d'antagonistes sélectifs pour les récepteurs  $B_1$  (Lys[Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK, Ac Lys[DβNal<sup>7</sup>,Ile<sup>8</sup> des-Arg<sup>9</sup>-BK) et  $B_2$  (HOE 140). Ces mêmes antagonistes pourront être infusés par voie i.v. et i.t. chez les rats témoins et diabétiques avec des minipompes ALZET dès le début du traitement à la STZ. Cette expérience permettrait d'évaluer l'implication du récepteur  $B_1$  central dans le développement du diabète.

La participation possible du système nerveux sympatho-surrénalien pourra être vérifiée par une approche pharmacologique en utilisant des inhibiteurs spécifiques contre les récepteurs  $\beta$ - et  $\alpha$ -adrénergiques, la 6-hydroxydopamine et la surrénalectomie.

---

Enfin la distribution neuroanatomique du récepteur  $B_1$  dans les différentes laminae de la moelle épinière pourra être évaluée par autoradiographie avec des antagonistes ou des agonistes marqués à l'iode 125. Les techniques

de microscopie optique, confocale et électronique pourront être utilisées dans des études immunocytochimiques afin de préciser la localisation du récepteur B<sub>1</sub> au niveau cellulaire (astrocytes, éléments neuronaux ou vaisseaux sanguins).

Le modèle d'hyperthermie causée par l'injection i.c.v. de LPS n'a pas permis d'induire une réponse cardio-vasculaire relayée par l'activation centrale d'un récepteur B<sub>1</sub> des kinines, mais a créé un lien entre les médiateurs de l'inflammation dont font partie les kinines et les mécanismes centraux de régulation cardio-vasculaire. Aussi, nous croyons que l'utilisation de l'agoniste stable du récepteur B<sub>2</sub>, Phe<sup>8</sup>ψ(CH<sub>2</sub>NH)Arg<sup>9</sup>-BK, peut devenir un outil pharmacologique très important dans la caractérisation des récepteurs des kinines dans le système nerveux central.

---

## Bibliographie

---



Abelous, J.E., Bardier, E., Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. CR. Soc. Biol. 66: 626-627, 1909.

Almeida e Silva, T.C., Pela, I.R., Changes in rectal temperature of the rabbit by intracerebroventricular injection of bradykinin and related kinins. Agents and Actions 8: 1-2, 1978.

Alvarez, A.L., Delorenzi, A., Santajuliana, D., Finkielman, S., Nahmod, V.E., Pirola, C.J., Central bradykininergic system in normotensive and hypertensive rats. Clinical. Science 82: 513-519, 1992.

Andersson, P.B., Perry, V.H., Gordon, S., The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues. Neuroscience 48: 169-186, 1992.

Andrade, S.O., Rocha e Silva, M., Purification of bradykinin by ion exchange chromatography. Biochem. J. 64: 701-705, 1956.

Banati, R.B., Gehrman, J., Schubert, P., Kreutzberg, G.W., Cytotoxicity of microglia. Glia 7: 111-118, 1993.

Bascands, J.L., Pecker, C., Rouand, S., Emond, C., Leung-Tack, J., Bastie, M.J., Burch, R., Regoli, D., Girolami, J.P., Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells. Am. J. Physiol. 264: F548-F556, 1993.

Bascands, J.L., Girolami, J.P., La bradykinine. *Médecine sciences* 12(5): 582-592, 1996.

Bhoola K. D., Figueroa C. D., Worthy K., Bioregulation of kinins: Kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* 44: 1-80, 1992.

Brass, K.M., Mannign, D.C., Perry, D.C., Snyder, S.H., Bradykinin analogues: differential agonist and antagonist activities suggesting multiple receptors. *Br. J. Pharmacol.* 94: 3-5, 1988.

Brooks, D.P., Share, L., Crofton, J.T., Nasjletti, A., Interrelationship between central bradykinin and vasopressin in conscious rats. *Brain res.* 371: 42-48, 1986.

Burch, R.M., Kniss, D.A., Modulation of receptor-mediated signal transduction by diacylglycerol mimetics in astrocytes. *Cell. Molec. Neurobiol.* 8: 251-257, 1988.

Burch, R.M., Tiffany, C.W., Tumor necrosis factor causes amplification of arachidonic acid metabolism in response to interleukin1, bradykinin, and other agonists. *J. Cell. Physiol.* 141: 85-89, 1989.

Burch, R.M., Kyle, D.J., Storman, N., Molecular biology and pharmacology of bradykinin receptors. Molecular biology intelligence unit. Austin: RG Landes Company, 107, 1995.

Camargo, A.C., Shapanka, R., Greene, L.J., Preparation, assay, and partial characterization of a neutral endopeptidase from rabbit brain. *Biochemistry* 12: 1838-1844, 1973.

Camargo, A.C.M., Ravalho-Pinto, F.J., Greene, L.J., Brain peptidase: conversion and inactivation of kinin hormones. *J. Neurochem.* 19: 37-49, 1972.

Campos, M.M., Souza, G.E.P., Calixto, J.B., Upregulation of B<sub>1</sub> receptor mediating des-Arg<sup>9</sup>BK-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin. *Br. J. Pharmacol.* 117: 793-798, 1996.

Chakir, M., D'Orléans-Juste, P., Plante, G.E., Neutral endopeptidase inhibition, a new approach in the exploration of diabetic vasculopathy in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 285: 11-18, 1995a.

Chakir, M., Regoli, D., Sirois, P., Gobeil, F., Plante, G.E., Hypersensibilité du récepteur B<sub>1</sub> de la bradykinine au niveau de la veine porte de rat spontanément hypertendu (SHR). *Médecine/Sciences.* 12: 12, 1995b.

Chao, J., Chao, L., Swain, C.C., Tsai, J., Margolius, H.S., Tissue kallikrein in rat brain and pituitary: regional distribution and estrogen induction in the anterior pituitary. *Endocrinology* 120: 475-482, 1987.

---

Cholewinski, A.J., Wilkin, G.P., Astrocytes from forebrain, cerebellum, and spinal cord differ in their responses to vasoactive intestinal peptide. *J. Neurochem.* 51: 1626-1633, 1988.

Cholewinski, A.J., Stevens, G., McDermott, A.M., Wilkin, G.P., Identification of B<sub>2</sub> bradykinin binding sites on cultured cortical astrocytes. *J. Neurochem.* 57: 1456-1458, 1991.

Coelho, M.M., Oliveira, C.R., Pajolla, G.P., Calixto, J.B., Pela, I.R., Central involvement of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats. *Br. J. Pharmacol.* 121: 296-302, 1997.

Corrêa, F.M.A., Graeff, F.G., Central mechanisms of the hypertensive action of intraventricular bradykinin in the unanesthetized rat. *Neuropharmacology* 13: 65-75, 1974.

Corrêa, F.M.A., Graeff, F.G., Central site of the hypertensive action of bradykinin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 192(3): 670-676, 1975.

Corrêa, F.M., Graeff, F.G., On the mechanism of the hypertensive action of intraseptal bradykinin in the rat. *Neuropharmacology* 15: 713-717, 1976.

Corrêa, F.M.A., Innis, R.B., Uhl, G.R., Snyder, S.H., Bradykinin-like immunoreactive neuronal systems localized histochemically in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73(3): 1489-1493, 1979.

---

Cushman, M.W., Cheung, M.S., Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochem. Biophys. Acta* 250: 261-265, 1971.

Davis, A.J., Perkins, M.N., Induction of B<sub>1</sub> receptors in vivo in a model of persistent inflammatory mechanical hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacol.* 33: 127-133, 1994.

Décarie, A., Drapeau, G., Glosset, J., Couture, R., Adam, A., Development of digoxigenin-labeled peptide: Application to chemiluminoenzyme immunoassay of bradykinin in inflamed tissues. *Peptides* 15(3): 511-518, 1994.

Décarie, A., Adam, A., Couture, R., Effects of Captopril and Icatibant on Bradykinin (BK) and des [Arg<sup>9</sup>] BK in Carrageenan-Induced Edema. *Peptides* 17(6): 1009-1015, 1996a.

Décarie, A., Raymond, P., Gervais, N., Couture, R., Serum interspecies differences in the metabolic pathways of bradykinin and des[Arg<sup>9</sup>]BK: Influence of enalaprilat. *Am. J. Physiol.* 271 (4 PT2): H1340-1347, 1996b.

Devillier, P., Drapeau, G., Renoux, M., Regoli, D., Role of the N-terminal arginine in the histamine-releasing activity of substance P, bradykinin and related peptides. *Eur. J. Pharmacol.* 168: 53-60, 1989.

Diz, D.I., Jacobowitz, D.M., Cardiovascular effects of discrete intrahypothalamic and preoptic injections of bradykinin. *Brain Res. Bull.* 12: 409-417, 1984.

Dohlmann, H. G., Thorner, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 653-688, 1991.

Dray, A., Bettaney, J., Forster, P., Perkins, M.N., Activation of bradykinin receptor in peripheral nerve and spinal cord in the neonatal rat in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 95: 1008-1010, 1988.

Dray, A., Perkins, M., Bradykinin and inflammatory pain. *Neurosci.* 16: 99-104, 1993.

Elliot, D.F., Lewis, G.P., Horton, E.W., The isolation of bradykinin. A plasma kinin from ox blood. *Biochem. J.* 74: 15P, 1959.

Elliot, D.F. The discovery and characterization of bradykinin. *Handb. Exp. Pharmacol.* 25: 7-13, 1970.

Ellis, E.F., Holt, S.A., Wei, E.P., Kontos, H.A., Kinins induce abnormal vascular reactivity. *Am. J. Physiol.* 255 (Heart Circ. Physiol. 24): H397-H400, 1988.

Elrod, K., Okamoto, H., Greenbaum, L.M., Buccafusco, J.J., Inactivation of kallikrein and kininases and stabilization of whole rat brain kinin levels following focused microwave irradiation. *Neurochem. Res.* 11: 1463-1471, 1986.

Erdös, E.G., Yang, H.Y.T., An enzyme in microsomal fraction of kidney that inactivates bradykinin. *Life Science* 6: 569-574, 1967.

Erdös, E.G., Skidgel, R.A., The unusual substrate specificity and the distribution of human angiotensin I converting enzyme. *Hypertension* 8 (Suppl. 1): I34-I37, 1986.

Farmer, S.G., Burch, R.M., Meeker, S.A., Wilkins, D.E., Evidence for a pulmonary B<sub>3</sub> pulmonary receptor. *Mol. Pharmacol.* 36: 1-8, 1989.

Fior, D.R., Martins, D.T.O., Lindsey, C.J., Central kinin receptors in the spontaneously hypertensive rat and pressor response to bradykinin. *Hypertension* 218: 117-119, 1992.

Fitzgerald, M., Capsaicin and sensory neurones: a review. *Pain* 15: 109-130, 1983.

Fritz, H., Wunderer, G., Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneimittel- Forschung.* 33: 479-494, 1983.

Fujiwara, Y., Mantione, R.C., Yamamura, H., Identification of B<sub>2</sub> bradykinin binding sites in guinea-pig brain. *Eur. J. Pharmacol.* 147: 487-488, 1988.

---

Fujiwara, Y., Mantion, C.R., Vavrek, R.J., Stewart, J.M., Yamamura, H.I., Characterization of [<sup>3</sup>H]Bradykinin binding sites in guinea-pig central nervous system: possible existence of B<sub>2</sub> subtypes. *Life Science* 44: 1645-1653, 1989.

Geppetti, P., Tramontana, M., Santicioli, P., Del Bianca, E., Giuliani, S., Maggi, C.A., Bradykinin-induced release of calcitonin gene-related peptide from capsaicin-sensitive nerves in guinea-pig atria: mechanism of action and calcium requirements. *Neuroscience* 38: 687-692, 1990.

Germain, L., Barabe, J., Galeano, C., Blood levels of kinins in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 13: 135-142, 1986.

Germain, L., Barabe, J., Galeano, C., Increased blood concentration of des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neurol. Sci.* 83: 211-217, 1988.

Germany, A., Gonzalez, P., Contreras, E., Possible role of nitric oxide in the antinociceptive action of intraventricular bradykinin in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 310: 123-127, 1996.

Gimpl, G., Walz, W., Ohlemeyer, C., Kettenmann, H., Bradykinin receptors in cultured astrocytes from neonatal rat brain are linked to physiological responses. *Neurosci. Lett.* 144: 139-142, 1992.

---



Gispen, W.H., Wiegant, V.M., Greven, H.M., De Wied, D., The induction of excessive grooming in the rat by intraventricular application of peptides derived from ACTH: structure-activity studies. *Life Sci.* 17: 645-652, 1975.

Graeff, F.G., Pela, I.R., Rocha e Silva, M., Behavioural and somatic effects of bradykinin injected into the cerebral ventricles of unanesthetized rabbits. *Br. J. Pharmacol.* 37: 723-732, 1969.

Green, P., Luo, J., Heller, P., Levine, J.D., Modulation of bradykinin induced-plasma extravasation in the knee joint by sympathetic co-transmitters. *Neuroscience* 52: 451-458, 1992.

Hall, J.M., Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmac. Ther.* 56: 131-190, 1992.

Handwerker, H.O., Reeh, P.W., Pain and inflammation. Bond, M.R., Charlton, J.E. & Woolf, C.J. ed., In proceedings of the Vith World Congress on Pain, Elsevier Science Publishers BV., 1991.

Hargreaves, K.M., Troullos, E.S., Dionne, R.A., Schmidt, E.A., Schafer, S.C., Joris, J.L., Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: Therapeutic implications. *Clin. Pharmacol. Ther.* 44: 613-621, 1988.

---

Harris, M.C., Release of antidiuretic substance by bradykinin in the rat. *J. Physiol. (London)* 219: 403-419, 1971.

Heapy, C. G., Farmer, S.C., Shaw, J.S., The inhibitory effect of HOE 140 in mouse abdominal constriction assays. *Br. J. Pharmacol.* 104: 455P, 1991.

Hess, J.F., Borkowski, J.A., Young, G.S., Strader, C.D., Ransom, R.W., Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 260-268, 1992.

Hoffman, W.E., Schmid, P.G., Separation of pressor and antidiuretic effects of intraventricular bradykinin. *Neuropharmacology* 17: 999-1002, 1978.

Hori, S., The presence of bradykinin-like polypeptides, kinin-releasing and destroying activity in brain. *Jap. J. physiol.* 18: 773-787, 1968.

Hosli, L., Hosli, E., Kaeser, H., Lefkovits, M., Colocalization of receptors for vasoactive peptides on astrocytes of cultured rat spinal cord and brain stem: electrophysiological effects of atrial and brain natriuretic peptide, neuropeptide Y and bradykinin. *Neurosci. Lett.* 148: 114-116, 1992.

Inamura, N., Asano, M., Kayakiri, H., Hatori, C., Oku, T., Nakahara, K., Characterization of FR173657, a novel nonpeptide B<sub>2</sub> antagonist: in vitro and in vivo studies. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 622-628, 1997.

Innis, R.B., Manning, D.C., Stewart, J.M., Snyder, S.H., [<sup>3</sup>H]Bradykinin receptor binding in mammalian tissue membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 2630-2634, 1981.

Inouye, A., Kataoka, K., Tsujioka, T., On a kinin-like substance in the nervous tissue extracts treated with trypsin. *Jap. J. Physiol.* 11: 319-334, 1961.

Ishizaka, T., Iwata, M., Ishizaka, K., Release of histamine and arachidonate from mouse mast cells induced by glycosylation-enhancing factor and bradykinin. *J. Immunol.* 134: 1880-1887, 1985.

Kamiya, T., Katayama, Y., Shimizu, J., Soeda, T., Nagazumi, A., Terashi, A., Studies on relation of bradykinin to ischemic brain edema in stroke-resistant spontaneously hypertensive rat. *Adv. Neurol.* 52: 543, 1990.

Kariya, K., Iwaki, H., Kanemaru, T., Tsuda, Y., Okada, Y., A highly sensitive fluorometric assay of bradykinin and its fragments released by a kininase. *Anal. Biochem.* 115: 46-51, 1981a.

Kariya, K., Kawauchi, R., Okamoto, H., Regional distribution of kininase in rat brain. *J. Neurochem.* 36: 2086-2088, 1981b.

Kariya, K., Yamauchi, A., Chatani, Y., Relationship between central actions of bradykinin and prostaglandins in the conscious rat. *Neuropharmacology* 21: 267-272, 1982.

Kariya, K., Yamauchi, A., Sasaki, T., Regional distribution and characterization of kinins in the CNS of rat. *J. Neurochem.* 44(6): 1892-1897, 1985.

Kay, A.B., Kaplan, A.P., Chemotaxis and haemostasis. *Br. J. Haematol.* 31: 417-422, 1975.

Kitagawa, A., Kizuki, K., Moriya, H., Kudo, M., Noguchi, T., Localization of kallikrein in rat pineal gland. *Endocrinology* 38: 109-112, 1991.

Kolb-Bachofen, V., Epstein, S., Kiesel, J., Kolb, H., Low dose streptozotocine-induced diabetes in mice. Electron microscopy reveals single cell insulinitis before diabetes onset. *Diabetes* 37: 21-27, 1988.

Kondo, K., Okuno, T., Konishi, K., Satura, T., Kato, E., Central and peripheral effects of bradykinin and prostaglandin E<sub>2</sub> on blood pressure in conscious rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 308: 111-115, 1979.

Kraut, H., Frey, E.K., Werle, E. Der nachweis eines krieslaufhormons in der pankreasdruse. *Hoppw-Seyler's Z. physiol. Chem.* 189: 97-106, 1930.

Lagneux, C., Ribuoat, C., In vivo evidence for B<sub>1</sub>-receptor synthesis induction by heat stress in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 121: 1045-1046, 1997.

Lambert, G.A., Lang, W.J., The effects of bradykinin and eledoisin injected into the cerebral ventricles of conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.* 9: 383-386, 1970.

---

Laneuville, O., Couture, R., Bradykinin analogue blocks bradykinin-induced inhibition of a spinal nociceptive reflex in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 137: 281-285, 1987.

Laneuville, O., Reader, T., Couture, R., Intrathecal bradykinin acts presynaptically on spinal noradrenergic terminals to produce antinociception in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 159: 273-283, 1989.

Lang, E., Novak, A., Reeh, P.W., Handwerker, H.O., Chemosensitivity of fine afferents from rat skin in vitro. *J. Neurophysiology.* 63: 887-901, 1990.

Lang, W.J., Pearson, L., Studies on the pressor responses produced by bradykinin and kallidin. *Br. J. Pharmacol.* 32: 330-338, 1968.

Lewis, R., Childers, S.R., Phillips, M.L., [<sup>125</sup>I]Tyr-Bradykinin binding in primary rat brain cultures. *Brain Res.* 346: 263-272, 1985.

Lewis, R.E., Phillips, M.I., Localization of the central pressor action of bradykinin to the cerebral third ventricle. *Am. J. Physiol.* 247: R63-R68, 1984.

Lin, W-W., Chuang, D.M., Regulation of bradykinin-induced phosphoinositide turnover in cultured cerebellar astrocytes: possible role of protein kinase C. *Neurochem. Int.* 21: 573-579, 1992.

Lindsey, C.J., Fukita, K., Martins, D.T.O., The central pressor effect of bradykinin in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 2: 126-129, 1988.

---

Lindsey, C.J., Nakaie, C.R., Martins, D.T.O., Central nervous system kinin receptors and the hypertensive response mediated by bradykinin. *Br. J. Pharmacol.* 97: 763-768, 1989.

Liu, S.H., Sheu, T.J., Lin, R.H., Lin-Shiau, S.Y., The *in vivo* effect of lipopolysaccharide on the spontaneous release of transmitter from motor nerve terminals. *Br. J. Pharmacol.* 116: 1757-1760, 1995.

Llona, I., Vavrek, R.J., Stewart, J.M., Huidobro-Toro, J.P., Identification of pre- and postsynaptic bradykinin receptor sites in the vas deferens: evidence for different structural prerequisites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 608-614, 1987.

Lopes, P., Couture, R., Cardiovascular responses elicited by intrathecal kinins in the conscious rat. *Eur. J. Pharmacol.* 210: 137-147, 1992.

Lopes, P., Kar, S., Tousignant, C., Regoli, D., Quirion, R., Couture, R., Autoradiographic localization of [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>8</sup>]-Bradykinin receptor binding sites in the guinea pig spinal cord. *Synapse* 15: 48-57, 1993a.

Lopes, P., Regoli, D., Couture, R., Cardiovascular effects of intrathecally administered bradykinin in the rat: characterization of receptors with antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 110: 1369-1374, 1993b.

---

Lopes, P., Kar, S., Chrétien, L., Regoli, D., Quirion, R., Couture, R., Quantitative autoradiographic localization of [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>8</sup>]Bradykinin receptor binding sites in the rat spinal cord: effects of neonatal capsaicin, noradrenergic deafferentation, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. *Neuroscience* 68(3): 867-881, 1995.

Lopes, P., Couture, R., Localization of bradykinin-like immunoreactivity in the rat spinal cord: effect of capsaicin, melittin, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. *Neuroscience* 78(2): 481-497, 1997.

Lortie, M., Regoli, D., Rhaleb, N-E., Plante, G,E., The role of B<sub>1</sub>- and B<sub>2</sub>-kinin receptors in the renal tubular and hemodynamic response to bradykinin. *Am. J. Physiol.* 262: R72-R76, 1992.

Loubaris, N., Cros, G., Serrano, J.J., Boucard, M., Circadian and circannual variation of the carrageenin inflammatory effect in rat. *Life Sci.* 32: 1349-1354, 1983.

Luheshi, G., Hopkins, S.J., Lefevre, R.A., Dascombe, M.J., Ghiara, P., Rothwell, N.J., Importance of brain IL-1 type II receptors in hyperthermia and thermogenesis in the rat. *Am. J. Physiol.* 265: E585-E591, 1993.

Macfarlane, R., Moskowitz, M.A., Sakas, D.E., Tasdemirogly, E., Wei, E.P., Kontos, H.A., The role of neuroeffector mechanisms in cerebral hyperfusion syndromes. *J. Neurosurg.* 75: 845-855, 1991.

Madeddu, P., Glorioso, G., Soto, S., Tonolo, G., Manunta, P., Troffa, C., Demontis, M.P., Varoni, M.V., Anania, V., Brain kinins are responsible for the pressor effect of intracerebroventricular captopril in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 15(5): 407-412, 1990.

Madeddu, P., Parpaglia, P.P., Glorioso, N., Chao, L., Chao, J., Antisense inhibition of the brain kallikrein-kinin system. *Hypertension* 28: 980-987, 1996.

Maier-Hauff, K., Baethmann, A.J., Lange, M., Schurer, L., Unterberg, A., The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. part 2: studies on kinin formation in focal and perifocal brain tissue. *J. Neurosurg.* 61: 97-106, 1984a.

Manning, D.C., Snyder, S.H., [<sup>3</sup>H]Bradykinin receptor localization in spinal cord and sensory ganglia- evidence for a role in primary afferent function. *Soc. Neurosci. Abstr.* 9: 590, 1983.

Manning, D.C., Raja, S.N., Meyer, R.A., Campbell, J.N., Pain and hyperalgesia after intradermal injection of bradykinin in humans. *Clin. Pharmacol. & Ther.* 50(6): 721-729, 1991.

Marceau, F., Lussier, A., St-Pierre, S., Selective induction of cardiovascular responses to des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin by bacterial endotoxin. *Pharmacology* 29: 70-74, 1984.



Martins, D.T.O., Fior, D.R., Nakaie, C.R., Lindsey, C.J., Bradykinin receptors of the central nervous system of spontaneously hypertensive rats related to the pressor response to bradykinin. *Br. J. Pharmacol.* 103: 1851-1856, 1991.

McEachern, A.E., Shelton, E.R., Bhakta, S., Obernolte, R., Bach, C., Zuppan, P., Fujisaki, J., Aldrich, R.W., Jarnagin, K., Expression cloning of a rat B<sub>2</sub> bradykinin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7724-7728, 1991.

McFadden, R.G., Vickers, K.E., Bradykinin augments the in vitro migration of nonsensitized lymphocytes. *Clin. Invest. Med.* 12: 247-253, 1989.

McGiff, J.C., Itskovitz, H.D., Terragno, A., Wong, P.Y-K., Modulation and mediation of the action of the renal kallikrein-kinin system by prostaglandins. *Fed. Proc.* 35: 175-180, 1976.

Menke, J.G., Borkowski, J.A., Bierilo, K.K., MacNeil, T., Derrick, A.W., Schneck, K.A., Ramson, R.W., Strader, C.D., Linemeyer, D.L., Hess, J.F., Expression cloning of a human B<sub>1</sub> bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.* 269(34): 21583-21586, 1994.

Mense, S., Meyer, H., Bradykinin-induced modulation of the response behaviour of different types of feline group III and IV muscle receptors. *J. Physiol.* 398: 49-63, 1988.

---

Milton, A.S., Wendlant, S., A possible role of prostaglandine E<sub>1</sub> as a modulator for temperature regulation in the central nervous system of the cat. *J. Physiol.* 207: 76-77P, 1970.

Mohan Rao, P.J.R., Bhattacharya, S.K., Hyperthermic effect of centrally administered bradykinin in the rat: role of prostaglandins and serotonin. *Int. J. Hyperthermia* 4(2): 183-189, 1988.

Mombouli, J.V., Vanhoute, P.M., Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 679-705, 1995.

Nakhostine, N., Ribouot, C., Lamontagne, D., Nadeau, R., Couture, R., Mediation by B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors of vasodepressor responses to intravenously administered kinins in anaesthetized dogs. *Br. J. Pharmacol.* 110: 71-76, 1993.

Nakanishi, S., Substance P Precursor and Kininogen: Their Structure, Gene Organizations, and Regulation. *Am. J. Physiol.* 67(4): 1117-1142, 1987.

Nicolau, M., Feltrin, R.M., Regoli, D., Induction of bradykinin B<sub>1</sub> hypotensive receptors in rats by lipopolysaccharide. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 337-340, 1996.

Nsa Allogho, S., Gobeil, F., Pheng, L.H., Nguyen-le, X.K., Neugebauer, W., Regoli, D., Kinin B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> receptors in the mouse. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 1759-1764, 1995.

---

O'Dowd, B.F., Hnatowich, M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Bouvier, M., Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J. Biol. Chem.* 264: 7564-7569, 1989.

Orawski, A.T., Simmons, W.H., Degradation of bradykinin and its metabolites by rat brain synaptic membranes. *Peptides* 10: 1063-1073, 1989.

Pan, H.-L., Stebbins, C.L., Longhurst, J.C., Bradykinin contributes to the exercise pressor reflex: mechanism of action. *J. Appl. Physiol.* 75: 2061-2068, 1993.

Pearson, L., Lang, W.J., Centrally mediated cardiovascular and EEG responses to bradykinin and eledoisin. *Eur. J. Pharmacol.* 8: 153-158, 1969.

Pela, I.R., Rosa, A.L., Silva, C.A.A., Huidobro-Toro, J.P., Central B<sub>2</sub> receptor involvement in the antinociceptive effect of bradykinin in rats. *Br. J. Pharmacol.* 118: 1488-1492, 1996.

Pela, R.R., Gardey-Levassort, G., Lechat, P., Rocha E silva, M., Brain kinins and fever induced by bacterial pyrogens in rabbits. *J. Pharm. Pharmacol.* 27: 793-794, 1975.

---

Perkins, M.N., Campbell, E.A., Davis, A., Antinociceptive activity of bradykinin B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> antagonists in two models of persistent hyperalgesia in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 107: 237P, 1992.

Perkins, M.N., Kelly, D., Induction of bradykinin B<sub>1</sub> receptors *in vitro* in a model ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat. Br. J. Pharmacol. 110: 1441-1444, 1993.

Perry, D.C., Snyder, S.H., Identification of bradykinin in mammalian brain. J. Neurochem. 43(4): 1072-1080, 1984.

Perry, V.H., Andersson P-B., Gordon, S., Macrophages and inflammation in the central nervous system. Trends. Neurosci. 16: 268-273, 1993.

Pheng, L.H., Nguyen-Le, S., Nsa Allogho, S., Gobeil, F., Regoli, D., Kinin receptors in the diabetic mouse. Can. J. Pharmacol. 75: 609-611, 1997.

Picard, P., Regoli, D., Couture, R., Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered tachykinins in the rat: characterization of receptors with selective antagonists. Br. J. Pharmacol. 112: 240-249, 1994.

Pirola, C.J., Scheucher, A., Balda, M.S., Dabsys, S.M., Finkelman, S., Nahmod, V.E., Serotonin mediates cardiovascular response to acetylcholine, bradykinin, angiotensin II and norepinephrine in the lateral septal area of the rat brain. Neuropharmacology 26: 561-566, 1987.

Plevin, R., Owen, P.J., Multiple B<sub>2</sub> kinin receptors in mammalian tissues. Trends. Pharmac. Sci. 9: 387-389, 1988.

Poth, M.M., Heath, R.G., Ward, M., Angiotensin converting enzyme in human brain. J. Neurochem. 25: 83-85, 1975.

Powers, C.A., Nasjletti, A., A kininogenase resembling glandular kallikrein in the rat pituitary pars intermedia. *Endocrinology* 112: 1194-1200, 1983.

Powers, C.A., Nasjletti, A., A major sex difference in kallikrein-like activity in the rat anterior pituitary. *Endocrinology* 114: 1841-1844, 1984.

Privitera, P.J., Daum, P.R., Hill, D.R., Hiley, C.R., Autoradiographic visualisation and characteristics of [<sup>125</sup>I]bradykinin binding sites in guinea pig brain. *Brain Res.* 577: 73-79, 1992.

Privitera, P.J., Beckstead, R.M., Yates, P., Autoradiographic binding sites in the rat brain stem. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72 (Suppl.1): 125, 1994.

Privitera, P.J., Yates, P., Hypertensive effect of tissue kallikrein in rostral ventrolateral medulla is mediated by brain kinins. *Brain Res.* 704: 103-106, 1995.

Rangachari, P.K., Berezin, M., Prior, T., Effects of bradykinin on the canine proximal colon. *Regul. Peptides* 46: 511-522, 1993.

Raymond, P., Décarie, A., Lantin, F., Raut, R., Morais, R., Couture, R., Adam, A., A role for B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the modulation of T-kininogen during the acute phase response of inflammation. *Peptides* 17(7): 1163-1170, 1996.

Regoli, D., Barabé, J., Park, W.K., Receptors for bradykinin in rabbit aorta. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55: 855-867, 1977.

Regoli, D., Marceau, F., Barabé, J., *De novo* formation of vascular receptor for bradykinin. *Can. J. Physiol. Pharmacol* 56: 674-677, 1978.

Regoli, D., Barabé, J., Pharmacology of bradykinin and related kinin. *Pharmacol. Rev.* 32: 1-46, 1980.

Regoli, D., Marceau, F., Lavigne, J., Induction of B<sub>1</sub> receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. *Eur. J. Pharmacol.* 71: 105-115, 1981.

Regoli, D., Drapeau, G., Rovero, P., Dion, S., Rhaleb, N.D., Barabe, J., D'Orleans-Juste, P., Ward, P., Conversion of kinins and their antagonists into B<sub>1</sub> receptor activators and blockers in isolated vessels. *Eur. J. Pharmacol.* 17: 219-224, 1986.

Regoli, D., Rhaleb, N.-E., Drapeau, G., Dion, S., Kinin receptor subtypes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15(6): S30-S38, 1990a.

Regoli, D., Rhaleb, N.-E., Dion, S., Drapeau, G., New selective bradykinin receptor antagonists and bradykinin B<sub>2</sub> receptor characterization. *Trends. Pharmacol. Sci.* 11: 156-161, 1990b.

---

Regoli, D., Jukic, D., Gobeil, F., Rhaleb, N.-E., Receptor for bradykinin and related kinins: a critical analysis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 556-567, 1993.

Regoli, D., Gobeil, F., Nguyen, Q.T., Jukic, D., Seoane, P.R., Salvino, J.M., Sawutz, D.G., Bradykinin receptor types and B<sub>2</sub> subtypes. *Life Sciences* 55(10): 735-749, 1994.

Rhaleb, N.-E., Dion, S., D'Orléans-Juste, P., Drapeau, G., Regoli, D., Browne, R.G., Bradykinin antagonism: differentiation between peptide antagonists and anti-inflammatory agents. *Eur. J. Pharmacol.* 151: 275-279, 1988.

Rhaleb, N.-E., Dion, S., Barabé, J., Rouissi, N., Jukic, D., Drapeau, G., Regoli, D., Receptors for kinins in isolated arterial vessels of dogs. *Eur. J. Pharmacol.* 162: 419-427, 1989.

Rhaleb, N.-E., Télémaque, S., Rouissi, N., Dion, S., Jukic, D., Drapeau, G., Regoli, D., Structure-activity studies of bradykinin and related peptides. B<sub>2</sub> antagonists. *Hypertension (Dallas)* 17: 107-115, 1991.

Ribeiro, S.A., Corrado, A.P., Graeff, F.G., Antinociceptive action of intraventricular bradykinin. *Neuropharmacology* 10: 725-731, 1971.

Ribeiro, S.A., Rocha e Silva, M., Antinociceptive action of bradykinin and related kinins of larger molecular weights by the intraventricular route. *Br. J. Pharmacol.* 47: 517-528, 1973.

---

Richie, T., Cole, R., Kim, H.S., De Vellis, J., Noble, E.P., Inositol phospholipid hydrolysis in cultured astrocytes and oligodendrocytes. *Life Sci.* 41: 31-39, 1987.

Richoux, J.P., Gelly, J.L., Bouhnik, J., Baussant, T., AlhencGelas, F., Grignon, G., Corvol, P., The kallikrein-kinin system in the rat hypothalamus. Immuno-histochemical localization of high molecular weight kininogen and T-kininogen in different neuronal systems. *Histochemistry* 96: 229-243, 1991.

Rifo, J., Pourrat, M., Vavrek, R.J., Stewart, J.M., Huidobro-Toro, J.P., Bradykinin receptor antagonists used to characterize the heterogeneity of bradykinin-induced responses in rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 142: 305-312, 1987.

Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T., Roselfeld, G., Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulation factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* 156: 261-273, 1949.

Rocha e Silva, M. Bradykinin: occurrence and property. *Polypeptides which stimulate plain muscle*, J.H. Gaddum (ed.) Livingstone, Edinburgh. : 45-57, 1955.

Rocha e Silva, M., Malnic, G., Release of antidiuretic hormone by bradykinin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 146: 24-32, 1964.

Roth, M., Weitzman, A.F., Piquilloud, Y., Converting enzyme content of different tissues of the rat. *Experientia* 25: 1247, 1969.

Rothwell, N.J., CNS regulation of thermogenesis. *Crit. Rev. Neurobiol.* 8: 1-10, 1994.



Rothwell, N.J., Hopkins, S.J., Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci.* 18: 130-136, 1995.

Saha, J.K., Sengupta, J.N., Goyal, R.K., Effects of bradykinin on opossum esophageal longitudinal smooth muscle: evidence for novel bradykinin receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252: 1012-1020, 1990.

Saha, J.K., Sengupta, J.N., Goyal, R.K., Effects of bradykinin and bradykinin analogs on the opossum lower esophageal sphincter: characterization of an inhibitory bradykinin receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 265-273, 1991.

Saria, A., Martling, C.R., Yan, Z., Theodorsson-Norheim, E., Gamse, R., Lundberg, J.M., Release of multiple tachykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin, histamine, dimethylphenyl piperazinium and vagal nerve stimulation. *Am. Rev. Resp. Dis.* 137: 1330-1335, 1988.

Schwartz, J.C., Malfroy, B., La Baume, S.D., Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxypeptidase ("enkephalinase") as neuropeptidase. *Life Sci.* 29: 1715-1740, 1981.

Scicli, A.G., Forbes, G., Nolly, H., Dujouny, M., Carretero, O.A., Kallikrein-kinins in the central nervous system. *Clin. Exp. Hypertens.* A6: 1731-1738, 1984.

Sharif, N.A., Whiting, R.L., Identification of B<sub>2</sub>-bradykinin receptors in guinea pig brain regions, spinal cord and peripheral tissues. *Neurochem. Int.* 18: 89-96, 1991.

Shearman, M.S., Naor, Z., Sekiguchi, K., Kishimoto, A., Nishizuka, Y., Selective activation of the gamma-subspecies of protein kinase C from bovine cerebellum by arachidonic acid and its lipoxygenase metabolites. *FEBS. Lett.* 243(2): 177-182, 1989.

Shikimi, T., Kema, R., Matsumoto, M., Yamhata, Y., Miyata, S., Studies on kinin-like substances in brain. *Biochemical Pharmacology* 22: 567-573, 1973.

Sicuteri, F., Sensitization of nociceptors by 5-hydroxytryptamine in man. In: *Proc. 3rd. Int. Pharmac. meeting, Pharmacology of Pain*, Lim, R.K.S., Armstrong, D., Pardo, E.G. (eds.), Pergamon Press. Oxford. 9: 57-86, 1968.

Sicuteri, F., Bradykinin and intracranial circulation in man. In: *Handbook of Experimental pharmacology*, Erdös, E.G. (Eds.), Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, N.Y. 25: 483-515, 1970.

Silva e Almeida, T.C., Pela, I.R., Changes in rectal temperature of the rabbit by intracerebroventricular injection of bradykinin and related kinins. *Agents and Actions* 8: 1-2, 1978.

Smith, J.A., Webb, C., Holford, J., Burgess, G.M., Signal transduction pathways for B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* 47: 525-534, 1995.

Snider, R.M., Richelson, E., Bradykinin receptor-mediated cyclic GMP formation in a nerve cell population (murine neuroblastoma clone N1E-115). *J. Neurochem.* 43: 1749-1755, 1984.

Stebbins, C.-L., Bonigut, S., Endogenous bradykinin in the thoracic spinal cord contributes to the exercise pressor reflex. *J. Appl. Physiol.* 81(3): 1288-1294, 1996.

Stephens, G.J., Marriott, D.R., Djamgoz, D.B.A., Wilkin, G.P., Electrophysiological and biochemical evidence for bradykinin receptors on cultured rat cortical oligodendrocytes. *Neurosci. Lett.* 153: 223-226, 1993.

Steranka, L.R., Manning, D.C., De Haas, C.J., Ferkany, J.W., Borosky, S.A., Connor, J.R., Stewart, J.M., Snyder, S.H., Bradykinin as pain mediator: receptors are localized to sensory neurons and antagonists have analgesic actions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 3245-3249, 1988.

Stewart, J.M., Bradykinin antagonists: development and applications. *Biopolymers (Peptide science)* 137: 143-155, 1995.

Stitt, J.T., Fever in rabbits. *J. Physiol.* 232: 163-179, 1973.

---

Sueyoshi, T., Miyata, T., Hashimoto, N., Kato., Hayashida, H., Miyata, T., Iwanaga, S., Bovine high molecular weight kininogens. *J. Biol. Chem.* 262: 2768-2779, 1987.

Takagaki, Y., Kitamura, N., Nakanishi, S., Cloning and sequence analysis of cDNAs for human high molecular weight and low molecular weight prekininogens. *J. Biol. Chem.* 260 (14) : 8601-8609, 1985.

Takano, Y., Nagashima, A., Hagio, T., Tateishi, K., Kamiya, H.O., Role of central tachykinin peptides in cardiovascular regulation in rats. *Brain Res.* 528: 231-237, 1990.

Thomas, G.R., Thibodeaux, H., Margolius, H.S., Privitera, P., Cerebrospinal fluid kinins and cardiovascular function: effects of cerebroventricular melittin. *Hypertension* 6(2): I46-I50, 1984.

Thomas, G.R., Thibodeaux, H., Margolius, H.S., Webb, J.G., Privitera, P.J., Afferent vagal stimulation: vasopressin and nitroprusside alter cerebrospinal fluid kinin. *Am. J. Physiol.* 253: 136-141, 1987.

Thomas, G.R., Hiley, C.R., Cardiovascular effects of intracerebro-ventricular bradykinin and melittin in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 40: 721-723, 1988.

Tiffany, C.W., Burch, R.M., Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett.* 247: 189-192, 1989.

Tokumasu, T., Ueno, A., Oh-ishi, S., 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, 1995.

Ueno, A., Ishida, H., Oh-ishi, S., Comparative study of endotoxin-induced hypotension in kininogen-deficient rats with that in normal rats. *Br. J. Pharmacol.* 114: 1250-1256, 1995.

Unger, Th., Rascher, W., Schuster, C., Pavlovitch, R., Schömig, A., Dietz, R., Ganten, D., Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II: role of the sympathetic nervous system and vasopressin. *Eur. J. Pharmacol.* 71: 33-42, 1981.

Unger, T., Ganten, D., Lang, R.E., Scholkens, B.A., Is tissue converting enzyme inhibition a determinant of the antihypertensive efficacy of converting enzyme inhibitors? Studies with two different compounds, Hoe 498 and MK-421m in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6: 872-880, 1984.

Unterberg, A., Wahl, M., Baethmann, A., Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels *in vivo*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 4: 574-585, 1984.

Unterberg, A., Dautermann, C., Baethmann, A., Muller-Esterl, W., The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema part 3: inhibition of the kallikrein-kinin system in traumatic brain swelling. *J. Neurosurg.* 64: 269-276, 1986.

Vavrek, R.J., Stewart, J.M., Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides* 6: 161-164, 1985.

Wahl, M., Unterberg, A., Baethmann, A., Intravital fluorescence microscopy for the study of blood-brain-barrier function. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 4: 3-18, 1985.

Walker, K., Perkins, M., Dray, A., Kinins and kinin receptors in the nervous system *Neurochem. Int.* 26: 1-16, 1995.

Walker, K., Dray, A., Perkins, M., Development of hyperthermia following intracerebroventricular administration of endotoxin in the rat: effect of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor antagonists *Br. J. Pharmacol.* 117: 684-688, 1996.

Werle, E., Gotze, W., Keppler, A., Über die Wirkung des kallikreins auf den isolierten darm und über eine neue darmkontrahierende substanz. *Biochem. Z.* 289: 217-233, 1937.

Werle, E., Bereck, U., Zur kenntnis des kallikreins. *S. angew. Chem.* 60A: 53, 1948.

Werle, E., Zach, P., Verteilung von kininogen in serum und gewebe bei raten und anderen saugtieren. *Clin. Chem. Clin. Biochem.* 8: 186-189, 1970.

---

Wharton, J., Gulbenkian, S., Mulderry, P.K., Ghatei, M.A., McGregor, G.P., Bloom, S.R., Polak, J.M., Capsaicin induces a depletion of calcitonin gene-

related peptide (CGRP)- immunoreactive nerves in the cardiovascular system of the guinea pig and rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 16: 289-309, 1986.

Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111: 544-547, 1962.

Yaksh, T., Rudy, T., Chronic catheterisation of the spinal subarachnoid space. *Physiol. Behav.* 17: 1031-1036, 1976.

Yang, H.Y.T., Erdös, E.G., Levin, Y., A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochem. Biophys. Acta.* 214: 374-376, 1970.

Yang, H.Y.T., Neff, N.H., Distribution and properties of angiotensin converting enzyme of rat brain. *J. Neurochem.* 19: 2443-2450, 1972.

Yang, X-P, Carretero, O.A., Jacobsen, G., Scicli, A.G., Role of endogenous brain kinin in the cardiovascular response to intracerebrovascular melittin. *Hypertension* 14: 629-635, 1989.

Yang, X.P., Carretero, O.A., Scicli, A.G., Role of brain kinins in the control of heart rate in spontaneously hypertensive rats (abstract). *Circulation* 78 (Suppl II): II-72, 1988.

Zuccollo, A., Navarro, M., Catanzaro, O., Effects of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptor antagonists in diabetic mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 586-589, 1996.