

Université de Montréal

**Étude du rôle des récepteurs des kinines
dans la douleur neuropathique chez le rat**

Par

Mihai Petcu

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie

Janvier 2005

© Mihai Petcu, 2005
Université de Montréal



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude du rôle des récepteurs des kinines
dans la douleur neuropathique chez le rat**

présenté par :

Mihai Petcu

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Arlette Kolta
président-rapporteur

Réjean Couture
directeur de recherche

Pierre Beaulieu
membre du jury

Mémoire accepté le :

Résumé

Les kinines, agissant sur deux types de récepteurs couplés aux protéines G, appelés B₁ et B₂, jouent un rôle important dans l'inflammation et la nociception. Nous émettons l'hypothèse que les kinines sont impliquées dans la douleur neuropathique après la lésion d'un nerf périphérique. Nos principaux objectifs sont : a) d'étudier, par autoradiographie quantitative, les changements de sites de liaison pour les récepteurs B₁ et B₂ dans la moelle épinière et dans le ganglion de la racine dorsale, après la ligature partielle du nerf sciatique chez le rat, et b) d'évaluer les effets de traitements avec des antagonistes sélectifs des récepteurs B₁ et B₂ des kinines sur l'hyperalgésie thermique et l'allodynie mécanique et au froid développées dans ce modèle de douleur neuropathique. Deux jours après la ligature, les récepteurs B₁ et B₂ des kinines sont surexprimés dans la moelle épinière lombaire et dans les ganglions de la racine dorsale du côté ipsilatéral. À 14 jours, cette augmentation est accompagnée aussi par une surexpression du côté contralateral. Les antagonistes du récepteur B₁, LF22-0452 (10 mg/kg) et B₂, LF16-0687 (3 mg/kg), bloquent l'hyperalgésie thermique après l'administration sous-cutanée, tandis que le seuil pour l'allodynie mécanique et au froid ne change pas.

Notre étude est la première à montrer dans un modèle de neuropathie une surexpression des sites de liaison pour les récepteurs des kinines dans la moelle épinière et le ganglion de la racine dorsale. Ces données ainsi que les effets anti-hyperalgésiques des antagonistes sélectifs supportent l'implication des kinines dans l'hyperalgésie thermique associée à la douleur neuropathique et suggèrent que leurs récepteurs sont des cibles thérapeutiques pottentielles dans cette pathologie.

Mots clés : bradykinine, récepteurs des kinines, moelle épinière, ganglion de la racine dorsale, neuropathie, autoradiographie, hyperalgésie thermique, allodynie.

Summary

Kinins, acting on two G-protein coupled receptors denoted as B₁ and B₂, play an important role in inflammation and nociception. We hypothesize that kinins are involved in neuropathic pain developed after peripheral nerve injury. The aims of our study are to examine by autoradiography the alterations of B₁ and B₂ receptor binding sites in the spinal cord and dorsal root ganglia after partial sciatic nerve ligation in rat, a model of neuropathic pain, and to further evaluate the efficacy of B₁ and B₂ selective antagonists on hyperalgesia and allodynia in this model. Two days after a partial sciatic ligation, B₁ and B₂ receptor binding sites are up-regulated in the lumbar spinal cord and dorsal root ganglia on the ipsilateral side. This over-expression is accompanied at 14 days after sciatic ligation by an up-regulation of both receptors on the contralateral side. Furthermore, the selective B₁ receptor antagonist LF22-0542 (10 mg/kg) and B₂ receptor antagonist LF16-0687 (3 mg/kg) blocked thermal hyperalgesia after subcutaneous administration. None of the antagonists had any effect on mechanical and cold allodynia.

Our study is the first to show an increase of kinin B₁ and B₂ receptor binding sites in a model of neuropathic pain. Together with the anti-hyperalgesic effects of their antagonists, these data provide support for the implication of central kinins in thermal hyperalgesia associated with neuropathy and suggest that both kinin receptors may represent promising therapeutic targets in neuropathic pain.

Keywords: Bradykinin, kinin receptors, spinal cord, dorsal root ganglia, neuropathy, autoradiography, thermal hyperalgesia, allodynia

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
DÉDICACE	xv
REMERCIEMENTS	xvi
PREMIER CHAPITRE	
INTRODUCTION	
1. Généralités	2
2. Historique	4
3. Le système kallicréine-kinines	6
3.1. Les kininogènes	6
3.2. Les kallicréines	7
3.3. Les kinines	8
3.4. Les kininases	9
3.4.1. Les aminopeptidases	9
3.4.2. Les carboxypeptidases	10
3.4.2.1. Les kininases I	10
3.4.2.2. La kininase II et l'endopeptidase neutre	10

3.5. Les récepteurs des kinines	12
3.5.1. Le récepteur B ₁	12
3.5.2. Le récepteur B ₂	13
3.5.3. Les mécanismes de signalisation	14
4. La douleur – définition, classification et voies de transmission	18
5. Les mécanismes de la douleur	24
5.1. Sensibilisation périphérique et centrale	24
5.2. Modulation de la douleur – facilitation ou inhibition, voies et médiateurs impliqués	28
6. La douleur neuropathique	31
6.1. Classification	31
6.2. Douleur neuropathique – signes cliniques	32
6.3. Le traitement de la douleur chronique	33
6.4. Modèles animaux de douleur neuropathique	34
6.5. Douleur neuropathique – mécanismes physiopathologiques	40
7. Les kinines dans la douleur	42
8. Objectifs et approches expérimentales	47

DEUXIÈME CHAPITRE**ARTICLE: ROLE OF KININ B₁ AND B₂ RECEPTORS IN A RAT MODEL OF NEUROPATHIC PAIN**

Abstract	50
1. Introduction	51
2. Method	53
2.1. Animals	53
2.2. Partial sciatic nerve ligation	53
2.3. Nociceptive testing	53
2.3.1. Tactile allodynia	53
2.3.2. Cold allodynia	54
2.3.3. Thermal hyperalgesia	54
2.4. Treatment with kinin receptor antagonists	55
2.5. Tissue preparation for autoradiography	55
2.6. Quantitative autoradiography	56
2.7. Peptide iodination	57
2.8. Chemicals and materials	57
2.9. Statistical analysis of data	58
3. Results	59
3.1. Hyperalgesia and allodynia	59
3.2. B ₂ receptor binding sites	59
3.3. B ₁ receptor binding sites	59
3.4. Effects of LF22-0542 and LF16-0687	60

4. Discussion	61
Acknowledgements	64
References	65
Figure legends	74
Figures	75

TROISIÈME CHAPITRE

DISCUSSION GÉNÉRALE

1. La ligation partielle du nerf sciatique	81
2. L'autoradiographie quantitative	84
3. Évaluation des données de notre étude en autoradiographie	86
4. Évaluation des données de notre étude pharmacologique	88

CONCLUSION	91
-------------------	----

BIBLIOGRAPHIE	92
----------------------	----

ANNEXE

List of Publications	111
----------------------	-----

LISTE DES TABLEAUX

PREMIER CHAPITRE : INTRODUCTION

	Page
Tableau 1	
Structure primaire des kinines chez les mammifères	9
Tableau 2	
Les caractéristiques des fibres sensorielles nociceptives	21
Tableau 3	
Classification de la douleur neuropathique en fonction de l'étiologie et de la localisation	31

LISTE DES FIGURES

PREMIER CHAPITRE : INTRODUCTION

Figure 1	Page
La synthèse des kinines	6
Figure 2	
La synthèse des kinines à partir des kallibréines plasmatiques	7
Figure 3	
La synthèse des kinines à partir des kallibréines tissulaires	8
Figure 4	
La dégradation des kinines par les carboxypeptidases	10
Figure 5	
Résumé de la synthèse et de la dégradation des kinines	11
Figure 6	
Les voies de signalisation pour les récepteurs B ₁ et B ₂ des kinines	16
Figure 7	
Classification de la douleur	19
Figure 8	
La corne dorsale de la moelle épinière avec les couches I à VI	22
Figure 9	
Les mécanismes périphériques impliqués dans la douleur	26

Figure 10

Les voies descendantes et les médiateurs impliqués dans la modulation de la douleur 30

Figure 11

Classification des modèles de douleur en fonction du type de stimulus appliqué 35

Figure 12

Les principaux modèles de douleur neuropathique 38

Figure 13

Le modèle de Seltzer (la ligature partielle du nerf sciatique) 39

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACh : acétylcholine

AMPA : acide α -amino-propionique

ASIC : canaux ioniques modulés par le pH

ATP : adénosine triphosphate

AP-1: « activator protein »

AMPC: adénosine monophosphate cyclique

ARNm: messenger de l'acide ribonucléique

BK: bradykinine

CCI : « chronic constriction injury » (la constriction chronique du nerf sciatique)

CCK : cholécystokinine

CGRP: « calcitonin gene-related peptide » (peptide relié au gène de la calcitonine)

COX-1: cyclooxygénase -1

COX-2: cyclooxygénase -2

CREB : « c-AMP response element-binding »

DAG: diacylglycérol

DYN : dynorphine

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine-I

EDHF: facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

EGF: facteur de croissance de l'épiderme

ENK : enképhaline

β -EP : β endorphine

EPN : endopeptidase neutre

GABA : acide γ -aminobutyrique

GDNF : « glial cell-line-derived neurotrophic factor »

GLU : glutamate

GLY : glycine

GMPc: guanosine monophosphate cyclique

GRD : ganglion de la racine dorsale

IB₄ : isolectine B₄

IEC: inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1

IFN- γ : interferon γ

IGF: « insulin-like growth factor »

IL-1 β : interleukine -1 β

I κ B: inhibiteur du facteur nucléaire kappa B

IML: colonne intermédiale latérale

IP3: inositol triphosphate

KBPM : kininogène de faible poids moléculaire

KD: kallidine

KHPM : kininogène de haut poids moléculaire

LPS: lipopolysaccharides

MAP-kinase: « mitogen-activated protein kinase » (protéine kinase activée par un mitogène)

NA : noradrénaline

NF- κ B: facteur de transcription nucléaire (NF) kappa B

NGF: nerve growth factor (facteur de croissance du tissu nerveux)

NMDA : N-methyl-D-aspartate

NO: monoxyde d'azote

NOS : oxyde nitrique synthase

OFQ : orphanine FQ

PA: acide phosphatidique

PCR : « polymerase chain reaction »)

PGE₂: prostaglandine E₂

PGI₂: prostacycline

PKC: protéine kinase C

PLA₂: phospholipase A₂

PLC: phospholipase C

PLD: phospholipase D

PSL: « partial sciatic nerve ligation » (ligature partielle du nerf sciatique)

SKK : système kalllicréine-kinines

SNL : « spinal nerve ligation » (ligature spinale)

SP: substance P

STZ: streptozotocine

TGF: transforming growth factor

TNF- α : facteur de tumeur nécrosant (TNF) alpha

TrkA : tyrosine kinase A

VEGF: « vascular endothelial cell growth factor » (facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires)

WDR : « wide dynamic range neurons » (neurones à large gamme réceptive)

À Livia et Alexandra

REMERCIEMENTS

Je voudrais premièrement remercier mon directeur de recherche, Dr Réjean Couture, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, me donnant la chance de commencer une carrière dans le domaine de la recherche médicale et pour son support permanent au long de ma maîtrise. Ses connaissances scientifiques, son dynamisme et son professionnalisme ont constitué un modèle et aussi une motivation pour moi.

Je tiens également à remercier mes collègues de laboratoire Jenny Pena Dias, Donata Rodi, Kathleen Deschamps, Helaine de Brito Pereira, Camilla Estevão de França, Calin Lungu, Frank Cloutier, Maria Martha Campos et Andrée Lessard pour leur amitié et pour avoir partagé leurs connaissances. Je remercie tout particulièrement mon collègue et grand ami, Brice Ongali, pour son aide précieuse, son enthousiasme et sa disponibilité.

Un remerciement spécial à ma conjointe, Livia, qui a toujours été à mes côtés pour m'encourager et ma fille Alexandra, une source permanente de joie dans les moments difficiles.

Un grand merci aussi aux secrétaires du département de physiologie de l'Université de Montréal, en particulier Joanne Payette et Christiane Laurier, pour leur aide et leurs nombreux services.

Finalement, je veux remercier Dr Pierre Beaulieu pour nous avoir donné accès à son équipement pour les tests de nociception thermique.

PREMIER CHAPITRE

INTRODUCTION

1. Généralités

Les kinines sont des peptides autacoïdes (hormones locales) et des neuromédiateurs centraux jouant un rôle important dans l'inflammation, la nociception et le contrôle cardiovasculaire. Ces peptides de 9 à 11 acides aminés comprennent la bradykinine (BK), la kallidine (KD; Lys-BK) et la T-kinine (Ile-Ser-BK). Avec leurs précurseurs (les kininogènes) et les enzymes de synthèse (les kallicroïnes), les kinines font partie d'un système peptidergique complexe, appelé le système kallicroïne-kinines (SKK). Les kinines sont libérées dans les tissus lésés à partir des kininogènes, sous l'action de la kallicroïne plasmatique (activée tôt dans la cascade de coagulation) ou de la kallicroïne tissulaire (activée par des protéases produites au sein de la lésion). Ensuite, elles sont partiellement dégradées en métabolites actifs (desArg⁹-BK, desArg¹⁰-KD et desArg¹¹-T-kinine) par la kininase I et en métabolites inactifs par la kininase II (Bhoola et al., 1992; Campbell, 2000).

Les effets biologiques des kinines sont produits par l'activation de deux récepteurs, B₁ et B₂, appartenant à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Le récepteur B₂ est un récepteur constitutif, exprimé de manière ubiquitaire et spécifiquement activé par la BK, la KD et la T-kinine. Le récepteur B₁ est sous exprimé dans les conditions physiologiques normales, à l'exception de certaines espèces comme la souris (Nsa Allogho et al., 1998), le chien (Lortie et al., 1992; Su et al., 2000) ou le chat (DeWitt et al., 1994), où il se trouve exprimé de manière constitutive. Il est induit dans des conditions inflammatoires, par les endotoxines bactériennes, les cytokines (interleukine-1, TNF- α), les facteurs de croissance et aussi par ses agonistes (desArg⁹-BK, desArg¹⁰-KD et desArg¹¹T-kinine)

(Siebeck et al., 1998; Marceau et al., 1998; Ni et al., 1998; Schanstra et al., 1998; Zhou et al., 1998; Campos et al., 1999).

Chez l'humain et l'animal, les kinines jouent un rôle dans plusieurs pathologies tels que le diabète, l'asthme, l'arthrite, la sclérose en plaque et les maladies cardiovasculaires. La BK cause une hypotension après injection périphérique et une augmentation de la pression artérielle via l'activation du système nerveux sympathique après administration centrale (Lopes et Couture, 1992; Cloutier et Couture, 2000). Sur le système cardiovasculaire, les kinines et leurs récepteurs jouent un rôle bénéfique puisqu'elles participent aux mécanismes d'action des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (IEC).

Une augmentation de l'expression des récepteurs B_1 et B_2 a été montrée dans différents modèles de douleur inflammatoire ou neuropathique. Aussi l'efficacité des antagonistes spécifiques de récepteurs des kinines dans ces modèles soutient l'importance des kinines dans la douleur.

L'objectif de ce mémoire est d'étudier la distribution et la densité des récepteurs B_1 et B_2 des kinines dans la moelle épinière et dans les ganglions de la racine dorsale dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat en utilisant l'autoradiographie quantitative. Pour développer la neuropathie, nous avons choisi comme modèle la ligature partielle du nerf sciatique (modèle de Seltzer, 1990). Des traitements avec des antagonistes des récepteurs B_1 et B_2 sont aussi effectués afin d'évaluer les effets du blocage de ces récepteurs sur l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique mesurées suite à la ligature du nerf sciatique.

2. Historique

Au début du XX^e siècle, Abelous et Bardier observèrent une hypotension chez le lapin suite à l'injection intraveineuse d'une fraction d'urine humaine (Abelous et Bardier, 1909). Cette observation fut confirmée en 1926 par Frey qui constata une hypotension produite par l'urine humaine chez le chien. Par la suite, les effets observés sont attribués à l'action d'un agent bioactif urinaire, non dialysable, thermolabile et de haut poids moléculaire (Frey et Kraut, 1928). La présence de cette substance hypotensive est démontrée dans le sang, le pancréas et les glandes salivaires et elle est appelée *Kreislaufhormon* (hormone circulante) (Frey et Kraut, 1928) et renommée *kallikreas* (pancréas en Grec) (Kraut et al., 1930) deux ans plus tard, à cause de ses grandes concentrations au niveau du pancréas. En 1937, Eugen Werle découvra que la kallicroïne (tissulaire) est en réalité un enzyme protéolytique qui libère un polypeptide de haute activité biologique (la kallidine, KD), à partir des protéines plasmatiques appelées kallidinogènes ou kininogènes. L'équipe du brésilien Rocha e Silva rapporta, en 1949, la découverte de la bradykinine, un peptide capable de provoquer des hypotensions et une contraction lente de l'iléum de cobaye (en grec *bradys* - lent et *kinesia* - mouvement). Ensuite, la BK fut isolée (Andrade et Rocha e Silva, 1956), et sa séquence en acides aminés élucidée (Boissonnas et al., 1960). Peu de temps après, a suivi la découverte des kininogènes (Habermann 1963) et de la kininase II, laquelle est identifiée comme étant l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (Yang et al., 1970).

En 1980, les études de Regoli et Barabé sur les effets de la BK et de la desArg⁹-BK sur des préparations pharmacologiques (bio-essais) permettent l'identification de deux types de récepteurs pour les kinines: le récepteur B₁, activé par la desArg⁹-BK et

bloqué par la [Leu⁸]-desArg⁹-BK et le récepteur B₂, activé par la BK, la kallidine et autres analogues sélectifs (Regoli et Barabé, 1980). Les gènes des récepteurs des kinines ont été clonés dans les années 90 : le gène du récepteur B₂ chez le rat (Hess et al., 1994) et le gène du récepteur B₁ chez l'humain (Menke et al., 1994).

Ces dernières années, des études de plus en plus nombreuses confirment la complexité du système kallicréine-kinines et son implication dans différentes situations physiopathologiques.

3. Le système kallibréine-kinines

Le système kallibréine-kinines comprend les kininogènes, les kinines et leurs métabolites actifs, les enzymes de synthèse (kallibréines) et de dégradation (kininases) et les récepteurs B₁ et B₂.

3.1. Les kininogènes

Les kininogènes, les précurseurs des kinines, sont clivés par les enzymes kallibréines pour libérer les kinines. Ils sont constitués de six domaines différents et la séquence structurale de la BK est contenue dans le quatrième domaine (Weisel et al., 1994). Chez l'humain, on trouve deux types de kininogènes hépatiques qui proviennent de l'épissage alternatif du gène K, situé sur le chromosome 3q26 (Kitamura et al., 1985): le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM, 88 à 120 kDa) et le kininogène de faible poids moléculaire (KBPM, 50 à 68kDa). Chez le rat, on trouve en plus le T-kininogène (68 kDa), qui se présente sous deux isoformes protéiques, T-I et T-II, avec 96% d'homologie (Okamoto et Grennbaum 1983), provenant de la duplication du gène T (**Figure 1**).

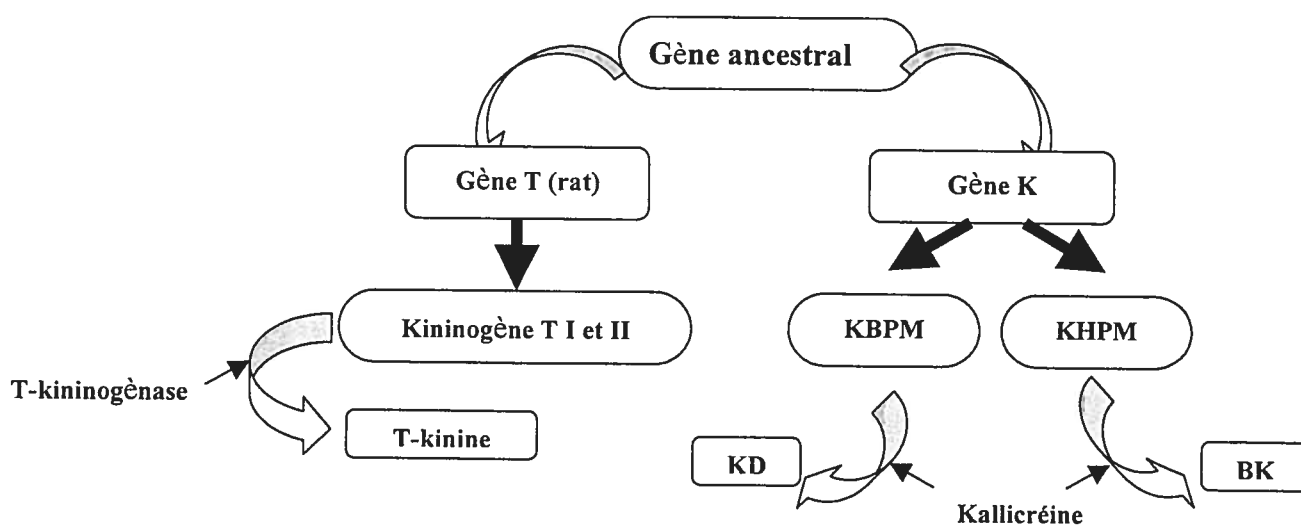


Figure 1 La synthèse des kinines (KBPM, kininogène de bas poids moléculaire; KHPM, kininogène de haut poids moléculaire)

3.2. Les kallibréines

Les kallibréines (ou kininogénases) sont des enzymes protéolytiques qui libèrent les kinines à partir des kininogènes. Deux types de kallibréines sont connues: la kallibréine tissulaire et la kallibréine plasmatique. Les kallibréines se trouvent distribuées sous forme inactive ou pré- kallibréine. La BK et la KD sont les produits de deux voies biochimiques, une sanguine (qui implique la kallibréine plasmatique) et l'autre tissulaire (qui implique la kallibréine tissulaire), décrites dans les figures 2 et 3.

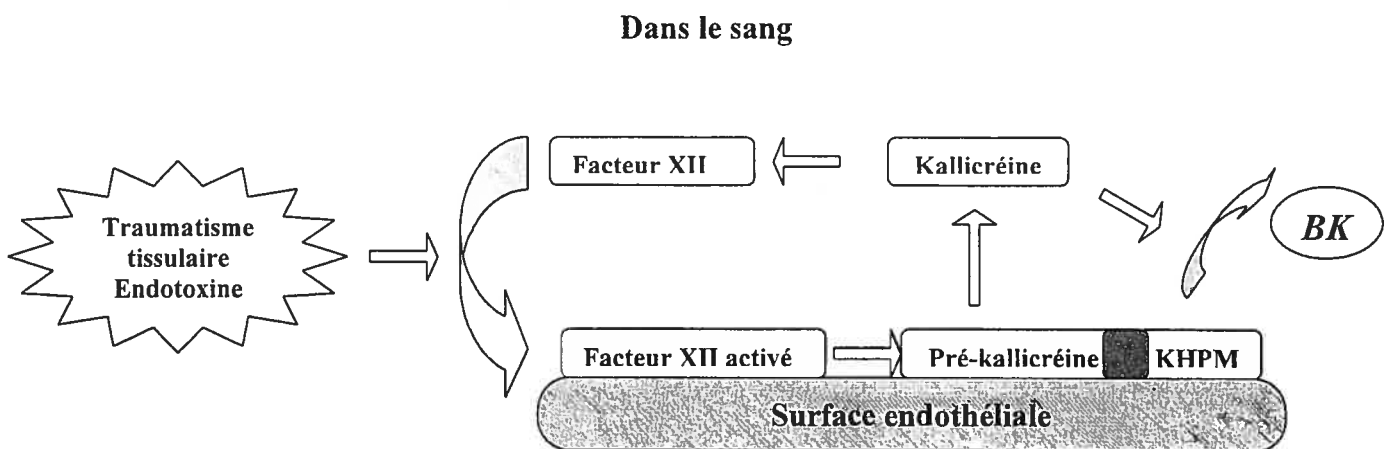


Figure 2 La synthèse des kinines à partir des kallibréines plasmatiques : dans le sang, la pré-kallibréine plasmatique, associée au kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) est convertie par le facteur de Hageman (Facteur XII activé) en kallibréine qui, à son tour, libère la bradykinine (BK) du KHPM (adapté de Gabra et al., 2003).

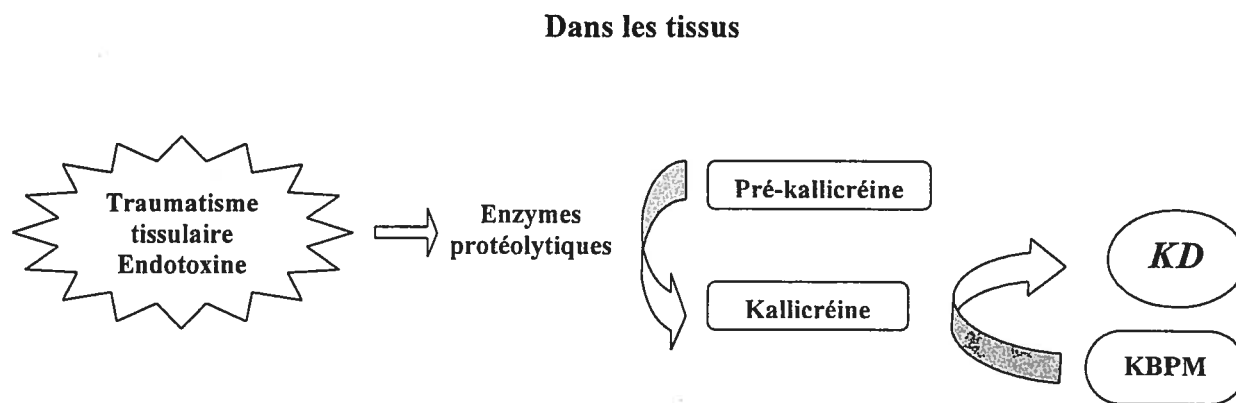


Figure 3 La synthèse des kinines à partir des kallicréines tissulaires : dans les tissus, la kallicréine activée par les enzymes protéolytiques produites au site de l'inflammation, libère la kallidine (KD) à partir du KBPM (adapté de Gabra et al., 2003)

Les kinines peuvent aussi être produites par l'action combinée des kallicréines et des élastases des cellules neutrophiles. Un mécanisme alternatif, kallicréine-indépendant, a été récemment décrit : la production de la BK par les élastases et les tryptases des mastocytes (Kozik et al., 1998). Aussi, une étude a suggéré que les kallicréines et d'autres protéases à sérine peuvent directement stimuler le récepteur B₂ (Hecquet et al., 2000).

3.3. Les kinines

La séquence de différentes kinines est montrée au **Tableau 1**. La bradykinine (BK), la kallidine (KD) et leurs métabolites actifs, la desArg⁹-BK et la desArg¹⁰-KD sont les kinines les plus connues. En plus, chez le rat, on trouve la T-kinine et son métabolite actif, la desArg¹¹-T-kinine (Okamoto et Greenbaum, 1983).

Tableau 1 Structure primaire des kinines chez les mammifères

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Bradykinine (BK)</i>		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe-Arg-OH
<i>Kallidine KD (Lys-BK)</i>		Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro-Phe-Arg-OH
<i>T-kinine (Ile-Ser-BK)</i>		Ile	Ser	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser-Pro-Phe-Arg-OH
<i>desArg⁹-BK</i>		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe-OH
<i>desArg¹⁰-KD</i>		Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro-Phe-OH
<i>desArg¹¹-T-kinine</i>		Ile	Ser	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser-Pro-Phe-OH

Les kinines (BK, KD et T-kinine) sont soumises à plusieurs voies de dégradation, sous l'action des enzymes spécifiques appelées kininases.

3.4. Les kininases

Au niveau tissulaire ou plasmatique, les kinines subissent l'action de trois groupes principaux d'enzymes: les aminopeptidases, les carboxypeptidases et les endopeptidases.

3.4.1. Les aminopeptidases

Les aminopeptidases ne sont pas de vrais enzymes de dégradation des kinines. Ils agissent à l'extrémité N-terminale des kinines pour transformer la T-kinine et la KD en BK et les métabolites actifs desArg¹¹T-kinine et desArg¹⁰KD en desArg⁹BK (Wolfrum et al., 1999).

On trouve deux types d'aminopeptidases: l'aminopeptidase M (agissant sur la KD et la desArg¹⁰KD) et l'aminopeptidase P (agissant sur la T-kinine et la desArg¹¹T-kinine) chez le rat (Chen et al., 1991).

3.4.2. Les carboxypeptidases

Les carboxypeptidases agissent à l'extrémité C-terminale des kinines, et les dégradent soit en métabolites actifs (kininase I), soit en métabolites inactifs (kininase II et endopeptidase neutre) (**Figure 4**).

3.4.2.1. Les kininases I

Les kininases I clivent spécifiquement le lien entre l'arginine en C-terminal (position 9) et la phénylalanine en position 8 des kinines pour former des métabolites actifs (la desArg⁹-BK, la desArg¹⁰-KD et la desArg¹¹-T-kinine). Elles comprennent les carboxypeptidases M (dans les membranes cellulaires) et N (dans le plasma).

3.4.2.2. La kininase II et l'endopeptidase neutre

La kininase II ou l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (ECA) et l'endopeptidase neutre (EPN), appelé aussi l'enképhalinase, clivent la BK en position 7 (entre la proline et la phénylalanine), générant le dipeptide Phe⁸-Arg⁹ et le métabolite inactif BK (1-7). La BK (1-7) est, à son tour, clivée par EPN en position 4 (entre la glycine et la phénylalanine) pour générer le peptide inactif BK (1-4). L'ECA clive aussi les kinines entre la phénylalanine en position 5 et la sérine en position 6 pour générer le peptide inactif BK (1-5) (Erdös, 1990 a et b).

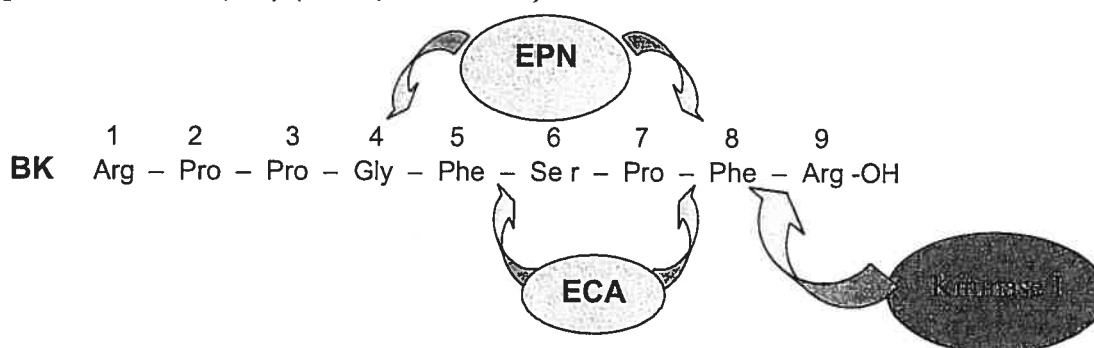


Figure 4 La dégradation des kinines par les carboxypeptidases : kininase I, kininase II (ECA) et l'endopeptidase neutre (EPN)

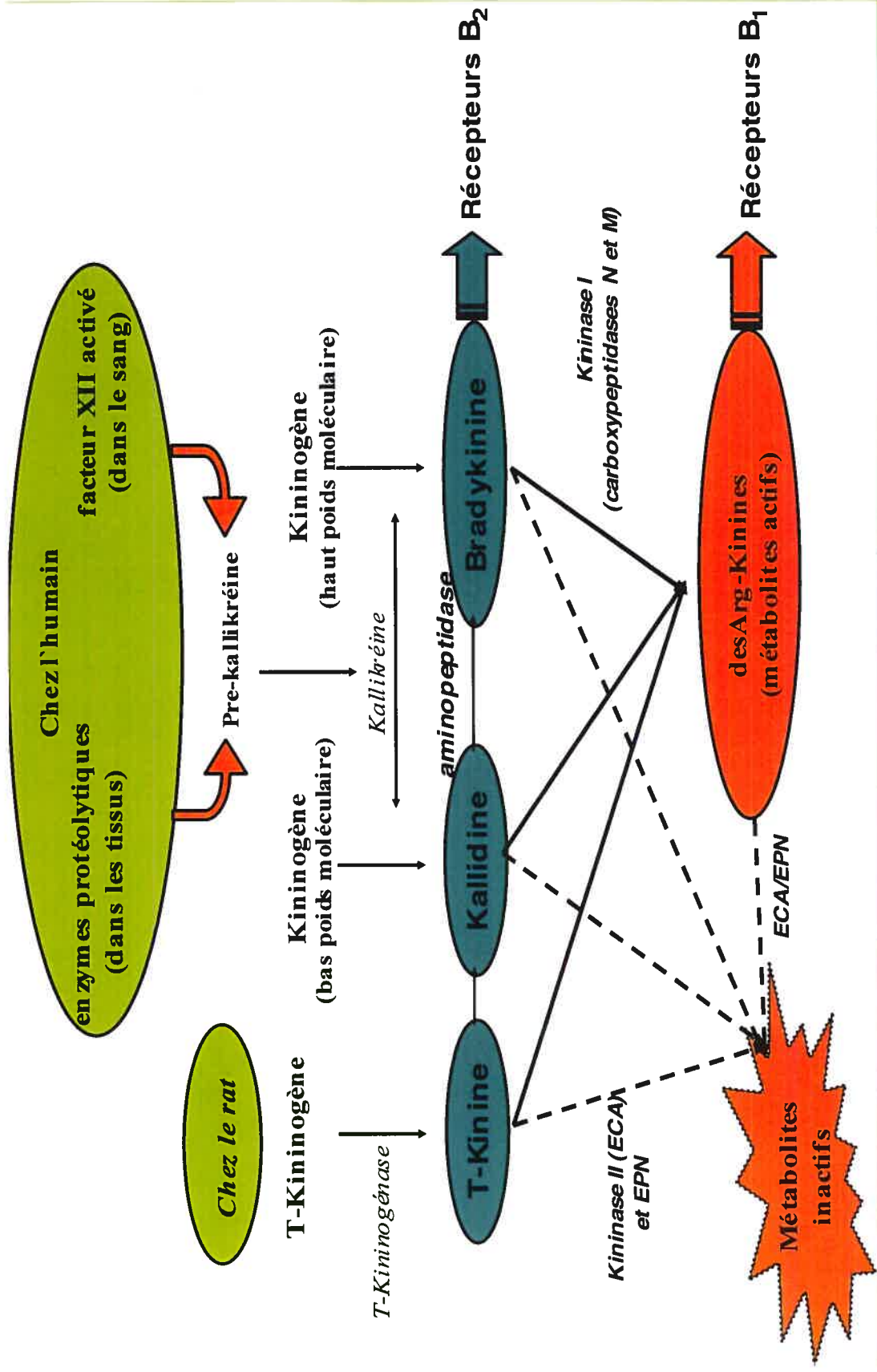


Figure 5 Résumé de la synthèse et de la dégradation des kinines.

3.5. Les récepteurs des kinines

On dénombre l'existence de deux types de récepteurs des kinines à sept domaines trans-membranaires, appelés B₁ et B₂, lesquels appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G. Chez l'humain, les deux récepteurs sont encodés par des gènes distincts (Powell et al., 1993; Webb et al., 1994) situés sur le chromosome 14, en position q32 (Ma et al., 1994; Kammerer et al., 1995). Les deux récepteurs, ayant une homologie de 36% et la même masse moléculaire (41kDa), sont composés de 353 (B₁) et de 364 acides aminés (B₂) chez l'humain (Menke et al., 1994). Des différences notables se trouvent surtout au niveau de l'extrémité C-terminale et au niveau des boucles intracellulaires 2 et 3 (Raidoo et Bhoola, 1998; de Prado et al., 1998).

3.5.1. Le récepteur B₁

Comme déjà spécifié, le récepteur B₁ est en général sous exprimé dans les situations physiologiques normales (Bhoola et al., 1992) et il est induit dans des conditions inflammatoires, par les endotoxines bactériennes, les cytokines comme l'interleukine-1 β (IL -1 β) et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) (Marceau et al., 1998), les facteurs de croissance et aussi par ses agonistes endogènes, la desArg⁹-BK et la desArg¹⁰-KD (Schanstra et al., 1998; Campos et al., 1999). L'induction du récepteur B₁ par les cytokines est contrôlée par la MAP-kinase et le facteur de transcription nucléaire NF κ B (Larivée et al., 1998; Ni et al., 1998; Schanstra et al., 1998; Campos et al., 1999; Sardi et al., 1999). L'analyse du gène du récepteur B₁ a révélé la présence des éléments de régulation des lipopolysaccharides (LPS), de l'IL-1 β , du TNF- α et du NF κ B (Ni et al., 1998 a et b).

L'affinité du récepteur B₁ pour ses deux principaux ligands endogènes, desArg¹⁰KD et desArg⁹BK est dépendante de l'espèce (Hess et al., 1996; Regoli et al., 1998). Le récepteur B₁ humain a une affinité 2000 fois plus élevée pour la desArg¹⁰-KD que pour la desArg⁹-BK (Menke et al., 1994), tandis que le récepteur B₁ de la souris a une affinité trois fois plus élevée pour la desArg⁹BK.

Le récepteur B₁ est caractérisé par une faible désensibilisation et une internalisation limitée associée à une dissociation lente du ligand et il serait impliqué dans la phase chronique de la réponse inflammatoire et de la douleur (Dray, 1997; Couture et al., 2001). L'induction des carboxypeptidases M (dans les membranes cellulaire) et N (dans le plasma) peut augmenter le niveau des métabolites actifs au site de l'inflammation, augmentation qui peut, à son tour, contribuer à l'activation chronique des récepteurs B₁ (Couture et al., 2001). La réponse inflammatoire relayée par les récepteurs B₁ est attribuée à la libération de SP et de CGRP des fibres sensorielles, des prostaglandines, des médiateurs des mastocytes (histamine et sérotonine) et des cytokines (en particulier l'interleukine-1) (Dray, 1997; Couture et al., 2001).

3.5.2. Le récepteur B₂

Le récepteur B₂ est constitutif, présent dans la plupart des tissus, sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les neurones et les astrocytes, les polynucléaires neutrophiles, les fibroblastes, les cellules mésangiales et épithéliales (Bhoola et al., 1992). Les mécanismes rapides d'association et de dissociation du ligand au récepteur, la désensibilisation et l'internalisation, soutiennent l'implication du récepteur B₂ surtout dans la phase aiguë de l'inflammation et de la douleur (Dray, 1997; Couture et al., 2001). Les récepteurs B₂ des kinines sont impliqués dans l'inflammation

neurogénique : augmentation de la perméabilité vasculaire par la contraction des cellules endothéliales vasculaires et aussi par l'augmentation de la pression hydrostatique dans les capillaires causée par la dilatation artérielle et la veinoconstriction. Ceci est une conséquence de la libération de neuropeptides pro-inflammatoires tels que la substance P et le CGRP des fibres sensorielles de type C, la stimulation de la formation de prostaglandines, des cytokines et du monoxyde d'azote (NO) par différentes cellules au site de l'inflammation.

3.5.3. Les mécanismes de signalisation des récepteurs des kinines

Les récepteurs B₁ et B₂ des kinines sont couplés aux protéines Gαq et Gαi (Prado et al., 2002) et ils activent différentes voies de signalisation selon le type cellulaire (Figure 6) :

- l'activation directe ou indirecte de l'adénylate cyclase et de la guanylate cyclase, menant à la formation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc);

- l'activation de la phospholipase C (PLC) qui stimule la formation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG); l'IP₃ augmente les niveaux intracellulaires de Ca²⁺ et active l'enzyme NOS favorisant la relâche du NO, ce qui cause la vasodilatation suite à l'augmentation de la concentration de GMPc dans le muscle lisse (Drummond et Cocks, 1995; Bélichard et al., 1996; Agata et al., 2000; Prat et al., 2000; Su et al., 2000); le DAG active la protéine kinase C (PKC) (Austin et al., 1997; Agata et al., 2000; Prat et al., 2000; Bascand et al., 2003).

- la production de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires par l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) ou à partir du DAG (sous l'action d'une

lipase), conduisant à la libération de prostaglandines (PGE_2) et de prostacycline (PGI_2) (Burch et Axelrod, 1987; Gallagher et al., 1998; Saunders et al., 1999; Yamasaki et al., 2000).

Le récepteur B_2 est lié à d'autres voies de transduction de signaux :

- l'activation de la phospholipase D (PLD) entraîne l'augmentation de l'acide phosphatidique (PA) et du DAG (Vasta et al., 1998; Lee et al., 2000);
- l'activation de protéines à activité tyrosine kinase cytoplasmiques (Dray, 1997);
- l'activation de la MAP-kinase, suite à l'activation de la PKC et de Raf ou suite à la phosphorylation de la tyrosine des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGF) suivie de l'activation de la Ras kinase (Adomeit et al., 1999; Gabra et al., 2003).

Le récepteur B_1 est associé aussi à la voie des MAP-kinases (Marceau et al., 1998).

Même si les voies de signalisation de ces deux récepteurs sont semblables, on retrouve des différences significatives. L'augmentation du niveau de Ca^{2+} suit des cinétiques différentes : le récepteur B_1 utilise surtout le Ca^{2+} extracellulaire alors que le récepteur B_2 utilise le Ca^{2+} intracellulaire libéré par l' IP_3 du réticulum endoplasmique (Mombouli et Vanhoutte, 1995; Zhou et al., 2000).

Un mécanisme d'autorégulation réciproque a été suggéré, basé sur l'observation que l'activation du récepteur B_2 active le facteur NF κ B qui, à son tour, induit le récepteur B_1 (Phagoo et al., 1999). Mais cette hypothèse reste controversée, car l'expression des récepteurs B_1 et B_2 ne change pas après un traitement chronique avec des agonistes et/ou des antagonistes spécifiques de ces deux récepteurs (Sabourin et al., 2001; Marceau et al., 1999).

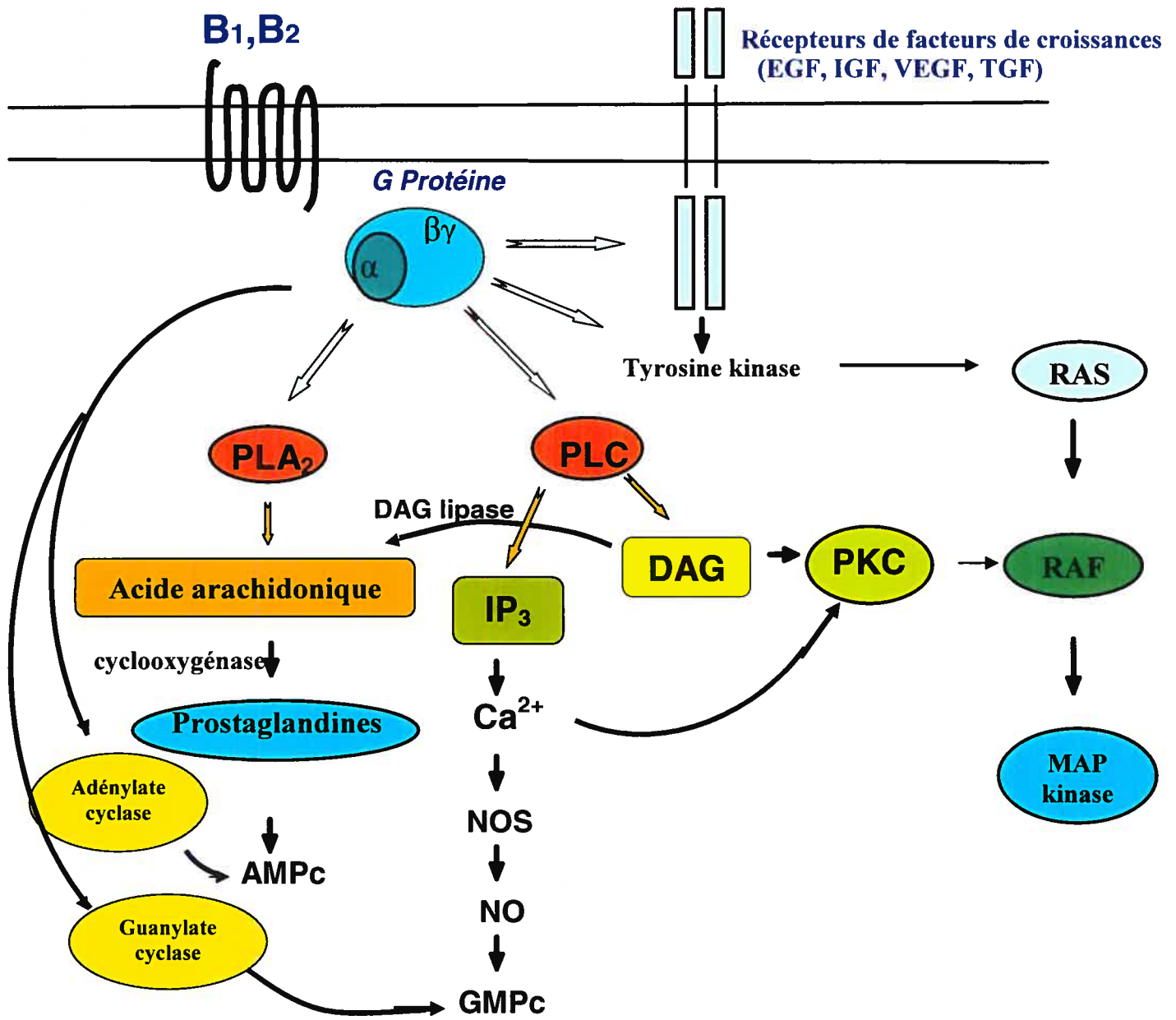


Figure 6 Les voies de signalisation pour les récepteurs B₁ et B₂ des kinines (EGF, facteur de croissance de l'épiderme; IGF, « insulin-like growth factor »; VEGF, « vascular endothelial growth factor »; TGF, « transforming growth factor »; AMPc, adénosine monophosphate cyclique; GMPc, guanosine monophosphate cyclique; PLC et PLA₂, phospholipases C et A₂, IP₃, inositol triphosphate; DAG, diacylglycérol; PKC, protéine kinase C; NOS, oxyde nitrique synthase; NO, monoxyde d'azote; MAPkinase, « mitogen activated protein kinase »).

4. La douleur – définition, classification et voies de transmission

Définition – en conditions physiologiques, la douleur est le premier mécanisme de défense par lequel l'organisme réagit à des stimuli nocifs dans l'environnement. Conformément à la définition de l'IASP (International Association for Study of Pain), elle se manifeste par des sensations et des expériences émotionnelles désagréables, associées avec un dommage tissulaire réel ou potentiel. Elle sert à la survie et à la guérison.

La douleur a 2 composantes : a) composante de sensation somatique (la nociception) qui permet de localiser et de discriminer la douleur et b) composante affective qui produit une émotion négative

Dépendant de la durée, la douleur peut être aiguë ou chronique. La douleur aiguë est immédiate après l'application du stimulus nocif, limitée dans le temps et elle sert de signal d'avertissement et de mécanisme de défense. La douleur chronique est une douleur persistante, de longue durée, dont le dommage tissulaire n'est pas toujours évident, qui n'a pas de rôle protecteur et qui est associée en général à des situations pathologiques.

On classe la douleur chronique en douleur nociceptive, qui à son tour peut être somatique ou viscérale (blessure des tissus et des organes), et en douleur neuropathique (blessure ou maladies du système nerveux périphérique ou central (Figure 7, adaptée de Boulanger A, 2004).

Les stimuli nocifs et dommageables activent des fibres nerveuses spécialisées, appelés nocicepteurs, situés au niveau de la peau et dans les tissus sous-cutanés. Ces nocicepteurs sont des terminaisons nerveuses libres de type dendritique, dont on retrouve trois classes majeures (Basbaum et Jessell, 2000):

- nocicepteurs mécaniques : ils répondent à une stimulation mécanique de forte

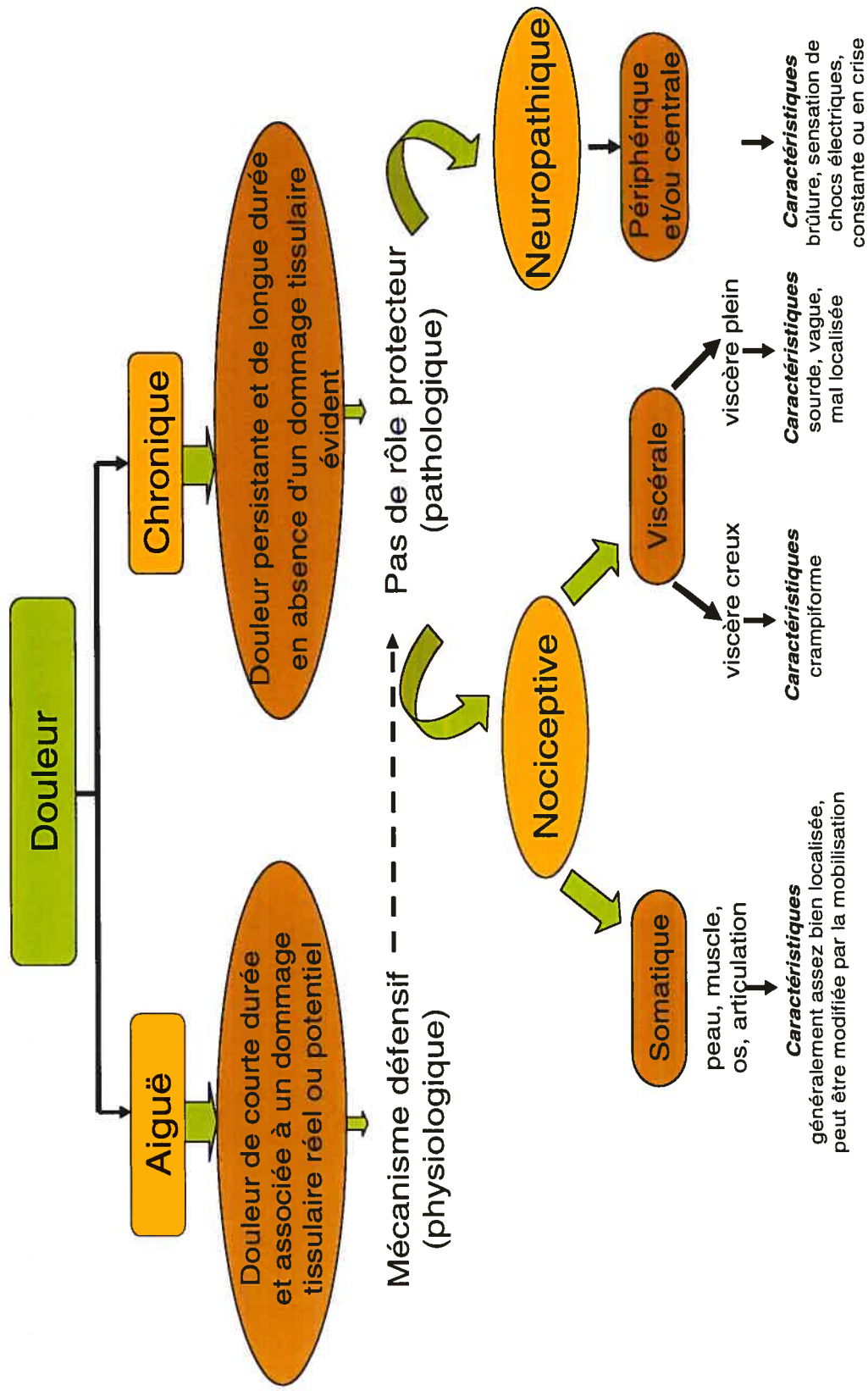


Figure 7 Classification de la douleur

intensité (pincement, pression élevée); ce sont les terminaisons des fibres A δ myélinisées, ayant un diamètre de 1 à 5 μm et une vitesse de 5 à 30 m/s, retrouvées en majorité dans la peau et les tissus sous-cutanés;

- nocicepteurs thermiques et mécaniques : ils sont stimulés par des températures extrêmes (au dessus de 43⁰C et au dessous de 15⁰C) et par des stimuli mécaniques dommageables; ce sont aussi des terminaisons des fibres A δ ;
- nocicepteurs polymodaux; ils sont stimulés par des stimuli mécaniques, thermiques et chimiques à intensité élevée, constituant la majorité des fibres sensorielles de type C (fibres nerveuses non myélinisées, avec un diamètre de moins de 1,5 μm et une vitesse en bas de 1m/s; ils se retrouvent dans la peau, les muscles squelettiques, les tendons, les ligaments, les jointures, les viscères).

Dans les viscères, on retrouve aussi une autre classe de nocicepteurs, appelés nocicepteurs silencieux, qui normalement ne sont pas activés par les stimuli nocifs, mais dont le seuil diminue dans les conditions inflammatoires et après stimulation chimique.

Les impulsions nerveuses déclenchées par la stimulation des nocicepteurs sont conduites vers le système nerveux central par les fibres sensorielles nociceptives (fibres C non-myélinisées, fibres myélinisées A δ et en conditions pathologiques, fibres myélinisées A β) (**Tableau 2**). Ces fibres sont des afférences sensibles des neurones de premier ordre ayant leur corps cellulaire dans les ganglions de la racine dorsale et dans les ganglions des nerfs crâniens. On retrouve deux types de fibres C (Hunt et Mantyh, 2001) :

- fibres C peptidergiques : contiennent la substance P et le CGRP (« calcitonin gene related peptide »), sont sensibles au NGF (« nerve growth factor ») et projettent

dans la couche I et la couche II superficielle (II_{outer}); ces fibres expriment le récepteur NK_1 de la substance P et le récepteur TrkA (Tyrosine kinase A) du NGF;

- fibres C non peptidergiques (ne contiennent pas de peptides et expriment les récepteurs purinergiques $P2X_3$), caractérisées par la présence du proto-oncogène tyrosine kinase Ret et des récepteurs $GFR\alpha-1$ du GDNF (« glial cell-line-derived neurotrophic factor »), possèdent un seuil plus élevé et projettent dans la couche II profonde (II_{inner}); ces fibres sont marquées spécifiquement par la Isolectine B_4 (IB_4)

Tableau 2 Les caractéristiques des fibres sensibles nociceptives

(afférences sensibles primaires)

Type	Vélocité m/s	Diamètre μm	Caractéristiques
$A\beta^*$	50-70	4-12	Toucher Vibration Pression légère
$A\delta$	5-30	1-5	Nociception
C	<3	<1,5	Nociception

* En conditions normales, les grosses fibres myélinisées $A\beta$ ne sont pas impliquées dans la nociception; elles peuvent changer leur phénotype dans les situations pathologiques (ex : la douleur neuropathique)

Les afférences sensibles primaires font synapse avec un neurone de 2^o ordre ou avec des interneurons dans la corne dorsale de la moelle épinière, dans les couches superficielles (Figure 8).

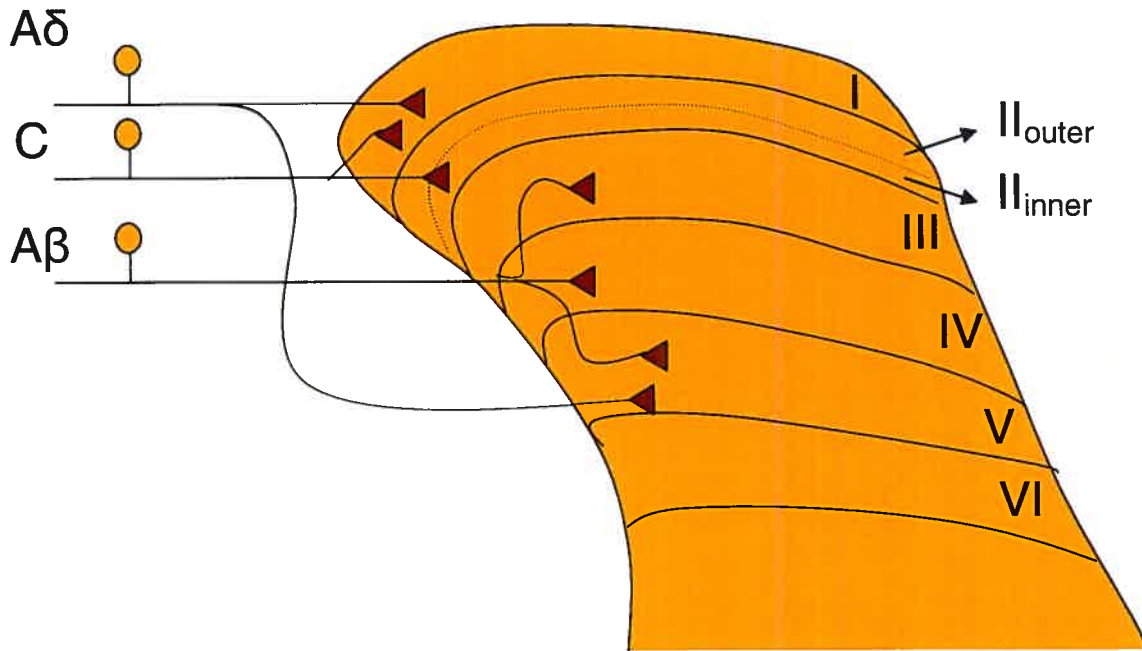


Figure 8 La corne dorsale de la moelle épinière avec les couches I à VI. Les fibres A δ projettent dans les couches I et V, les fibres C dans la couche I et la « substantia gelatinosa » (couches II) et les fibres A β dans les couches III, IV et V (adapté de Basbaum et Jessell, 2000).

La majorité des axones des neurones de deuxième ordre passe du côté opposé de la moelle pour former les trois principales voies ascendantes qui conduisent les impulsions nerveuses vers les centres nerveux supra spinaux (Basbaum et Jessell, 2000).

- **La voie spinoréticulée**

Origine : couches VII et VIII (fibres C), sans discrimination précise de la douleur

Projection : la formation réticulée de la medulla, du pons et du mésencéphale, où les fibres font synapse avec des neurones de 3^e ordre, qui à leur tour projettent dans le thalamus et l'hypothalamus.

- **La voie spinothalamique**

Origine : couches I et V

a) Voie néospinothalamique : fibres A δ (douleur rapide et aiguë), permettant la discrimination de la douleur (localisation, intensité), projettent dans le noyau postéro-latéral ventral du thalamus; les neurones de troisième ordre projettent à leur tour dans le cortex somatosensoriel du lobe pariétal (S₁-S₂).

b) Voie paléospinothalamique : fibres C pour la douleur lente et la phase chronique, mais aussi fibres A δ projetant dans le thalamus; puis, via les neurones de troisième ordre, les fibres se rendent au cortex préfrontal et dans d'autres régions du cerveau (cortex cingulaire antérieur, insula); perception émotionnelle et désagréable de la douleur.

- **Voie spinomésencéphalique**

Origine : couches I et V, composante affective de la douleur

Projection : la formation réticulée du mésencéphale et la substance grise périaqueducatale.

5. Les mécanismes de la douleur

5.1. Sensibilisation périphérique et centrale

La stimulation aiguë (stimuli nocifs) active les nocicepteurs situés au niveau de la peau et dans les tissus sous-cutanés, générant des impulsions nerveuses qui, transportées par les voies ascendantes aux centres nerveux supérieurs, sont traduites en sensations douloureuses.

La stimulation répétée des nocicepteurs cause le phénomène de « **sensibilisation périphérique** » (Basbaum et Jessell, 2000), caractérisé par une diminution du seuil d'activation (les nocicepteurs deviennent sensibles même aux stimulations qui normalement ne sont pas capables de générer un potentiel d'action dans les terminaisons nerveuses), par une réponse exagérée aux stimulations supraliminaires et par une activité spontanée. La sensibilisation des nocicepteurs après dommage tissulaire ou l'inflammation est le résultat de la libération locale d'une grande variété de médiateurs chimiques (prostaglandines, bradykinine, histamine, leukotriènes, acétylcholine, sérotonine, substance P, etc. (**Figure 9**) provenant des différentes cellules (cellules endommagées, plaquettes sanguines, neutrophiles, mastocytes, afférences sensorielles, etc.) (Kidd et Urban, 2001).

La transmission synaptique entre les nocicepteurs et les neurones de la corne dorsale est relayée par des neurotransmetteurs chimiques (glutamate, aspartate) et peptidergiques (substance P, CGRP) synthétisés dans les corps cellulaires des fibres sensorielles et transportés vers la périphérie et la moelle. La synthèse et la libération des neuropeptides sont stimulées par le NGF (« nerve growth factor »), produit et libéré au site de l'inflammation par une grande variété de cellules (fibroblastes, kératinocytes,

cellules de Schwann, cellules immunes, neurones). Le NGF peut aussi activer les nocicepteurs directement ou par l'intermédiaire des médiateurs libérés suite à l'activation des mastocytes ou d'autres cellules inflammatoires. À long terme, le NGF est impliqué dans la régulation de l'expression des neuropeptides (substance P, CGRP), des récepteurs TRPV-1 (sensibles à la capsaïcine) et B₂ (de la bradykinine) et des canaux ioniques, jouant un rôle important dans un autre mécanisme physiopathologique impliqué dans la douleur : la « **sensibilisation centrale** » (Kidd et Urban, 2001).

Le neurotransmetteur chimique majeur, libéré par les fibres C et A δ au niveau de la corne dorsale est le glutamate, qui agit sur les récepteurs de type AMPA et NMDA (Kandel et Schwartz, 2000). Au niveau de la moelle, le récepteur de type NMDA du glutamate et les neurokinines sont aussi impliqués dans la « **sensibilisation centrale** » (phénomène d'hyperexcitabilité des neurones de la corne dorsale, caractérisé par la diminution du seuil d'activation et l'augmentation de la réponse à un même stimulus supraliminaire).

Les stimuli de forte intensité (ex. : stimuli nocifs associés à un dommage tissulaire) ou les stimulations répétitives (le phénomène de « wind-up »), sont accompagnés par la relâche de glutamate et de neuropeptides des fibres C (substance P), ayant comme résultat une augmentation de l'influx de Ca²⁺ intracellulaire. Le phénomène de « wind-up » (le processus de sommation temporelle, augmentation progressive de la réponse à chaque stimulation) est causé par les décharges répétitives à haute fréquence des fibres C, en conditions inflammatoires persistantes et est relayé par les neurones à large gamme réceptive (WDR, « wide dynamic range neurons ») (Basbaum et Jessell, 2000).

Médiateurs périphériques

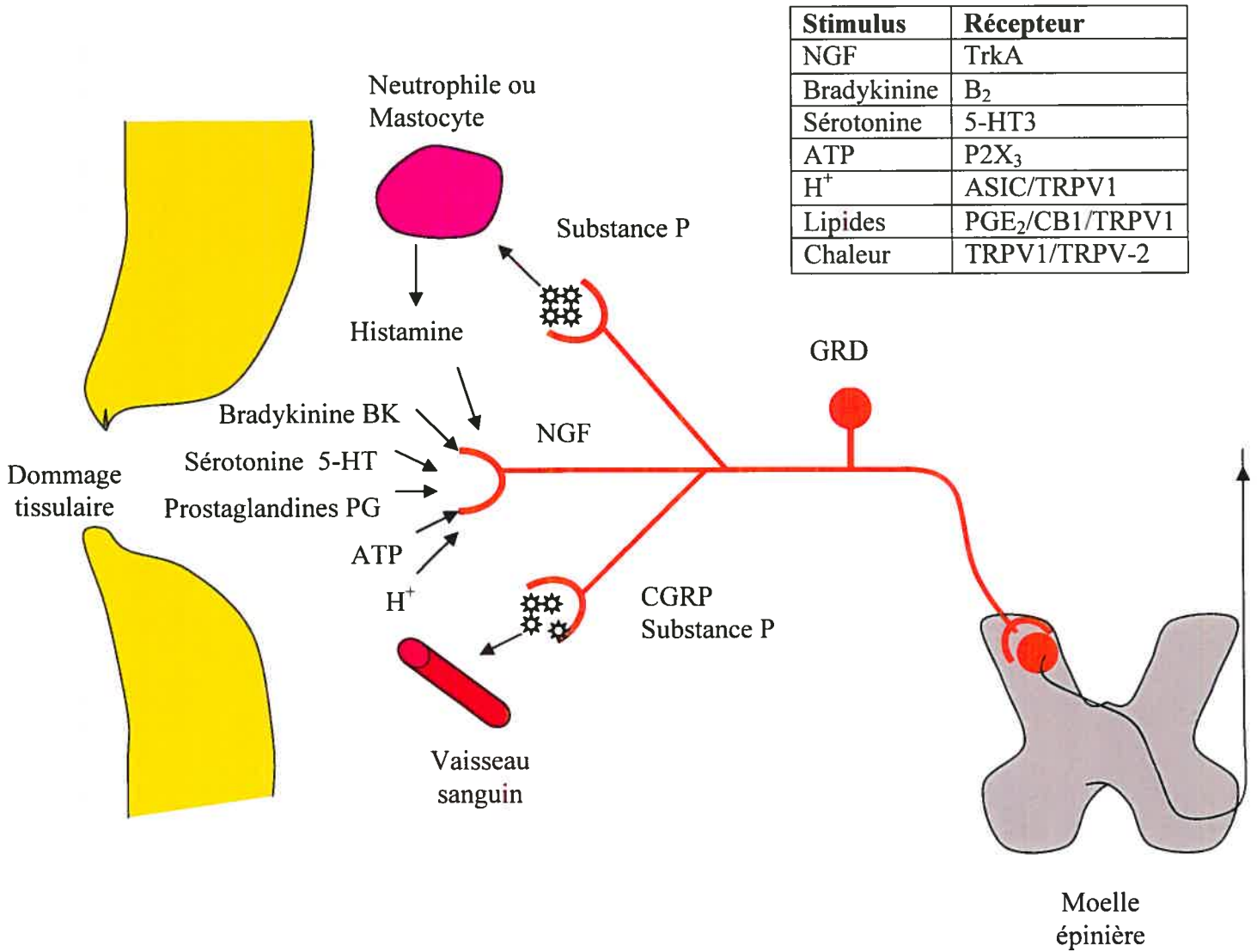


Figure 9 Les mécanismes périphériques impliqués dans la douleur : les médiateurs relâchés au site du dommage tissulaire (bradykinine, sérotonine, prostaglandines, ATP, H⁺) stimulent les terminaisons nerveuses périphériques, menant à la production du NGF (« nerve growth factor »), de la Substance P (SP) et du CGRP (« calcitonin gene-related peptide »), qui à leur tour produisent la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la relâche de l'histamine et de la sérotonine des mastocytes. Le NGF est transporté de façon rétrograde aux corps cellulaires et est impliqué dans la synthèse des neuromédiateurs et de leurs récepteurs dans le ganglion de la racine dorsale (GRD) et dans la moelle épinière, via son récepteur TrkA (Tyrosine kinase A) (adapté de Kandel et Schwartz, 2000) (TRPV1/TRPV2), « vanilloid receptors », récepteurs stimulés par la capsaïcine, la chaleur et le pH acide; P2X₃, récepteurs purinergiques stimulés par l'ATP; ASIC, canaux ioniques stimulés par le pH acide; 5-HT₃, récepteur de la sérotonine; CB1, récepteur des cannabinoïdes; PGE₂, récepteur des prostaglandines).

La substance P, via son récepteur NK-1, active la protéine kinase C (PKC) impliquée dans la phosphorylation du récepteur NMDA. Le récepteur NMDA activé augmente d'avantage l'influx de Ca^{2+} qui cause la dépolarisation de la membrane cellulaire. Dans les phases avancées de l'inflammation chronique, l'augmentation de la synthèse des neuromédiateurs, des facteurs de croissance et de canaux ioniques peut conduire à des changements phénotypiques au niveau du système nociceptif (ex : la synthèse de la substance P par les fibres A β de gros calibre) (Kidd et Urban, 2001).

5.2. Modulation de la douleur – facilitation ou inhibition, voies et médiateurs impliqués

La douleur n'est pas le simple effet de la stimulation des fibres sensorielles, mais le résultat d'un équilibre entre deux systèmes complexes, l'un qui facilite la transmission des messages nociceptifs et l'autre, compensateur, qui inhibe cette transmission. Un grand nombre de médiateurs et de voies sont impliqués, autant en périphérie qu'au niveau du système nerveux central (**Figure 10**). Dans les situations pathologiques, cet équilibre est changé en faveur de la transmission excitatrice (suite à la sensibilisation périphérique et centrale et à la défaillance des mécanismes inhibiteurs), ce qui peut expliquer les phénomènes comme l'allodynie, l'hyperalgésie et la douleur spontanée.

Un réseau très complexe de voies descendantes (facilitatrices ou inhibitrices) projetant des centres nerveux supérieurs joue un rôle crucial dans le contrôle de la douleur. Les médiateurs impliqués dans ces voies peuvent parfois causer des effets opposés, en fonction du type de récepteur stimulé et du site d'action (**Figure 10**) (Millan, 2002) :

- les opioïdes endogènes (la β -endorphine, les enképhalines et la dynorphine), les médiateurs les plus importants des voies descendantes inhibitrices (origine : l'aire grise périaqueducatale) avec leurs récepteurs: μ , δ et κ (agissent en pré- et post-synaptique au niveau de la corne dorsale de la moelle); en plus de l'effet antinociceptif via le récepteur κ , la dynorphine a aussi des effets pro-nociceptifs suite à l'activation des récepteurs NMDA dans la moelle épinière, ce qui peut contribuer en partie aux effets hyperalgésiques à long terme des analgésiques opioïdes (Simonnet et Rivat, 2003);

- inhibition de la douleur: l'acide γ -amino-butérique (GABA), la glycine et les cannabinoïdes endogènes;

- facilitation : le glutamate, le CGRP, la substance P, la cholécystokinine, l'histamine et les prostaglandines;

- voies noradrénergiques antinociceptives relayées par les récepteurs α_2 (origine : locus coeruleus) ou pro-nociceptives (via les récepteurs α_1) et voies sérotoninergiques inhibitrices (récepteurs 5-HT₃, 5-HT_{1B}) et facilitatrices (récepteurs 5-HT_{1A}) (Millan, 2002);

- le monoxyde d'azote ayant aussi des effets opposés (anti- ou pro-nociceptifs);

- rôle possible de la dopamine dans la nociception: inhibition via le récepteur D₂ (Tricklebank et al., 1984) et facilitation via le récepteur D₁ (Gao et al., 2000). Rôle de la galanine (GAL) (inhibition ou facilitation) par l'intermédiaire de ces récepteurs (GAL₁, GAL₂ et GAL₃) (Millan, 2002);

- l'acétylcholine : effets antinociceptifs (amplification de la réponse α_2 noradrénergique) et probablement pro-nociceptifs (excitation des afférences sensorielles primaires) (Millan 2002);

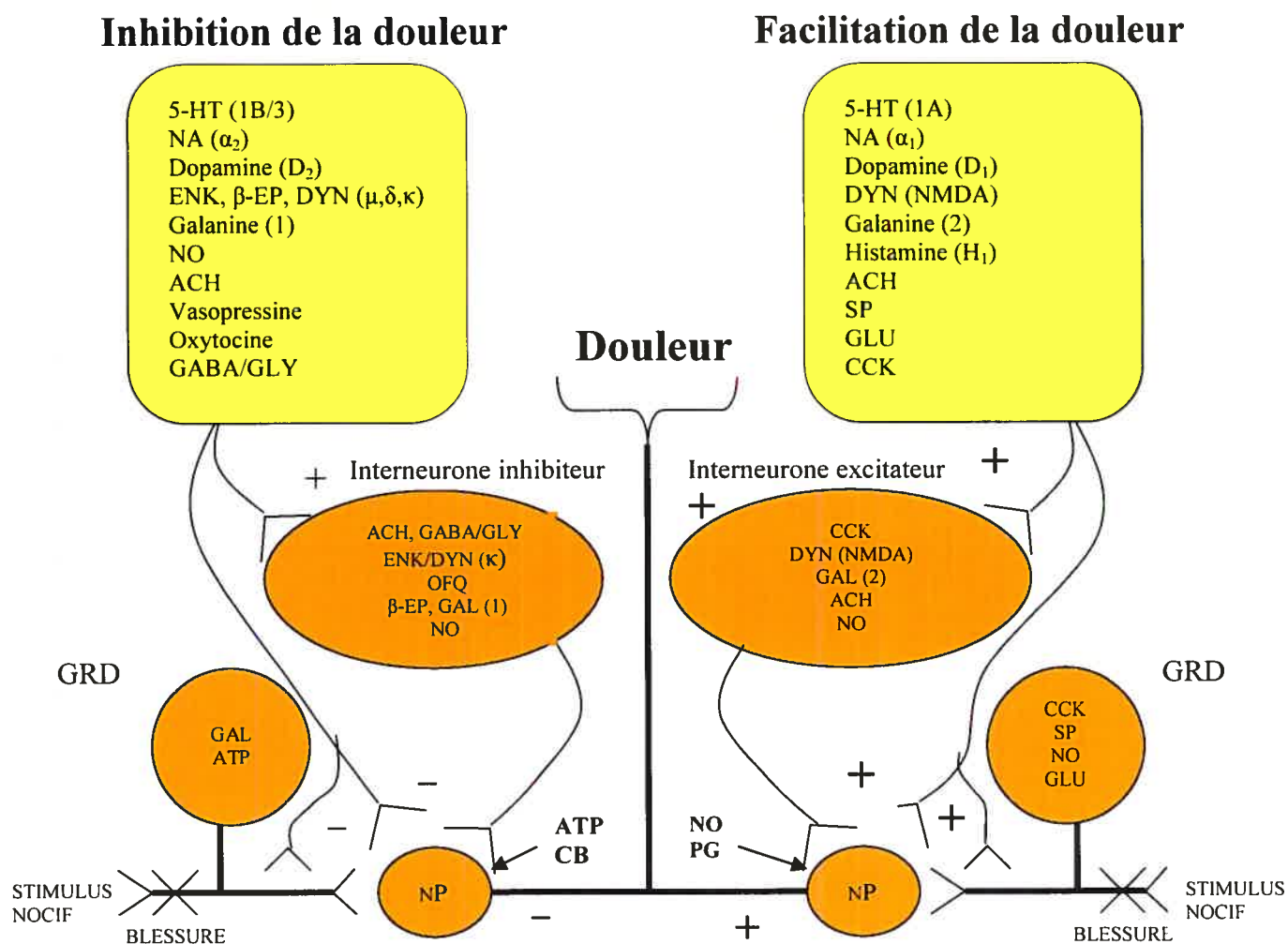


Figure 10 Les voies descendantes et les médiateurs impliqués dans la modulation de la douleur, facilitent ou inhibent le passage des messages nociceptifs vers les centres supraspinaux (5-HT, sérotonine ; NA, noradrénaline ; GABA, acide gaba amino butyrique ; ENK, enképhaline ; β-EP, β endorphine ; DYN, dynorphine ; NO, monoxyde d'azote; ACH, acétylcholine ; SP, substance P, GLU, glutamate, CCK, cholécystokinine ; OFQ, orphanine FQ ; NT, neurotensine ; ATP, adénosine triphosphate ; PG, prostaglandines ; CB, cannabinoïdes ; GRD, ganglion de la racine dorsale ; NP, neurone de projection (adapté de Millan, 2002)

6. La douleur neuropathique

6.1. Classification

Même s'il y a plusieurs critères (étiologie, localisation, mécanismes physiopathologiques, réponse aux différentes classes de médicaments), l'approche traditionnelle pour classer la douleur neuropathique est basée sur l'étiologie et la localisation anatomique.

La douleur neuropathique se retrouve dans un grand nombre de situations pathologiques : le diabète, les cancers, les déficiences immunes, les affections d'origine ischémique ou traumatique, les complications après chimiothérapie ou radiothérapie, certaines maladies virales, les complications après interventions chirurgicales, etc. Les sites anatomiques des lésions qui causent la douleur neuropathique sont multiples, situés tout au long de l'axe nerveux, à partir des récepteurs périphériques jusqu'aux centres corticaux (**Tableau 3**).

Tableau 3 Classification de la douleur neuropathique en fonction de l'étiologie et de la localisation (adapté de Jensen et al., 2001)

Système nerveux périphérique	Moelle épinière	Cerveau
Neuropathie diabétique	Sclérose en plaque	Accident cérébrovasculaire
Herpes zoster	Traumatisme de la moelle	Sclérose en plaque
Lésions de nerfs	Maladies malignes	Maladies malignes
Amputations	Syringomyélie	Syringomyélie
Plexopathies	Infarctus de la moelle épinière	
Radiculopathies		
Maladies malignes		
Névralgie trigéminal		

6.2. Douleur neuropathique – signes cliniques

Indépendamment de la grande variété d'étiologies et de la topographie, le tableau clinique de la douleur neuropathique est en général commun. En fonction de la présence ou de l'absence d'un stimulus, on trouve (Jensen et al., 2001) :

- la douleur spontanée (en absence d'un stimulus), qui peut être continue ou paroxystique;
- la douleur évoquée (dépendante d'une stimulation).

Le tableau clinique chez l'humain est complexe et comprend une grande variété de symptômes :

- *l'allodynie* (douleur produite par un stimulus normalement non douloureux)
- *l'hyperalgésie* (réponse exagérée à un stimulus douloureux)
- *le paroxysme* (douleur sous forme de choc électrique, déclenchée en général par des stimuli non douloureux)
- *les paresthésies* (des sensations anormales mais non douloureuses, supposées d'être générées par des décharges dans les fibres A β)
- *les dysesthésies* (des sensations désagréables mais pas nécessairement douloureuses, spontanées ou après stimulation)
- *la douleur référée* (douleur perçue au niveau des tissus cutanés causée par une douleur au niveau des tissus profonds ou des viscères)

Comme la composante affective est très difficile à mesurer, surtout chez les animaux, c'est la composante sensorielle (la nociception) qui est en en général évaluée dans les études précliniques et cliniques. Les paramètres les plus étudiés dans les

différents modèles animaux de douleur neuropathique sont l'hyperalgésie et l'allodynie.

L'hyperalgésie (réponse exagérée à un stimulus douloureux, thermique ou mécanique) peut être *primaire* (augmentation de la sensibilité aux stimuli mécaniques et thermiques qui survient au site de la lésion) ou *secondaire* (augmentation de la sensibilité aux stimuli mécaniques seulement et qui survient au tissu avoisinant la lésion). L'hyperalgésie est transmise par les fibres C et elle reflète en général la sensibilisation périphérique des récepteurs polymodaux (Yeomans et Proudfit, 1996).

L'allodynie (douleur produite par un stimulus mécanique ou thermique qui est normalement non douloureux – diminution du seuil de la sensibilité à la douleur). L'allodynie est un phénomène central relayé par les fibres myélinisées A δ et A β (Woolf et al., 1992; Shortland et al., 1997).

6.3. Le traitement de la douleur chronique

Le traitement de la douleur chronique associée aux différentes pathologies reste encore un problème majeur de nos jours. Les médicaments présentement utilisés: les anti-inflammatoires non stéroïdiens (les inhibiteurs des cyclooxygénases, COX-1 et COX-2) et les opioïdes. Entre les deux types de douleur (nociceptive et neuropathique), la douleur neuropathique est très réfractaire aux traitements actuels, y compris le traitement avec les opioïdes. En plus, l'usage des opioïdes à long terme est associé à des effets secondaires redoutables bien connus (tolérance, dépendance, neurotoxicité, etc.). Malgré l'utilisation récente des médicaments adjuvants comme les antidépresseurs

(chlorimipramine, amytriptyline), les anticonvulsivants (gabapentine, prégabaline, phénytoïne) (Frampton et Scott, 2004), les antiarythmiques, qui parfois sont efficaces, la douleur neuropathique reste en général difficile à traiter. Ceci explique pourquoi la douleur neuropathique suscite encore beaucoup d'intérêt pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques, incluant les antagonistes des récepteurs TRPV1/TRPV2 de la capsaïcine (Pomonis et al., 2003; Suh et al., 2003), P2X des purines (McGaraughty et al., 2003), NMDA (LoGrasso et McKelvy, 2003; Layer et al., 2004) et AMPA (Blackburn-Munro et al., 2004) du glutamate, CB₁ et CB₂ des cannabinoïdes (Cravatt et Lichtman, 2004), B₁ et B₂ des kinines (Dai-Shi Su et al., 2003; Gougat et al., 2004), TrkA, TrkB et P75 des neurotrophines (Owolabi et al., 1999; Zahn et al., 2004), les inhibiteurs des canaux ASIC (canaux ioniques modulés par le pH acide) (Ugawa et al., 2002; Jones et al., 2004), de la COX-2 (Bingham et al., 2004), des canaux Na⁺ (LoGrasso et McKelvy, 2003; Lai et al., 2003; Priest et al., 2004), et les antioxydants (Ametov et al., 2003; Ziegler et al., 2004).

6.4. Modèles animaux de douleur neuropathique

Dans ce contexte, les modèles animaux utilisés en recherche tiennent une place essentielle et indispensable qui sert à élucider les mécanismes très complexes impliqués dans la physiopathologie de la douleur et à tester l'efficacité des nouveaux composés. Les modèles animaux choisis dépendent du type de douleur étudié (aiguë ou chronique, nociceptive ou neuropathique) et du type de stimulus appliqué (de longue durée ou de courte durée, stimulus thermique, mécanique ou chimique). La **Figure 11** présente une brève classification en fonction des critères énumérés.

Modèles de douleur – Classification

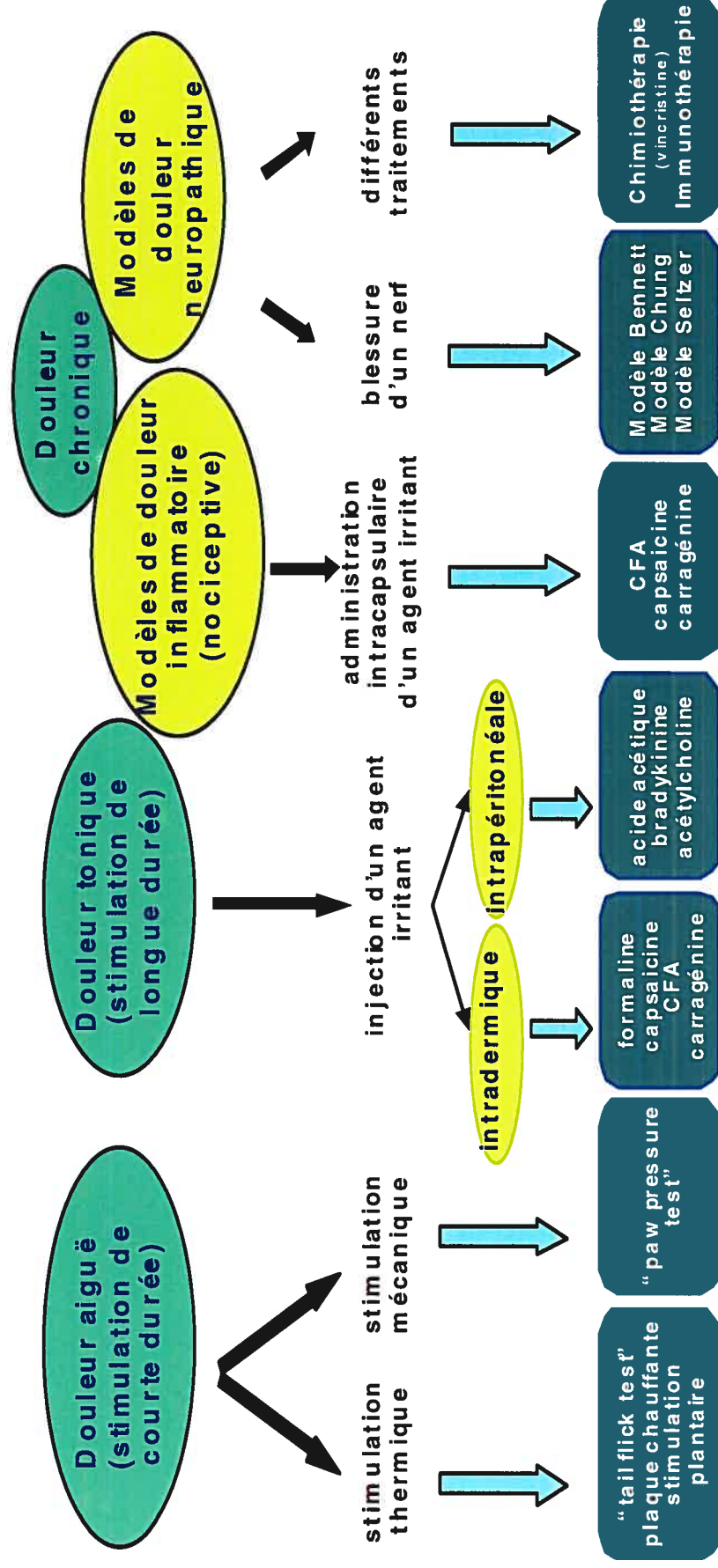


Figure 11 Classification des modèles de douleur en fonction du type de stimulus appliqué (CFA, adjuvant de Freund, « complete Freund's adjuvant »)

Le but de notre projet est l'étude de l'expression des récepteurs B₁ et B₂ des kinines et l'évaluation des traitements avec des antagonistes spécifiques de ces deux récepteurs dans un modèle de neuropathie chez le rat.

Plusieurs modèles de douleur neuropathique ont été décrits dans la littérature et on peut les diviser en fonction du mécanisme d'induction de la neuropathie.

A) Neuropathie induite par la lésion d'un nerf (en général le nerf sciatique) :

- 1) la constriction chronique du nerf sciatique (*Chronic constriction injury- CCI*) – le modèle de Bennett (Bennett et Xie, 1988) : 4 ligatures non serrées autour du nerf sciatique, espacées d'un mm;
- 2) la ligature partielle du nerf sciatique (*Partial sciatic nerve ligation – PSL*) – le modèle de Seltzer (Seltzer et al., 1990) : ligature partielle (de 30 à 50% de la circonférence) et serrée du nerf sciatique;
- 3) la ligature spinale (*Spinal nerve ligation – SNL*) – le modèle de Kim et Chung (Kim et Chung, 1992) : ligature serrée des nerfs spinaux L5 et L6;
- 4) le modèle Decosterd, « *spared nerve injury* » (Decosterd et Woolf, 2000) – ligature et axotomie des branches tibiale et péronéale (deux des trois branches terminales du nerf sciatique), en laissant la troisième (la branche surale) intacte;
- 5) « *The crush injury of the sciatic nerve* » - tout le nerf ou seulement des branches sont écrasées avec des pinces hémostatiques pendant 30 secondes (Decosterd et al, 2004).

Les modèles de douleur neuropathique suite à une lésion du nerf sciatique sont souvent utilisés et les plus répandus sont le modèle de Chung (la ligature spinale L5 et L6 du nerf sciatique – SNL), le modèle de Bennett (la constriction chronique du nerf

sciatique – CCI) et le modèle de Seltzer (la ligature partielle du nerf sciatique) (voir **Figure 12**). Les symptômes cliniques sont communs pour les trois modèles et comprennent toutes les composantes cliniques de la douleur neuropathique : l'allodynie, l'hyperalgésie et la douleur spontanée. Les seules différences se manifestent au niveau du temps d'apparition et de l'amplitude des signes cliniques.

Pour notre projet, nous avons choisi le modèle de Seltzer (la ligature partielle et serrée du nerf sciatique – **Figure 13**), motivé par les critères suivants :

- pour le modèle de Chung, la chirurgie est complexe et invasive, ce qui peut avoir une influence sur l'induction du récepteur B_1 (à cause du traumatisme et de l'inflammation suite à la chirurgie);
- la variabilité entre les animaux est plus grande pour le modèle de Bennett et aussi l'amplitude des réponses aux stimulations est moins élevée (on ne voit pas une diminution assez évidente du seuil pour l'allodynie et pour l'hyperalgésie) (Kim et al., 1997);
- chirurgie très simple et très rapide pour le modèle de Seltzer, traumatisme minimal pour les animaux, pourcentage excellent de réponses après la chirurgie.

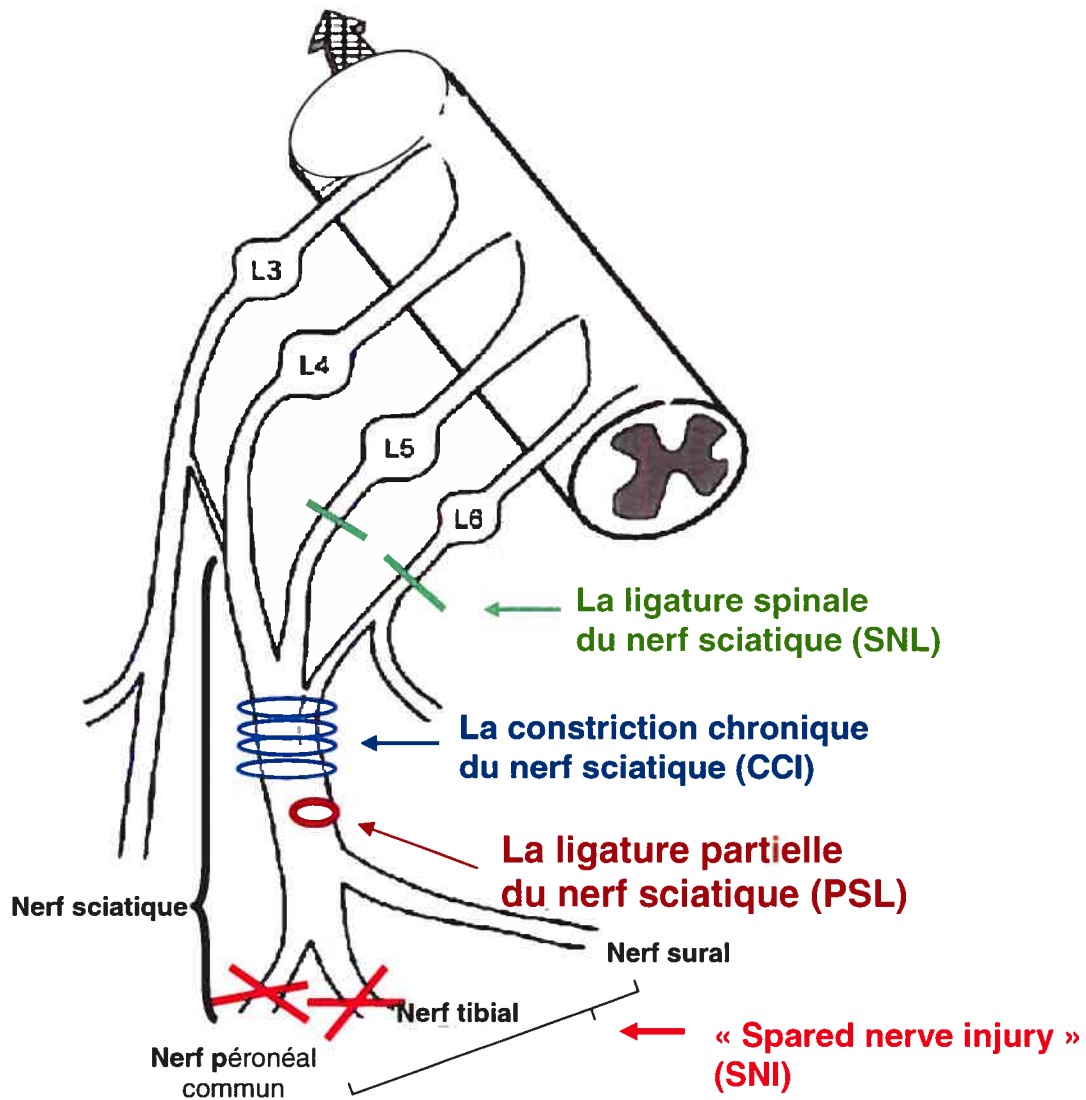


Figure 12 Les principaux modèles de douleur neuropathique : la ligature spinale L5, L6 (le modèle Chung); la constriction chronique (le modèle Bennett); la ligature partielle du nerf sciatique (modèle Seltzer); le modèle Decosterd (« spared nerve injury »).

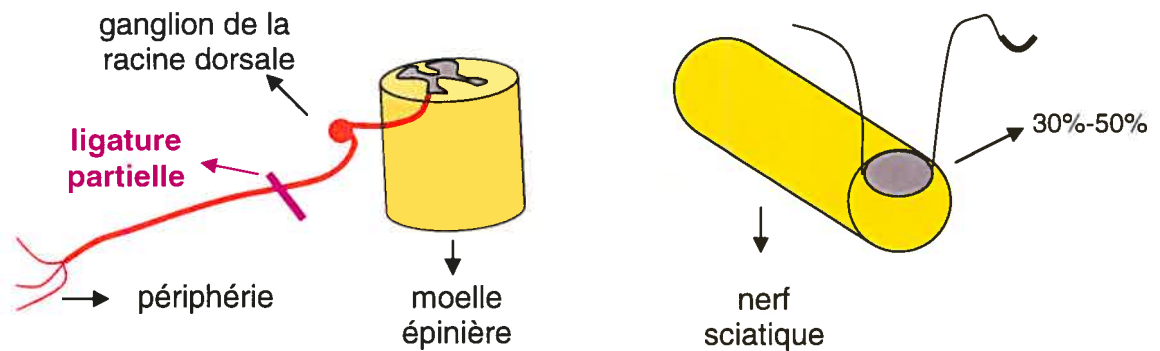


Figure 13 Le modèle de Seltzer (la ligature partielle du nerf sciatique) : ligature partielle et serrée de 30 à 50% de la circonférence du nerf sciatique (voir aussi **Figure 12**)

B) Neuropathie diabétique – une complication majeure du diabète de type I et II, qui se manifeste par l’allodynie, l’hyperalgésie, la douleur spontanée et la perte de la sensibilité. Modèles de neuropathie diabétiques :

- diabète induit par le traitement avec la streptozotocine (STZ), 65mg/kg, ip;
- diabète de type I spontané chez le rat BB (Like et al., 1982);
- diabète de type I auto-immune, associé avec le développement d’auto -anticorps contre l’insuline (les souris NOD – « nonobese diabetic ») (Makino et al., 1980).

C) Neuropathies après chimiothérapie (ex : vincristine) ou immunothérapie.

6.5. Douleur neuropathique – mécanismes physiopathologiques

Les mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la douleur neuropathique sont très complexes et ils agissent aux différents endroits (seuls ou ensemble) et à différents moments sur le système nerveux périphérique et central (Zimmermann, 2001) :

a) *en périphérie*

- sensibilisation périphérique se manifestant d'habitude par une réduction du seuil à la stimulation thermique - hyperalgésie) (Kandel et Schwartz, 2000);
- accumulation de canaux Na^+ au niveau des nerfs endommagés (Devor, 1994; England et al., 1996) et réduction de canaux potassiques;
- sensibilisation du système nerveux sympathique (« sympathetically maintained pain ») (Xie et al., 1995);
- la croissance des fibres intactes (« collateral sprouting ») dans les territoires cutanés dénervés
- décharges ectopiques des axones endommagés (à partir du 'neuroma' à l'endroit de la lésion) (Zimmermann, 2001).

a) *système nerveux central:*

- sensibilisation centrale causée par les décharges ectopiques qui arrivent des terminaisons afférentes endommagées (relayé par le NMDA et les neurokinines), ce qui cause l'allodynie (Kidd et Urban, 2001) ;
- désinhibition de la nociception causée par une diminution des mécanismes inhibiteurs : perte des interneurons inhibiteurs, réduction dans l'expression des transmetteurs ou des récepteurs impliqués dans les voies inhibitrices (ex : perte des récepteurs opioïdes) (Zimmermann, 2001);

- réorganisation structurelle au niveau de la corne dorsale avec le bourgeonnement des fibres A β vers les cellules de la couche II, qui normalement reçoivent seulement des afférences C et A δ ; ce phénomène a été constaté dans plusieurs modèles de neuropathie comme le modèle de constriction chronique et de la ligature spinale du nerf sciatique (Woolf et al., 1992; Shortland et al., 1997). Ce phénomène constitue l'une des hypothèses pouvant expliquer l'allodynie associée à la douleur neuropathique.

7. Les kinines dans la douleur

L'administration de la BK peut induire tous les signes cardinaux de l'inflammation : douleur (dolor), chaleur (calor), érythème (rubor) et œdème (tumor). La BK produit la vasodilatation des vaisseaux précapillaires, stimulant la production de monoxyde d'azote (NO) et de prostacycline (PGI₂), et la vasoconstriction de vaisseaux postcapillaires (action directe sur le muscle lisse) (Bhoola et al., 1992; Couture et al., 2001).

Le récepteur B₂ est constitutif, caractérisé par une désensibilisation et une internalisation rapide. L'activation du récepteur B₂ par la BK ou la KD cause la douleur par la stimulation directe des nocicepteurs situés sur les fibres C et A δ qui innervent les tissus (Dray et al., 1997). Le récepteur B₂ active la phospholipase C (PLC) qui génère l'inositol triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol par le clivage des phospholipides transmembranaires (Francel et al., 1987). L'IP₃ stimule la libération du calcium intracellulaire tandis que le diacylglycérol active la protéine kinase C (PKC) qui est impliquée dans la phosphorylation de différentes protéines intracellulaires parmi lesquelles on trouve les canaux sodiques résistants à la térodotoxine. Ces effets ont comme résultat une augmentation de la conductance Na⁺ qui favorise la dépolarisation de la membrane cellulaire et l'activation des canaux calciques modulés par le voltage. L'augmentation du niveau de calcium intracellulaire active l'oxyde nitrique synthase (NOS) et la libération des neuropeptides. La BK facilite la libération de neuropeptides pro-inflammatoires tels que la SP et le CGRP par les terminaisons dendritiques périphériques des fibres C dans différents tissus et organes chez plusieurs espèces (MacLean et al., 1990; Geppetti, 1993).

En plus, la BK induit des effets indirects par l'activation de la phospholipase A_2 , stimulant la formation des autres médiateurs impliqués dans l'inflammation et la douleur, comme les prostaglandines, les leukotriènes et certaines cytokines (les interleukines IL- 1β , IL-6, IL-8). Les prostaglandines, à leur tour, favorisent l'augmentation de la libération de neuropeptides sensoriels induits par la BK (Calixto et al., 2001). Ces effets contribuent à la sensibilisation des nocicepteurs thermiques.

Il semble que la sensibilisation à la stimulation thermique est due à l'activation de l'isoforme ϵ de la protéine kinase C (PKC ϵ) (Cesare et al., 1999), hypothèse soutenue par l'hypoalgésie à certains stimuli nocifs chez la souris dont le gène a été invalidé pour cette protéine (Khasar et al., 1999). La PKC ϵ peut être une voie intracellulaire commune pour les récepteurs B_1 des kinines et TRPV1 de la capsaïcine. Premkumar et Ahern ont démontré que la BK induit des courants impliquant le récepteur TRPV1 dans les neurones sensoriels par un mécanisme qui implique l'activation de la PKC ϵ (Premkumar et Ahern, 2000). En plus, des observations suggèrent des interactions entre le récepteur B_2 et le récepteur vanilloïde TRPV1, via des produits de la lipooxygénase, comme les leukotriènes (la réponse hyperalgésique à la bradykinine est bloquée par des inhibiteurs de la PLA $_2$, de la lipoxygénase et par les antagonistes de la capsaïcine) (Hwang et al., 2000). Ces mécanismes peuvent expliquer l'effet inhibiteur des antagonistes du TRPV1 et des kinines sur l'hyperalgésie thermique.

L'utilisation des antagonistes sélectifs pour le récepteur B_2 confirme le rôle critique joué par les kinines dans la nociception, surtout dans la douleur inflammatoire. L'efficacité de ces antagonistes (peptidiques, semi-peptidiques ou non-peptidiques) a été prouvée dans différents modèles de douleur : l'hyperalgésie thermique induite par la

carragénine, le 'writhing test' (injection intrapéritonéale d'acide acétique, d'acétylcholine ou de bradykinine), le modèle de la formaline et l'injection de la capsaïcine, l'hyperalgésie induite après l'injection de l'adjuvant de Freund, la douleur neuropathique (hyperalgésie thermique) après la constriction chronique du nerf sciatique – modèle de Bennett (1999; Burgess et al., 2000; Levy et Zochodne, 2000). En plus, les souris dont le gène pour le récepteur B₂ a été invalidé, sont moins susceptibles de développer une hyperalgésie thermique après l'injection de la carragénine (Boyce et al., 1996).

Le récepteur B₁ est sous-exprimé dans les conditions physiologiques normales; il est induit dans des conditions inflammatoires et connaît une désensibilisation et une internalisation limitée associée à une dissociation lente du ligand, ce qui peut suggérer son implication dans la phase chronique de la réponse inflammatoire et de la douleur (Dray, 1997; Couture et al., 2001). L'induction et la sur-expression du récepteur B₁ dans différentes conditions de stress (inflammation, infections) implique l'activation de plusieurs voies de signalisation (les MAPKs – « mitogen-activated protein kinase »; la PKC; la PI3-K – phosphatidylinositol-3 kinase) associées à la modulation des facteurs de transcription (le facteur nucléaire κ B, NF- κ B; la protéine d'activation 1, AP-1; « c-AMP response element-binding », CREB) qui sont essentiels dans la régulation de l'expression du récepteur B₁ (Calixto et al., 2004).

En général, le récepteur B₁ est associé aux mêmes voies de signalisation que le récepteur B₂: activation des phospholipases C et A₂ conduisant à l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire, l'activation de l'enzyme NOS, l'activation de la PKC et la relâche des prostaglandines (Austin et al., 1997; Prat et al., 2000; Basc and et al., 2003).

Même si le rôle joué par le récepteur B₁ dans la douleur a été un sujet controversé, il existe des données très claires suggérant son implication dans la nociception.

Des études ont démontré la présence de l'ARNm du récepteur B₁ dans les ganglions de la racine dorsale de rat et de souris (Seabrook et al., 1997; Levy et Zochodne, 2000; Yamaguchi-Sase et al., 2003). De même, le récepteur B₁ a été localisé par immunohistochimie dans le ganglion du trijumeau et le ganglion de la racine dorsale chez le rat, la souris et le singe (Ma et al., 2000; Wotherspoon et Winter, 2000; Shughrue et al., 2003; Rashid et al., 2004), exprimé surtout sur les fibres C contenant le CGRP (fibres sensibles au NGF) ou marquées avec l'isolectine B4 (fibres sensibles au GDNF) (Wotherspoon et Winter, 2000; Ma, 2001). La présence du récepteur B₁ dans la moelle épinière a été confirmée par l'expression de l'ARNm chez plusieurs espèces (rat, souris, singe et humain), tandis que les études en immunohistochimie ont identifié le récepteur B₁ dans les couches superficielles (liées à la nociception) de la corne dorsale (Wotherspoon et Winter, 2000; Ma et Heavens, 2001; Shughrue et al., 2003).

Les souris dont le gène pour le récepteur B₁ a été invalidé, montrent une hypoalgésie dans les modèles de la formaline et de la capsaïcine et aussi à la stimulation thermique (Pesquero et al., 2000). Le récepteur B₁ est induit très rapidement après l'injection intraplantaire du zymozan et les antagonistes du récepteur B₁, le des-Arg⁹-Leu⁸-BK et le R715 (AcLys[D-betaNal⁷, Ile⁸]des-Arg⁹-BK), bloquent l'hyperalgésie mécanique dans ce modèle (Bélichard et al., 2000). Contrairement à la théorie qui soutient l'implication du récepteur B₁ surtout dans la phase chronique de l'inflammation et de la douleur, ces données suggèrent un rôle pour le récepteur B₁ dans la douleur aiguë.

L'utilisation de la souris dont le gène pour le récepteur B₁ a été invalidé (knock-out), confirme aussi l'implication de ce récepteur dans la douleur chronique, car ces souris manifestent une diminution de l'hyperalgésie thermique et de l'allodynie mécanique induites par l'injection de l'adjuvant de Freund (Ferreira et al., 2001). Ces observations confirment les effets analgésiques des antagonistes du récepteur B₁ sur la nociception dans le même modèle, chez différentes espèces (Perkins et al., 1993; Panesar et al., 1998; Mason et al., 2002).

Le récepteur B₁ semble aussi être impliqué dans la douleur neuropathique. L'immunoréactivité pour le récepteur B₁ et son ARNm sont augmentés dans le ganglion de la racine dorsale de rat et de souris après la constriction chronique du nerf sciatique (Petersen et al., 1998; Eckert et al., 1999; Levy et Zochodne, 2000; Yamaguchi-Sase et al., 2003; Rashid et al., 2004). En plus, l'antagoniste du récepteur B₁, le des-Arg⁹-Leu⁸-BK, bloque l'hyperalgésie thermique 14 jours après la constriction chronique du nerf sciatique chez le rat (Levy et Zochodne, 2000).

8. Objectifs et approches expérimentales

Objectifs: (1) Établir la distribution des récepteurs B_1 et B_2 des kinines dans la moelle épinière et dans le ganglion de la racine dorsale du rat normal; (2) Étudier les changements dans l'expression de ces récepteurs dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat; (3) Évaluer les effets de traitements avec des antagonistes sélectifs des récepteurs B_1 et B_2 des kinines sur l'hyperalgésie thermique et l'allodynie mécanique et au froid développées suite à la ligature du nerf sciatique.

Approches expérimentales: (1) Autoradiographie quantitative des récepteurs des kinines sur la moelle épinière et les ganglions de la racine dorsale de rats témoins et de rats ayant subi une ligature partielle du nerf sciatique gauche (modèle Seltzer); (2) Traitements avec des antagonistes non peptidiques des récepteurs B_1 et B_2 par voie sous-cutanée et évaluation des effets sur l'allodynie tactile (filaments de von Frey) et au froid (application d'acétone) et l'hyperalgésie thermique (stimulation plantaire).

Cette étude a fait l'objet d'un article qui est présenté au **CHAPITRE II:**

Petcu M, Ongali B, Dias JP, Pruneau D, Couture R. (2004) Role of kinin B_1 and B_2 receptors in a rat model of neuropathic pain (à soumettre dans Pain)

DEUXIÈME CHAPITRE

ARTICLE : ROLE OF KININ B₁ AND B₂ RECEPTORS IN A RAT

MODEL OF NEUROPATHIC PAIN

Role of kinin B₁ and B₂ receptors in a rat model of neuropathic pain

Mihai Petcu¹, Brice Ongali¹, Jenny Pena Dias¹, Didier Pruneau², Réjean Couture^{1*}

¹Département de Physiologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

²Centre de Recherche, Laboratoires Fournier SA, 50 rue de Dijon, 21121 Daix, France

Running Title: Kinin receptors in neuropathy

Number of text pages: 26

Number of Figures: 6

*Correspondence to: Dr Réjean Couture

Phone: (514) 343-7060

Fax: (514) 343-2111

E-mail: rejean.couture@umontreal.ca

Abstract

Kinin B₁ and B₂ receptor (R) gene expression (mRNA) is increased in the sensory system after peripheral nerve injury. Thus this study aims at determining the role of these receptors in a rat model of neuropathic pain. This was addressed by measuring the densities of B₁R and B₂R binding sites in the spinal cord and dorsal root ganglia (DRG) by quantitative autoradiography, and by evaluating the effects of selective non-peptide antagonists at B₁R (LF22-0542) and B₂R (LF16-0687) on pain behavior after partial ligation of the left sciatic nerve. Increases of B₁R binding sites were seen in superficial laminae of the ipsi- and contralateral spinal cord at 2 and 14 days while B₂R binding sites were increased on the ipsilateral side at 2 days and on both sides at 14 days. In DRG, B₁R and B₂R binding sites were significantly increased at 2 days (ipsilateral) and 14 days (ipsi- and contralateral). Whereas tactile allodynia started to develop progressively from 2 to 14 days post-ligation, the occurrence of cold allodynia and thermal hyperalgesia was significant only from 8 days and 14 days post-ligation, respectively. Between 14-21 days after sciatic nerve ligation, thermal hyperalgesia was blocked by LF22-0542 (10 mg/kg, s.c.) and LF16-0687 (3 mg/kg, s.c.), yet both antagonists had no effect on tactile and cold allodynia. Data suggest that both kinin receptors may represent promising therapeutic targets for specific thermonociceptive abnormalities in neuropathic pain.

Keywords: Kinin receptors, spinal cord, dorsal root ganglia, neuropathy, hyperalgesia, allodynia

1. Introduction

Kinins are important mediators implicated in the pathogenesis of inflammation and pain. They are rapidly released from damaged tissues by proteolytic cleavage of precursor kininogens, under the action of tissue and plasma kallikreins. The biological effects of these peptides are mediated by the activation of two G protein-coupled receptors (R), denoted as B₁R and B₂R. Bradykinin (BK) and Lys-BK (kallidin) are the natural agonists for the B₂R while their metabolites desArg⁹-BK and desArg¹⁰-kallidin are potent and selective agonists for the B₁R (Regoli et al., 1993; Couture et al., 2001).

B₂R are constitutively expressed in most tissues and they have been localized to superficial laminae of the spinal cord (together with BK) and in dorsal root ganglia (DRG) associated with the sensory nervous system (Lopes et al., 1993; 1995; Lopes and Couture, 1997; Murone et al., 1997; Seabrook et al., 1997; Petersen et al., 1998; Eckert et al., 1999; Cloutier et al., 2002; Lee et al., 2002). Although the B₁R is constitutively present in some species (canine, mouse) (Lortie et al., 1992; DeWitt et al., 1994; Nsa Allogho et al., 1998; Su et al., 2000), it is generally considered under-expressed in healthy tissues and animals. This receptor is inducible and overexpressed in inflammatory conditions, following exposure to bacterial endotoxins, cytokines (interleukin-1, tumor necrosis factor- α) and growth factors (Marceau and Bachvarov, 1998; Marceau, 1995; Calixto et al., 2000; Couture et al., 2001). Recent studies support the presence of a basal expression of B₁R in the rat, primate and human spinal cord and DRG at protein (Ma et al., 2000; Wotherspoon and Winter, 2000; Ma and Heavens, 2001) and mRNA levels (Levy and Zochodne, 2000; Ma et al., 2000; Shughrue et al., 2003).

Peripheral nerve injury may result in chronic neuropathic pain characterized by spontaneous pain, hyperalgesia and allodynia (Jensen et al., 2001). B₁R and B₂R gene expression is up-regulated in different models of neuropathic pain (Petersen et al., 1998; Levy and Zochodne, 2000) and inflammation (Petersen et al., 1998; Fox et al., 2003) and the activation of these receptors is thought to promote nociceptor sensitization (Couture et al., 2001).

In this study, we addressed the hypothesis that: a) the expression of B₁R and B₂R receptors is also increased at protein level in the rat spinal cord and lumbar DRG after sciatic nerve ligation; b) selective B₁R and B₂R antagonists may reduce pain behavior associated with this model of neuropathy. This was achieved by measuring densities of B₁R and B₂R binding sites by quantitative autoradiography and by assessing thermal hyperalgesia, tactile and cold allodynia after plantar stimulation prior to and following subcutaneous administration of non-peptide selective antagonists at B₁R (LF22-0542) and B₂R (LF16-0687).

2. Method

2.1. Animals

The experiments were performed on male Sprague-Dawley rats (225-250g) purchased from Charles River (St-Constant, Quebec Canada). They were housed two per cage, in room under controlled temperature (23°C), humidity (50%) and lighting (12/12h light/dark cycle), with food (Charles River Rodent) and water available *ad libitum*. All animal procedures adhered to the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP and approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal.

2.2. Partial sciatic nerve ligation

The rats were previously anesthetized with sodium pentobarbital (65 mg/kg i.p.) and the sciatic nerve ligation was performed according to the original description of Seltzer et al. (1990). Briefly, the left sciatic nerve was exposed at the upper-thigh level and a tight ligation of the dorsal third to half thickness of the nerve was made with 8-0 silk, distal to the insertion of the posterior biceps-semitendinosum muscle.

2.3. Nociceptive behaviour

2.3.1. Tactile allodynia

Tactile allodynia was assessed by measuring withdrawal thresholds after stimulation of the hind paw with von Frey filaments (bending forces ranging from 2 g to 26 g). Rats were placed in a metallic cage with a mesh metal floor and allowed to adapt for 20-30 min. Starting with the lowest force (2g), filaments were applied perpendicularly to the mid-plantar surface of the hind paw with a pressure that caused the filament to buckle. Each filament was applied 10 times (6-8 s per stimulation, with 1-2 min between

stimulations to avoid sensitization) and 5 withdrawals or more from 10 (more than 50%) was considered a positive response (the threshold). Absence of a response (less than 5 withdrawals) prompted use of the next filament of increasing weight. Control rat response was between 12-15 g.

2.3.2 Cold allodynia

Cold allodynia was measured using acetone applications as described by Choi et al. (1994). With the rat placed under a transparent plastic box on a mesh metal floor, acetone bubbles formed at the end of a tube connected to a syringe were applied 5 times (at 5 min intervals) to the plantar surface of the hind paw. A significant increase in the frequency of foot withdrawals in response to acetone application was interpreted as cold allodynia.

2.3.3. Thermal hyperalgesia

The development of thermal hypersensitivity associated with neuropathic pain was assessed by measuring changes in the paw-withdrawal latency to a noxious heat stimulus aimed to the ventral aspect of the paw using the plantar stimulation (Hargreaves' test). Rats were placed within a plexiglass enclosure on a transparent glass floor and allowed to acclimatize for 20-30 min. A heat source was applied beneath the plantar surface of the hind paw. Thermal nociceptive threshold was defined as the latency (seconds) between the heat stimulus onset and paw withdrawal using a feedback-controlled shut-down unit. A cut-off time of 30 s was used to avoid tissue damage. Each paw was tested three times alternatively at minimum intervals of 3 min between stimulation to avoid sensitization of the hind paw. Mean values of each paw were used as the thermal threshold. Hyperalgesia was considered at values of 9 s or less.

2.4. Treatment with kinin receptor antagonists

The selective B₁R antagonist LF22-0542 and B₂R antagonist LF16-0687 mesylate were dissolved in 0.9% saline and administered subcutaneously at doses of 3 and 10 mg/kg (LF22-0542) and 3mg/kg (LF16-0687), respectively. Rats were tested 1 hour before and 1, 3 and 24 hours after injection.

2.5. Tissue preparation for autoradiography

Rats were euthanized by CO₂ inhalation at 2 and 14 days after nerve ligation and subjected to dorsal laminectomy. Spinal cords (lumbar segments L4 to L6) and dorsal root ganglia L4, L5 and L6 were rapidly removed and frozen in 2-methylbutane cooled at -45 to -55°C with liquid nitrogen and then stored at -80°C until use. Matched spinal cord segments (L4 to L6) from the three groups of rats (control, 2 days and 14 days after ligation) were mounted together in a gelatin block. The ganglia were separated in 5 groups (control, ipsilateral 2 days, contralateral 2 days, ipsilateral 14 days and contralateral 14 days after ligation) and mounted in 5 separate gelatin blocks. The blocks were serially cut into 20 µm thick coronal sections (a total of 54 sections / group) with a cryostat at temperature varying between -10 to -14°C. Adjacent sections were taken for experiments using B₁ and B₂ R ligands and alternatively thaw-mounted on 0.2% gelatin/0.033% chromium potassium sulfate-coated slides and stored at -80°C. Sets of two slides were used for total binding and one set (adjacent sections) for non-specific binding (a total of 18 slides per group, 12 slides for total binding and 6 for non-specific binding, with 3 sections per slide).

2.6. Quantitative autoradiography

Autoradiography was performed according to the procedures described earlier (Cloutier et al., 2002; 2004; Ongali et al., 2003; 2004). Tissue sections were thawed and pre-incubated for 30s in 25mM PIPES buffer (PH 7,4; 4°C), followed by 90 min of incubation at room temperature in the same buffer containing: 1mM 1,10-phenanthroline, 1mM dithiothreitol, 0.014% bacitracin, 0.1 mM captopril, 0.2% bovine serum albumin (protease free) and 7.5mM magnesium chloride, in the presence of 150 pM [¹²⁵I] HPP-desArg¹⁰ Hoe 140 (B₁R) or 200 pM [¹²⁵I] HPP-Hoe 140 (B₂R). The concentration of radioligand was based on our previous studies in the rat spinal cord and corresponds to the B_{max} value (Cloutier et al., 2002; Ongali et al., 2003; 2004). The non-specific binding was determined in the presence of 1 μM of unlabeled ligands (HPP-des Arg¹⁰ Hoe 140 for B₁R and HPP-Hoe 140 for B₂R). After the incubation period, slides were rinsed three times in buffer (at 4°C), 4 min each and dipped for 15 s in distilled water (at 4°C) to remove the excess of salts and then air-dried. Kodak scientific BIOMAXTM MS[®] were juxtaposed onto the slides in the presence of [¹²⁵I]-microscales and exposed at room temperature for 2 days (B₂R) and 3 days (B₁R). The films were developed in D-19 (Kodak developer) and fixed in Kodak Ektaflo. Autoradiograms were quantified by densitometry with an MCIDTM image analysis system (Imaging Research, St Catharines, Ontario, Canada). Specific binding was determined by subtracting non-specific labeling from total binding taken from adjacent sections. The number of replicates analyzed for each specimen was a minimum of 3 per animal.

2.7. Peptide iodination

Iodination of HPP-desArg¹⁰ Hoe 140 and HPP-Hoe 140 was performed according to the chloramine T method (Hunter and Greenwood, 1962). Briefly, 5 µg of peptide were incubated in 0.05 M phosphate buffer for 30 s in the presence of 0.5 mCi (18.5 MBq) of ¹²⁵I-labeled Na and 220 nmol of chloramine T in a total volume of 85 µl. The monoiodinated peptide was then immediately purified by high pressure liquid chromatography on a C4 Vydac column (0.4 x 250 mm) (The Separation Group, Hesperia, CA) with 0.1% trifluoroacetic acid and acetonitrile as mobile phases. The specific activity of the iodinated peptides corresponds to 2,000 c.p.m./fmol or 1,212Ci/mmol.

2.8. Chemicals and materials

HPP-desArg¹⁰ Hoe 140 (3-4 hydroxyphenyl-propionyl-desArg⁹-D-Arg[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷,Oic⁸]-BK) and HPP-Hoe140 (3-4 hydroxyphenyl-propionyl-D-Arg[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷,Oic⁸]-BK) were developed from the selective B₁R antagonist desArg¹⁰ Hoe 140 (Wirth et al., 1991) and the B₂R antagonist Hoe 140 or Icatibant (Hock et al., 1991), respectively. They were kindly provided by Dr. Witold Neugebauer, Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada. The selective B₁R antagonist LF22-0542 (N-[[4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)phenyl]methyl]-2-[2-[[4-methoxy-2,6-dimethylphenyl)sulfonyl]methylamino]ethoxy]-N-methyl-acetamide, fumarate) and B₂R antagonist LF16-0687 mesylate (2-Pyrrolidinecarboxamide, N-[3-[[4-aminoiminomethyl)benzoyl]amino]propyl]-1-[[2,4-dichoro-3-[[2,4-dimethyl-8-quinolinyl)oxy]methyl]phenyl]sulfonyl]-(2S)-(9Cl)) were developed by Fournier Laboratories, Daix, France. Autoradiographic ¹²⁵I-labeled microscales (20µm) and Kodak

Scientific BIOMAX™ MS (single-coated, 24 x 30 cm) were purchased from Amersham Pharmacia Biotech Canada. Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic-acid] (PIPES), 1,10-phenanthroline, dithiothreitol, bacitracin, captopril, magnesium chloride and bovine serum albumin (protease free) were purchased from Sigma-Aldrich Canada.

2.9. Statistical analysis of data

Results are presented as the mean \pm SEM of four animals per group (autoradiography) or 16 animals per group (treatments with antagonists). Animals used for autoradiography and nociceptive testing are different. Statistical significance between control and antagonist treated rats (nociceptive testing) was determined with a Student's *t*-test for unpaired samples. For multiple comparisons, two-way or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the test of Dunnett (when compared to the same control) or Bonferoni was employed. P values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Hyperalgesia and allodynia

The development of tactile and cold allodynia and thermal hyperalgesia from 2 to 14 days after sciatic nerve ligation is shown in Figure 1. On the ipsilateral paw, withdrawal thresholds were significantly reduced ($P < 0.001$) from 12.0 ± 0.9 g to 3.3 ± 0.5 g for tactile allodynia and the frequency of responses to acetone application increased from 34% to 67%, in comparison with the contralateral paw at 2 weeks post-operation (Fig. 1-A and B). The threshold for thermal hyperalgesia was decreased from 12.3 ± 0.6 s to 8.4 ± 0.6 s two weeks after unilateral sciatic nerve ligation (Fig.1-C).

3.2. B₂ receptor binding sites

Autoradiographic distribution and corresponding specific binding values for kinin B₂R in control and operated rats are illustrated in Figure 2-A and B. In DRG and spinal cord dorsal horn (laminae I and II), densities of specific binding sites are increased on the ipsilateral side, 2 and 14 days after sciatic nerve ligation, and on the contralateral side at 14 days. This is accompanied by a diffuse increase in other parts of the spinal cord at 14 days.

3.3. B₁ receptor binding sites

As shown in Figure 3-A and B, there is a basal expression of B₁R in the ganglia and spinal cord of control rats. Specific B₁R binding sites are significantly increased in the ipsilateral DRG, 2 and 14 days after sciatic nerve ligation and on the contralateral side at 14 days. In the spinal dorsal horn, there is a diffuse increase in specific receptor binding sites, on ipsi- and contralateral sides, from day 2 to day 14 after partial sciatic nerve ligation.

3.4. Effects of LF22-0542 and LF16-0687

B₁R and B₂R antagonists were administered 14-21 days after sciatic nerve ligation, when both hyperalgesia and allodynia were well established. The B₁R antagonist LF22-0542 (10 mg/kg, s.c.) inhibited thermal hyperalgesia 3 h after administration (paw withdrawal thresholds increased from 6.2 ± 0.7 to 10.1 ± 1.8 s, $n = 16$, Fig. 4 A). LF22-0542 failed, however, to affect thermal hyperalgesia 30 min post-administration on the ipsilateral side (before 6.7 ± 0.3 s; after 6.8 ± 0.3 s, $n = 8$). The inhibition produced by LF22-0542 was over 24h post-injection (ipsilateral: 7.3 ± 0.5 s versus contralateral: 12.6 ± 0.6 s, $P < 0.01$). A dose of 3 mg/kg of LF22-0542 was not effective in many rats although it did reduce thermal hyperalgesia in others (data not shown).

The B₂R antagonist LF16-0687 (3 mg/kg, s.c.) caused a complete blockade of thermal hyperalgesia 1 h after administration (paw withdrawal threshold increased from 6.4 ± 0.5 to 11.1 ± 1.4 s; $n = 16$, Fig. 4 B). The inhibition produced by LF16-0687 was over 24 h post-injection (ipsilateral: 7.2 ± 0.2 s versus contralateral: 13.0 ± 0.4 s, $P < 0.01$). Tactile and cold allodynia measured simultaneously in the same animals with the same regimen of doses were not significantly affected by either antagonist (Figs. 5 and 6).

4. Discussion

In this study, we provided autoradiographic and pharmacological evidence that kinin B₁R and B₂R are involved in neuropathic pain after partial sciatic nerve ligation in rat. Specific receptor binding sites were increased on the ipsilateral spinal dorsal horn and DRG at 2 and 14 days, and also on the contralateral side at 14 days. While the role of kinin receptors is fairly well documented in models of inflammatory pain (Correa and Calixto, 1993; Davis and Perkins, 1994; Bélichard et al., 2000; Fox et al., 2003), our study is the first to show an increase of kinin B₁R and B₂R binding sites in a model of neuropathic pain and extends a previous report showing an increase of receptor mRNA expression at 2 days (for B₂R) and 14 days (for both B₁R and B₂R) after chronic constriction injury of the sciatic nerve (Levy and Zochodne, 2000).

Kinin receptor antagonists were shown to display analgesic effects in acute and chronic models of inflammation (Perkins et al., 1993; Correa and Calixto, 1993; Sufka and Roach, 1996; Fox et al., 2003; Gougat et al., 2004). Thus far the efficacy of kinin receptor antagonists in neuropathic pain (Levy and Zochodne, 2000; Yamaguchi-Sase et al., 2003; Gougat et al., 2004) was assessed using the chronic constriction injury of the sciatic nerve (Bennett and Xie, 1988) as model of nerve injury. We show for the first time the antihyperalgesic effects of kinin B₁R and B₂R antagonists in a different model of nerve injury, the partial ligation of the sciatic nerve (Seltzer et al., 1990). The selective non-peptide B₂R antagonist (LF16-0687) and B₁R antagonist (LF22-0542) inhibited thermal hyperalgesia, 14 days after partial sciatic nerve ligation. These results are reminiscent of the blockade of thermal hyperalgesia under acute and chronic treatment with B₁R antagonists in streptozotocin diabetic mice (Gabra and Sirois, 2003a ; 2003b).

Although B₁R and B₂R antagonists were shown to inhibit tactile allodynia in the chronic constriction injury model (Yamaguchi-Sase et al., 2003), our antagonists did not affect the threshold for tactile and cold allodynia after partial sciatic nerve ligation, suggesting a role for kinins in heat hyperalgesia but not in tactile and cold allodynia in this model of neuropathy. Thermal hyperalgesia is mediated by A δ -fibers and small diameter primary afferent neurons, which include both peptidergic and non-peptidergic C-fibers (Handwerker and Kobal, 1993; Yeomans and Proudfit, 1996). Whereas C-fibers are thought to be involved in the transmission of warm sensations, A δ -fibers are stimulated by cold stimulus (Pierau et Wurster, 1981). Thus the lack of efficacy of B₁R and B₂R antagonists on cold allodynia might be explained by the predominant expression of B₁R and B₂R in small diameter DRG neurons (Wotherspoon and Winter, 2000; Ma, 2001; Banik et al., 2001). On the contrary, tactile allodynia is a central phenomenon mediated by large myelinated fibers. The most accepted hypothesis is the one that proposes that chronic nerve injury or inflammation induces phenotypic changes predominantly in myelinated afferents. The central terminals of myelinated afferents expand into regions of the spinal cord that normally receive their predominant input from unmyelinated nociceptive afferents (Woolf et al., 1992; Shortland et al., 1997). These myelinated afferents start to synthesize and release peptides, primarily substance P, involved in the exaggerated responses to painful stimuli (mechanical allodynia or hyperalgesia) (Pitcher and Henry, 2000).

B₁R are thought to be generally absent in healthy tissues and induced after inflammation or tissue injury (Dray, 1997; Marceau and Bacharov, 1998; Calixto et al., 2000; Couture et al., 2001). We found a basal expression of B₁R in spinal cord and DRG

of control rats and these findings are consistent with recent studies that reported a constitutive expression of B₁R in these tissues in naïve rats, at the protein and mRNA levels (Ma et al., 2000; Wotherspoon and Winter, 2000; Levy and Zochodne, 2000; Ma, 2001; Ma and Heavens, 2001).

The increase of B₁R and B₂R expression in the contralateral DRG is not unusual and was observed in other models of neuropathic and inflammatory pain (Levy and Zochodne, 2000; Fox et al., 2003). Contralateral changes after nerve injury are common and include alterations in the expression of neuropeptides (substance P, calcitonin gene-related peptide) and neurotrophin receptor p75 (Zhou et al., 1996; Koltzenburg et al., 1999). The mechanism underlying the contralateral changes may be central (signaling via the system of commissural interneurons in the spinal cord) and/or systemic (effects of inflammatory mediators like cytokines or growth factors, known to induce the B₁R) (Koltzenburg et al., 1999). Retrogradely transported nerve growth factor, acting on TrkA and p75 receptors, is known to increase neuropeptide expression in DRG (McMahon, 1996).

In conclusion, the up-regulation of kinin B₁R and B₂R in the spinal cord and dorsal root ganglia after partial sciatic nerve ligation together with the anti-hyperalgesic effects of their antagonists provide support for the implication of central kinins in thermal hyperalgesia associated with neuropathy and suggests that both kinin receptors may represent promising therapeutic targets in neuropathic pain.

Acknowledgements

This work was supported by a Grant-In-Aid from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-14379 to RC). The authors thank Dr W. Neugebauer (Pharmacology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada) for supplying HPP-desArg¹⁰Hoe 140 and HPP-Hoe 140, and Dr P. Beaulieu (Pharmacology, Université de Montréal) for giving access to the equipment used to assess thermal hyperalgesia.

References

Banik RK, Kozaki Y, Sato J, Gera L, Mizumura K. B2 receptor-mediated enhanced bradykinin sensitivity of rat cutaneous C-fiber nociceptors during persistent inflammation. *J Neurophysiol* 2001 Dec; 86(6):2727-35.

Bélichard P, Landry M, Faye P, Bachvarov DR, Bouthillier J, Pruneau D, Marceau F. Inflammatory hyperalgesia induced by zymosan in the plantar tissue of the rat: effect of kinin receptor antagonists. *Immunopharmacology* 2000 Feb; 46(2):139-47.

Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988 Apr; 33(1):87-107.

Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. Kinins in pain and inflammation. *Pain* 2000; 87: 1-5.

Choi Y, Yoon YW, Na HS, Park MJ, Chung JM. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 1994; 59:369-376.

Cloutier F, de Sousa Buck H, Ongali B, Couture R. Pharmacologic and autoradiographic evidence for an up-regulation of kinin B(2) receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 1641-1654.

Cloutier F, Ongali B, Campos MM, Thibault G, Neugebauer W, Couture R. Correlation between brain bradykinin receptor binding sites and cardiovascular function in young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 285-296.

Correa CR, Calixto JB. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 193-198.

Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 161-76.

Davis AJ, Perkins MN. Induction of B₁ receptors in vivo in a model of persistent inflammatory mechanical hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacology* 1994 Jan; 33(1):127-33.

DeWitt BJ, Cheng DY, Kadowitz PJ. des-Arg⁹-bradykinin produces tone-dependent kinin B₁ receptor-mediated responses in the pulmonary vascular bed. *Circ Res* 1994; 75: 1064-72.

Dray A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75: 704-712.

Eckert A, Segond von Banchet G, Sopper S, Petersen M. Spatio-temporal pattern of induction of bradykinin receptors and inflammation in rat dorsal root ganglia after unilateral nerve ligation. *Pain* 1999; Dec;83(3):487-97.

Fox A, Wotherspoon G, McNair K, Hudson L, Patel S, Gentry C, Winter J. Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B1 bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia. *Pain* 2003; 104: 683-91.

Gabra BH, Sirois P. Kinin B1 receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice. *Neuropeptides* 2003a Feb; 37(1):36-44.

Gabra BH, Sirois P. Beneficial effect of chronic treatment with the selective bradykinin B1 receptor antagonists, R-715 and R-954, in attenuating streptozotocin-diabetic thermal hyperalgesia in mice. *Peptides* 2003b Aug; 24(8):1131-9.

Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T, Guagnini F, Urban-Szabo K, Martinolle JP, Soubrié P, Finance O, Le Fur G. SSR240612, a new non-peptide antagonist of the bradykinin B₁ receptor. Biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 2004 May; 309 (2): 661-9.

Handwerker HO, Kobal G. Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiol Rev* 1993 Jul;73(3):639-71.

Hock FJ, Wirth K, Albus U, Linz W, Gerhards HJ, Wiemer G, Henke St, Breipohl G, König W, Knolle J, Schölkens BA. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br J Pharmacol* 1991; Mar;102(3):769-73.

Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 1962 May 5; 194: 495-6.

Jensen TS, Gottrup H, Sindrup SH, Bach FW. The clinical picture of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 1-11.

Koltzenburg M, Wall PD, McMahon SB. Does the right side know what the left is doing? *Trends Neurosci* 1999; 22: 122-7.

Lee YJ, Zachrisson O, Tonge DA, McNaughton PA. Upregulation of bradykinin B2 receptor expression by neurotrophic factors and nerve injury in mouse sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 2002 Feb;19(2):186-200.

Levy D, Zochodne DW. Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in animal model of neuropathic pain. *Pain* 2000; 86: 265-71.

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

Lopes P, Kar S, Chrétien L, Regoli D, Quirion R, Couture R. Quantitative autoradiographic localization of [¹²⁵I-Tyr⁸]bradykinin receptor binding sites in the rat spinal cord: effects of neonatal capsaicin, noradrenergic deafferentation, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. *Neuroscience* 1995; 68: 867-881.

Lopes P, Kar S, Tousignant C, Regoli D, Quirion R, Couture R. Autoradiographic localization of [¹²⁵I-Tyr⁸]-bradykinin receptor binding sites in the guinea pig spinal cord. *Synapse* 1993; 15: 48-57.

Lortie M, Regoli D, Rhaleb NE, Plante GE. The role of B₁- and B₂-kinin receptors in the renal tubular and hemodynamic response to bradykinin. *Am J Physiol* 1992; 262: R72-R76.

Ma QP, Heavens RR. Basal expression of bradykinin B1 receptor in the spinal cord in humans and rats. *NeuroReport* 2001; 12: 2311-4.

Ma QP, Hill R, Sirinathsingji D. Basal expression of of bradykinin B1 receptor in peripheral sensory ganglia in the rat. *Neuroreport* 2000; 11: 4003-5.

Ma QP. The expression of bradykinin B₁ receptors on primary sensory neurons that give rise to small caliber sciatic nerve fibres in rats. *Neuroscience* 2001; 107:665-73.

Marceau F. Kinin B₁ receptors: a review. *Immunopharmacology* 1995; 30(1):1-26.

Marceau F, Bachvarov DR. Kinin receptors. *Clin Rev Allergy Immunol* 1998; 16: 385-401.

McMahon SB. NGF as a mediator of inflammatory pain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1996 Mar 29; 351(1338):431-40.

Murone C, Paxinos G, McKinley MJ, Oldfield BJ, Muller-Esterel W, Mendelson FA, Chai SY. Distribution of bradykinin B₂ receptors in sheep brain and spinal cord visualized by in vitro autoradiography. *J Comp Neurol* 1997 May5; 381(2):203-8.

Nsa Allogho S, Gobeil F, Perron SI, Hess JF, Regoli D. Effects of kinins on isolated stomachs of control and transgenic knockout B₂ receptor mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 1998; 357: 191-196.

Ongali B, Buck H de S, Cloutier F, Legault F, Regoli D, Lambert C, Thibault G, Couture R. Chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on kinin receptor binding sites in the rat spinal cord. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; Jun; 284(6):H1949-58.

Ongali B, Campos MM, Petcu M, Rodi D, Cloutier F, Chabot JG, Thibault G, Couture R. Expression of kinin B1 receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat. *NeuroReport* 2004 Nov 15;15(16):2463-2466.

Perkins MN, Campbell E, Dray A. Antinociceptive activity of the bradykinin B1 and B2 receptor antagonists, des- Arg9, [Leu8]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. *Pain* 1993; 53: 191-7.

Petersen M, Eckert AS, Segond VB, Heppelmann B, Klusch A, Kniffki KD. Plasticity in the expression of bradykinin binding sites in sensory neurons after mechanical nerve injury. *Neuroscience* 1998; 83: 949-59.

Pierau FK, Wurster RD. Primary afferent input from cutaneous thermoreceptors. *Fed Proc* 1981 Dec;40(14):2819-24.

Pitcher GM, Henry JL. Cellular mechanisms of hyperalgesia and spontaneous pain in a spinalized rat model of peripheral neuropathy: changes in myelinated afferent inputs implicated. *Eur J Neurosci*. 2000 Jun; 12(6):2006-20.

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

Seabrook GR, Bowery BJ, Heavens R, Brown N, Ford H, Sirinathsinghi DJ, Borkowski JA, Hess JF, Strader CD, Hill RG. Expression of B1 and B2 bradykinin receptor mRNA and their functional roles in sympathetic ganglia and sensory dorsal root ganglia neurones from wild-type and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 1997 Jul;36(7):1009-17.

Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990; 43: 205-18.

Shortland P, Kinman E, Molander C. Sprouting of A-fibre primary afferents into lamina II in two rat models of neuropathic pain. *Eur J Pain* 1997;1(3):215-27.

Shughrue PJ, Ky B, Austin CP. Localization of B₁ bradykinin receptor mRNA in the primate brain and spinal cord: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 2003; 465: 372-384.

Su JB, Houel R, Heloire F, Barbe F, Beverelli F, Sambin L, Castaigne A, Berdeaux A, Crozatier B, Hittinger L. Stimulation of bradykinin B(1) receptors induces vasodilation in conductance and resistance coronary vessels in conscious dogs: comparison with B(2) receptor stimulation. *Circulation* 2000; 101: 1848-53.

Sufka KJ, Roach JT. Stimulus properties and antinociceptive effects of selective bradykinin B1 and B2 receptor antagonists in rats. *Pain* 1996; 66: 99-103.

Wirth K, Breipohl G, Stechl J, Knolle J, Henke S, Scholkens B. DesArg9-D-Arg[Hyp3,Thi5,D-Tic7,Oic8]bradykinin (desArg10-[Hoe140]) is a potent bradykinin B₁ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1991; 205: 217-218.

Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 1992 Jan 2; 355(6355):75-8.

Wotherspoon G, Winter J. Bradykinin B₁ receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neurosci Lett* 2000; 12: 175-8.

Yamaguchi-Sase S, Hayashi I, Okamoto H, Nara Y, Matsuzaki S, Hoka S, Majima M. Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists or kininogen deficiency in chronic constriction nerve in rats. *Inflamm Res* 2003; 52: 164-169.

Yeomans DC, Proudfit HK. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: electrophysiological evidence. *Pain* 1996; 68(1):141-150.

Zhou XF, Rush RA, McLachlan EM. Differential expression of the p75 nerve growth factor receptor in glia and neurons of the rat dorsal root ganglia after peripheral nerve transection. *J Neurosci* 1996 May 1; 16(9):2901-11.

Figure Legends

Figure 1. Effects of left sciatic nerve ligation on the development of tactile allodynia (A), cold allodynia (B) and thermal hyperalgesia (C). Statistical significance between ipsi- and contralateral sides are indicated by * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; $n = 8$.

Figure 2. Autoradiographic distribution (A) and density values (B) of B_2R binding sites in control and operated rats. In dorsal root ganglia, densities of specific binding sites were increased as follows: control (14 fmol/mg tissue), 2 days ipsilateral (17 fmol/mg tissue), 14 days ipsilateral (21 fmol/mg tissue) and 14 days contralateral (18 fmol/mg tissue). Similar changes were seen in laminae I and II of the spinal cord: control (13 fmol/mg tissue), 2 days ipsilateral (19 fmol/mg tissue), 14 days ipsilateral (27 fmol/mg tissue) and 14 days contralateral (21 fmol/mg tissue). A diffuse increase of B_2R specific binding sites was also seen in the remainder of the spinal cord at 14 days. Comparison to control is indicated by * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

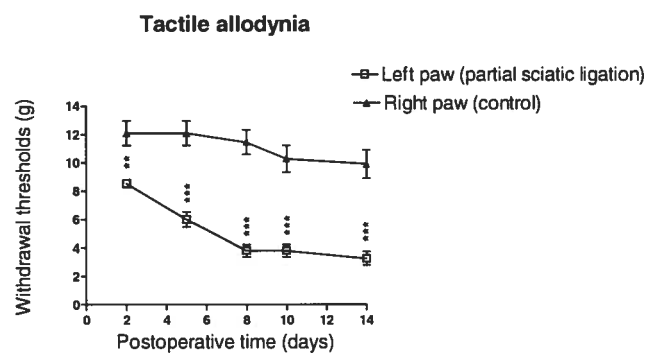
Figure 3. Autoradiographic distribution (A) and density values (B) of B_1R binding sites in dorsal root ganglia (DRG) and spinal cord, 2 and 14 days after partial sciatic nerve ligation. Note the basal expression of B_1R in DRG and spinal cord of control rats (0,4 and 0,2 fmol/mg tissue, respectively). Two days after ligation, specific B_1R binding sites were significantly increased in the ipsilateral DRG (1,4 fmol/mg tissue) and at 14 days in the ipsilateral (2,1 fmol/mg tissue) and contralateral (0,8 fmol/mg tissue) DRG. In the spinal dorsal horn, a diffuse increase, more pronounced in laminae I and II, occurred at 2 and 14 days, on ipsi- and contralateral (around 1,8 fmol/mg tissue) sides. Comparison to control is indicated by * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Figure 4. Inhibition of thermal hyperalgesia after subcutaneous treatment with B_1R antagonist LF22-0542 (10mg/kg) (A) and B_2R antagonist LF16-0687 (3 mg/kg) (B). B_1R antagonist increased paw withdrawal thresholds from 6.2 ± 0.8 to 10.1 ± 1.8 s (contralateral values: 11.1 ± 0.9 s). Subcutaneous administration of B_2R antagonist increased paw withdrawal thresholds from 6.4 ± 0.5 to 11.1 ± 1.4 s (contralateral values: 11.7 ± 0.5 s). Comparison to control is indicated by ** $P < 0,01$; $n = 16$.

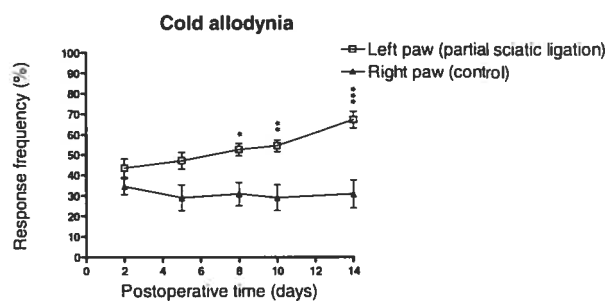
Figure 5. Subcutaneous treatment with B_1R antagonist LF22-0542 (10mg/kg) (A) and B_2R antagonist LF16-0687 (3 mg/kg) (B) had no effect on tactile allodynia. Comparison to contralateral side is indicated by *** $P < 0,001$; $n = 16$.

Figure 6. Subcutaneous treatment with B_1R antagonist LF22-0542 (10mg/kg) (A) and B_2R antagonist LF16-0687 (3 mg/kg) (B) had no effect on cold allodynia. Comparison to contralateral side is indicated by *** $P < 0,001$; $n = 16$.

A



B



C

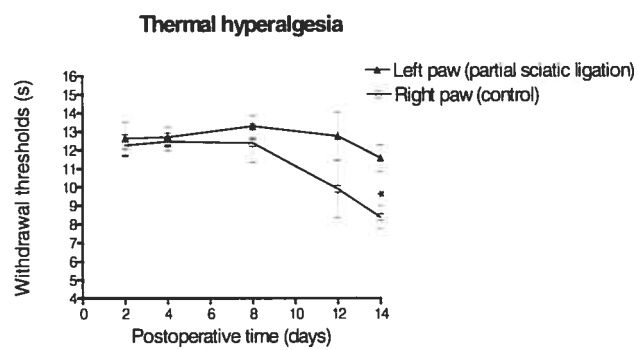


Figure 1

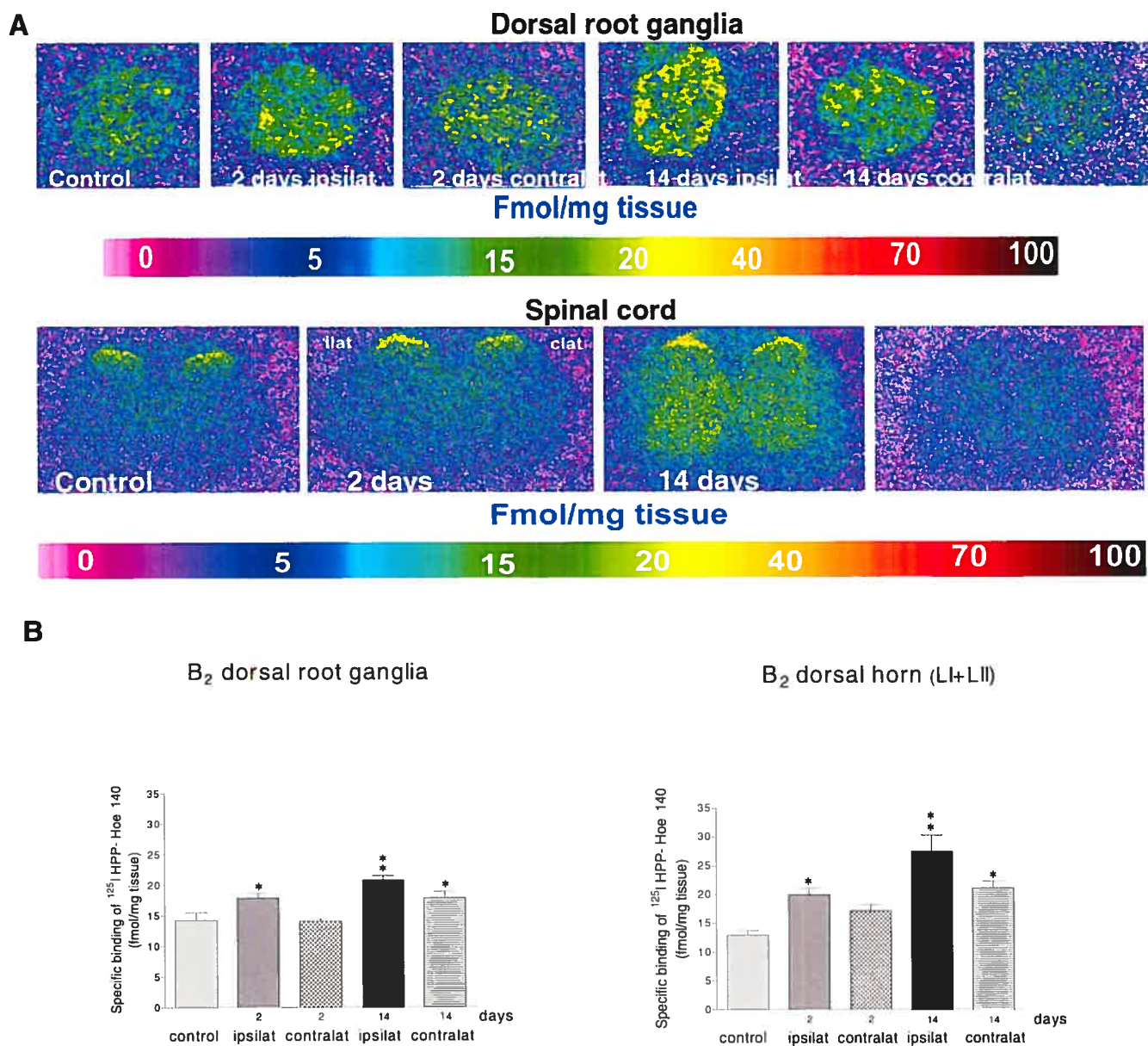


Figure 2

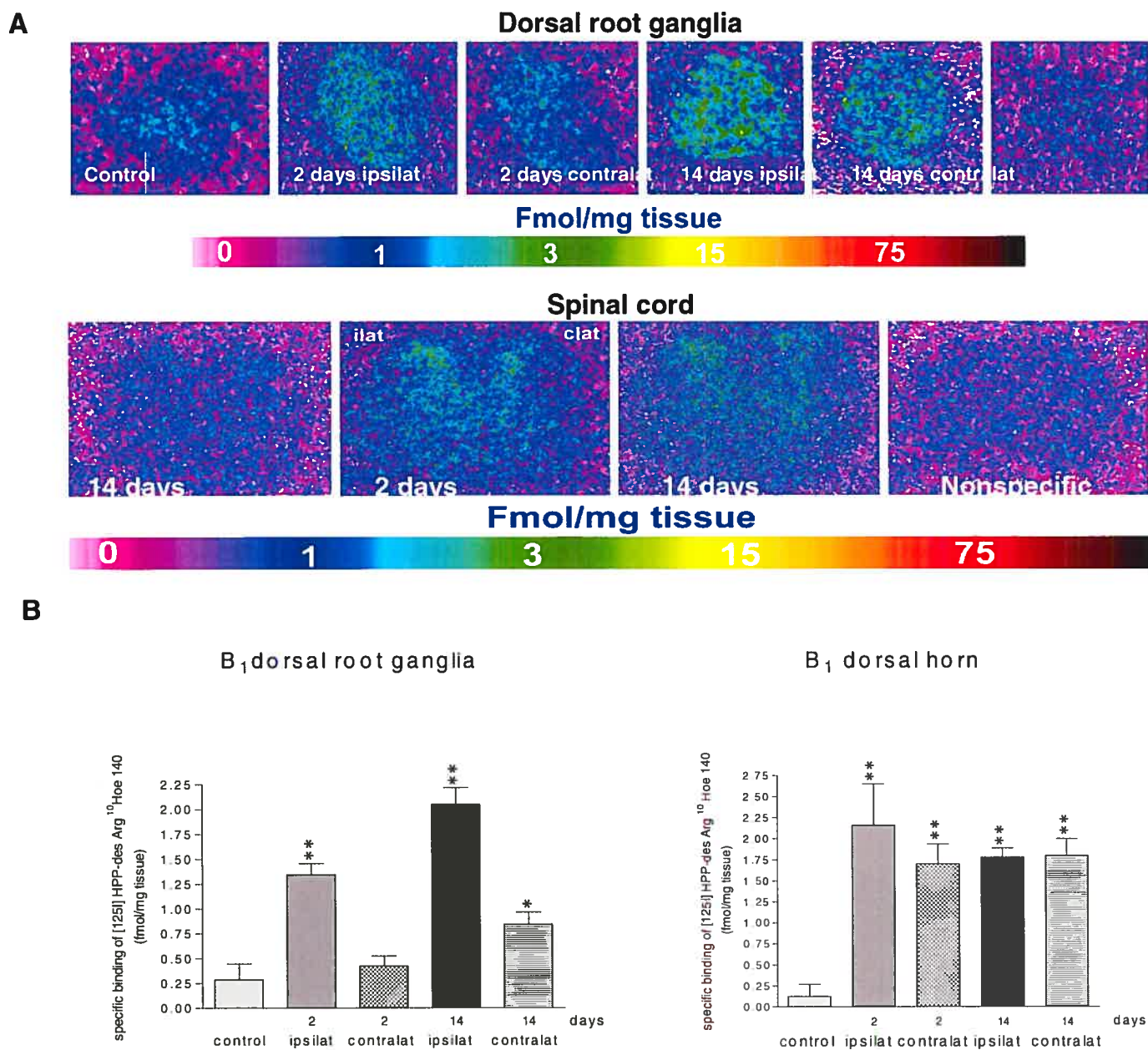


Figure 3

Thermal hyperalgesia

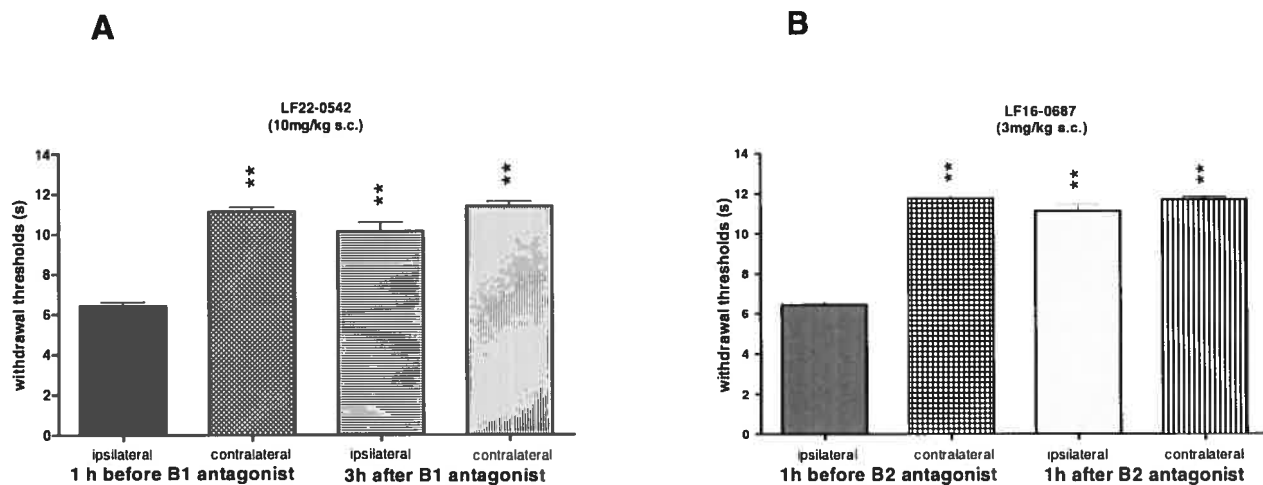


Figure 4

Tactile allodynia

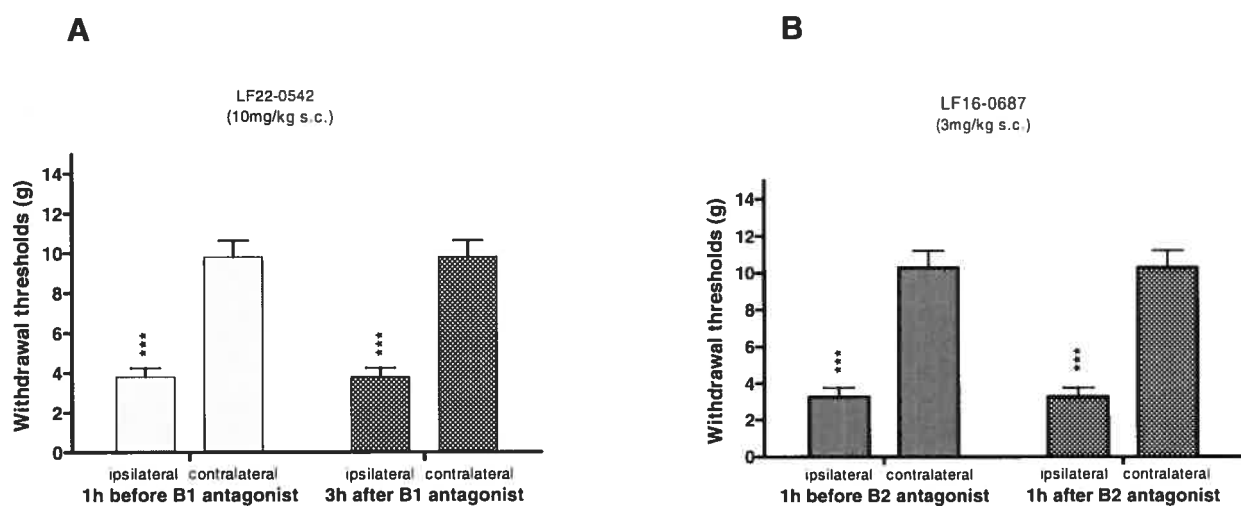


Figure 5

Cold allodynia

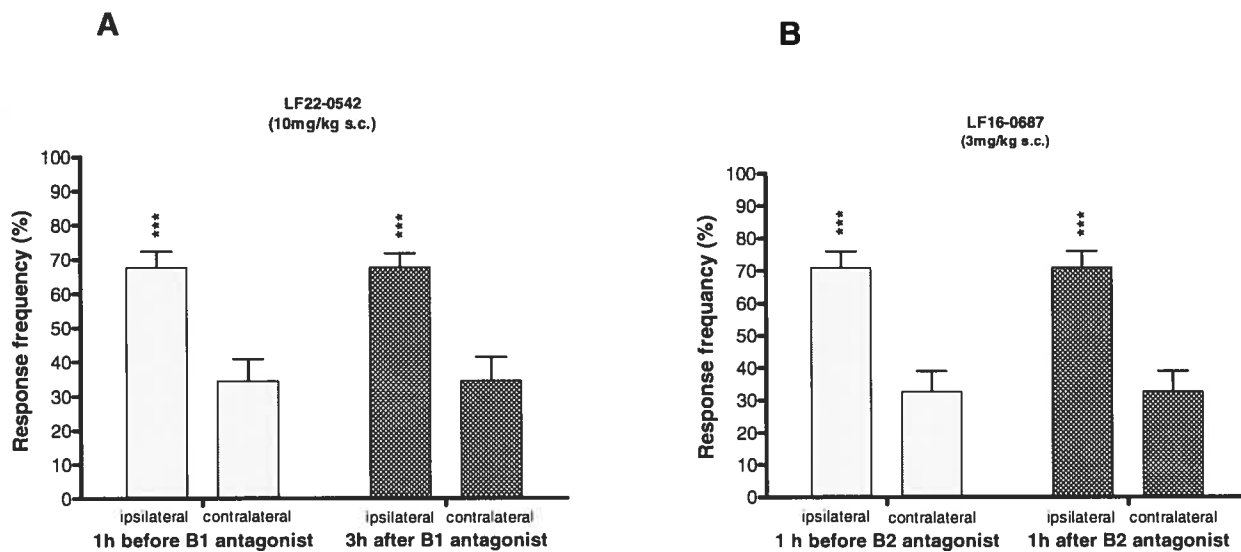


Figure 6

TROISIÈME CHAPITRE
DISCUSSION GÉNÉRALE

1. La ligature partielle du nerf sciatique (le modèle Seltzer)

Les modèles par lésion du nerf sciatique sont parmi les modèles animaux les plus utilisés pour évaluer les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la douleur neuropathique et pour tester différents composés. En plus, ces modèles reproduisent très bien les pathologies traumatiques et inflammatoires du système nerveux périphérique retrouvées chez l'humain. Les modèles les plus connus sont :

- la constriction chronique du nerf sciatique, le modèle Bennett (Bennett et Xie, 1988);
- la ligature partielle du nerf sciatique, le modèle Seltzer (Seltzer et al, 1990);
- le ligature spinale, le modèle Chung (Kim et Chung, 1992)

Les symptômes développés suite à la lésion du nerf sciatique sont communs pour les trois modèles (allodynie et hyperalgésie mécanique ou thermique, douleur spontanée) et résultent d'un dommage neuronal et de l'inflammation au site de la lésion. Les mécanismes pathologiques qui se trouvent à la base de ces manifestations agissent au niveau du système nerveux périphérique (sensibilisation périphérique, accumulation de canaux Na^+ et réduction de canaux potassiques, sensibilisation du système nerveux sympathique, croissance des fibres intactes dans les territoires cutanés dénervés, décharges ectopiques des axones endommagés) et central (sensibilisation centrale, diminution des mécanismes inhibiteurs, réorganisation structurelle des fibres sensibles dans les couches superficielles I et II de la corne dorsale avec la participation des fibres $\text{A}\beta$ qui normalement ne sont pas impliquées dans la douleur) (Woolf et al., 1992; England et al., 1996; Shortland et al., 1997; Zimmermann, 2001).

Le degré de dommage du nerf semble jouer un rôle important dans l'amplitude des manifestations cliniques. Une très grande perte de neurones peut avoir comme résultat une perte de la sensibilité dans les territoires innervés. L'allodynie mécanique n'est pas seulement la conséquence des processus pathologiques mais aussi des processus de guérison locale après la blessure du nerf (croissance des fibres intactes dans les territoires cutanés dénervés, croissance longitudinale des axones au site de la blessure, axones qui poussent pour reprendre leur territoire d'innervation au niveau de la peau). Un dommage exagéré du nerf suivi par une dégénérescence neuronale massive qui dépasse sa capacité de guérison va se traduire par une perte de sensibilité au niveau de la peau et non par l'allodynie ou l'hyperalgésie.

Malgré la ressemblance entre les trois modèles de douleur neuropathique énumérés, on trouve des différences en ce qui concerne la complexité de la technique chirurgicale, le temps d'apparition et l'amplitude des signes cliniques (allodynie et hyperalgésie) (Kim et al., 1997) :

1) Le modèle Chung : la ligature serrée d'un (L5) ou deux (L5 et L6) des trois nerfs spinaux qui forment le nerf sciatique (L4, L5 et L6) (Kim et Chung, 1992), se caractérise par des réponses robustes (allodynie et hyperalgésie marquées) et constantes après la chirurgie, car le degré du dommage est toujours le même. Les signes d'allodynie mécanique semblent être plus marqués que dans les autres modèles. Inconvénient : chirurgie laborieuse et invasive. Le caractère inductible du récepteur B₁ en conditions de dommages tissulaire et d'inflammation (suite à une chirurgie invasive) représente un facteur important qui doit être pris en considération et qui rend ce modèle inadéquat pour l'étude des récepteurs des kinines.

2) Le modèle Seltzer : la ligature partielle du nerf sciatique (Seltzer et al., 1990), ligature partielle et serrée de 30 à 50% de la circonférence du nerf. Caractéristiques : chirurgie très simple et très rapide, traumatisme minimal pour les animaux, pourcentage excellent de réponses après la chirurgie (allodynie et hyperalgésie marquées pour plus de 80% des animaux). La variabilité des réponses entre les animaux peut être gardée au minimum en respectant le pourcentage du nerf qui est ligaturé (une ligature de plus de 50% de la circonférence produit un dommage exagéré, alors que une ligature de moins de 30% est insuffisante pour obtenir des réponses robustes).

3) Le modèle Bennett : la constriction chronique du nerf sciatique (Bennett et Xie, 1988), consiste en 4 ligatures faibles placées autour du nerf. Parmi les trois modèles, le modèle Bennett est caractérisé par la plus grande variabilité entre les animaux et aussi par une amplitude moins élevée des réponses aux stimulations (une allodynie et une hyperalgésie moins marquées). Le dommage au niveau du nerf n'est pas direct, mais indirect, suite aux phénomènes inflammatoires autour du nerf. Ce mécanisme indirect combiné avec la difficulté à contrôler la force des ligatures, peut expliquer la variabilité et la faiblesse des réponses.

La ligature spinale (Chung) et la ligature partielle du nerf sciatique (Seltzer) semblent être des modèles plus avantageux que le modèle de constriction chronique (Bennett). Notre choix pour le modèle Seltzer a été déterminé par des critères comme la reproductibilité (plus de 80% des animaux qui développent l'allodynie et l'hyperalgésie), la robustesse et la constance des réponses aux stimulations, la chirurgie simple, rapide et peu invasive pour les animaux (importantes pour le caractère inductible du récepteur B₁ en conditions inflammatoires mais aussi pour des raisons éthiques).

2. L'autoradiographie quantitative

L'autoradiographie quantitative est une technique qui permet de localiser et de quantifier les sites de liaison spécifiques des ligands radioactifs sur des coupes histologiques. En principe, la technique consiste à marquer un ligand (dans notre étude, les antagonistes sélectifs des récepteurs B₁ et B₂, le HPP-desArg¹⁰ Hoe 140 et le HPP-Hoe 140) avec un isotope radioactif comme l'iode 125 ou le tritium et à suivre sa distribution sur des coupes histologiques de 10 à 40 µm. Le groupe HPP (3-4 hydroxyphenyl-propionyl-D-Arg) permet d'attacher l'iode radioactif au ligand sans altérer ses propriétés pharmacologiques.

La liaison spécifique du ligand est obtenue par soustraction numérique ou digitale de la liaison totale, la liaison non spécifique que l'on obtient sur les coupes histologiques adjacentes en mettant en compétition le ligand radioactif et le ligand non marqué à une concentration mille fois plus élevée. Ensuite, les coupes sont exposées à un film en présence d'une échelle de valeurs concomitantes à l'isotope utilisé, suivi par la révélation des films. L'analyse des films se fait à l'aide d'un système d'analyse d'image.

Les concentrations utilisées pour établir la liaison totale sont établies à partir des courbes de saturation qui permettent d'extraire le B_{max} (quantité optimale qui permet de lier 100% des récepteurs) et la constante de dissociation (K_d). La concentration utilisée représente quatre fois la valeur du K_d.

Les isotopes utilisés en autoradiographie, le tritium et l'iode 125, possèdent chacun leurs avantages et leurs inconvénients :

1) les ligands marqués au tritium miment parfaitement le comportement des ligands endogènes (le marquage au tritium consiste à remplacer un hydrogène du ligand

par un hydrogène radioactif) contrairement aux ligands iodés qui peuvent causer des contraintes stériques et modifier les propriétés pharmacologiques des ligands endogènes (le marquage à l'iode requiert la fixation d'une molécule d'iode radioactive au ligand, particulièrement sur un acide aminé aromatique libre).

2) par contre, les ligands marqués au tritium ont une faible activité spécifique, ce qui nécessite de longues périodes d'exposition (2 à 3 mois), alors que le temps d'exposition pour les ligands marqués à l'iode ne dépasse pas 5 jours. D'autre part, les ligands iodés se dégradent très vite (perte de radioactivité dans les trois semaines suivant l'iodation, auto-dégradation) limitant leur utilisation à moyen terme, alors que les ligands marqués au tritium ont une demi-vie de 65 ans et ne se dégradent que par perte d'activité (Kuhar, 1987; Kuhar et DeSouza, 1989).

Indépendamment du type de ligand utilisé, ce dernier doit respecter quelques critères importants : accessibilité à tous les récepteurs, le ligand ne doit pas altérer le récepteur ou changer son comportement, liaison saturable et réversible avec le récepteur (Ouhtit et al., 1997). Pour l'autoradiographie des récepteurs, l'utilisation des antagonistes est conseillée, car les agonistes changent le comportement des récepteurs (induction de l'internalisation avec changement du nombre et de la distribution membranaire).

En dépit de ses avantages portant sur la quantification des récepteurs, l'autoradiographie ne procure pas des informations de très haute résolution dont la visualisation d'une internalisation des récepteurs, ni des informations ultra structurales, comme les éléments cellulaires sur lesquels sont situés les récepteurs (Chabot et al., 1996); elle ne permet pas non plus d'avoir accès à de l'information complémentaire comme la quantité de l'ARNm d'un récepteur connu. Pour combler ces lacunes, on peut

faire appel à la technique d'immunohistochimie couplée à la microscopie photonique, électronique ou confocale, ainsi que à des techniques complémentaires comme le PCR (« polymerase chain reaction ») ou l'hybridation in situ.

La fluorescence ou l'immunofluorescence couplée à la microscopie confocale permet de suivre l'internalisation d'un récepteur ou d'un ligand dans une cellule, de préciser sa localisation intracellulaire ou membranaire. L'immunohistochimie couplée à la microscopie électronique identifie les éléments ultra structuraux qui portent le récepteur. Même si ces techniques permettent d'extraire des informations qualitatives d'une résolution élevée, elle restent semi quantitatives et ne peuvent pas remplacer l'autoradiographie.

3. Évaluation des données de notre étude en autoradiographie

Nous avons utilisé l'autoradiographie quantitative pour étudier l'expression des récepteurs B₁ et B₂ des kinines dans la moelle épinière lombaire et les ganglions de la racine dorsale (ganglions L4, L5 et L6 du nerf sciatique) dans un modèle de douleur neuropathique induite par la ligature partielle du nerf sciatique (le modèle Seltzer). Les récepteurs des kinines ont été identifiés et quantifiés sur les coupes histologiques de la moelle et des ganglions avec les antagonistes sélectifs des récepteurs B₁ et B₂, le HPP-des Arg¹⁰ Hoe 140 et le HPP-Hoe 140, marqués à l'iode 125. L'analyse des films a montré des augmentations des sites de liaison pour les deux récepteurs des kinines à deux jours et à 14 jours après la ligature du nerf sciatique. Dans les ganglions de la racine dorsale (L4, L5 et L6), on trouve une surexpression des récepteurs B₁ et B₂ du côté ipsilatéral à 2 et à 14 jours, accompagnée d'une augmentation du côté contralatéral à 14 jours. Au niveau de la moelle épinière, le récepteur B₂ est surexprimé dans les couches

superficielles de la corne dorsale (couches I et II) liées à la nocipetion (fibres C et A δ), respectant le même décours temporel: augmentation à 2 et à 14 jours du côté ipsilatéral, et à 14 jour du côté contralatéral. En ce qui concerne le récepteur B₁, il est augmenté de manière diffuse dans la moelle épinière (ipsi- et contralatéral) à 2 et à 14 jours, surtout dans la corne dorsale (les couches superficielles). Cette expression diffuse du récepteur B₁ pourrait être expliquée par sa présence non seulement sur des fibres nociceptives, mais aussi sur d'autres fibres, soit des interneurons ou des cellules gliales. Des études en immunohistochimie seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

À l'exception de certaines espèces comme la souris (Nsa Allogho et al., 1998), le chien (Lortie et al., 1992; Su et al., 2000) ou le chat (DeWitt et al., 1994), où on le trouve exprimé de manière constitutive, le récepteur B₁ a été considéré, en général, absent dans les tissus sains (Bhoola et al., 1992)); il est induit dans des conditions inflammatoires par les endotoxines bactériennes, les cytokines (interleukine-1, TNF- α), les facteurs de croissance et aussi par ses agonistes (desArg⁹-BK, desArg¹⁰-KD et desArg¹¹T-kinine) (Siebeck et al., 1998; Marceau et al., 1998; Ni et al., 1998a; Schanstra et al., 1998; Zhou et al., 1998; Campos et al., 1999). Au moyen de l'autoradiographie quantitative, nous avons toutefois constaté une expression basale du récepteur B₁ dans la moelle épinière (0,127 fmol/mg tissu) et dans le ganglion de la racine dorsale (0,287 fmol/mg tissu). Ceci confirme les études récentes montrant une expression basale du récepteur B₁ (ARNm et la protéine par immunohistochimie) dans la moelle épinière (Couture et Lindsey, 2000; Wotherspoon et Winter, 2000; Ma et Heavens, 2001; Ma, 2001; Shughrue et al., 2003) et dans les ganglions de la racine dorsale (Seabrook et al., 1997; Levy et Zochodone, 2000;

Wotherspoon et Winter, 2000; Ma et al., 2001; Shughrue et al., 2003; Yamaguchi-Sase et al., 2003) chez différentes espèces (souris, rat, singe et humain).

La surexpression des récepteurs à 48 heures précède les signes cliniques, car l'allodynie et l'hyperalgésie prennent normalement plusieurs jours à se développer et ils atteignent le maximum après 12 jours. Plusieurs mécanismes sont essentiels pour le développement de la douleur neuropathique: sensibilisation périphérique (Basbaum et Jessell, 2000), accumulation de canaux Na^+ au niveau des nerfs endommagés (England et al., 1996), sensibilisation du système nerveux sympathique (Xie et al., 1995), sensibilisation centrale causée par les décharges ectopiques qui arrivent des terminaisons afférentes endommagées (relayée par les récepteurs NMDA et les neurokinines)(Kidd et Urban, 2001).

L'augmentation des récepteurs des kinines détectée par l'autoradiographie quantitative suggère un rôle pour les kinines dans le développement de la douleur neuropathique. Ce rôle est supporté par les traitements avec les antagonistes sélectifs des récepteurs B_1 et B_2 .

4. Évaluation des données de notre étude pharmacologique

Les antagonistes fournis par Fournier Pharma sont de type non peptidiques, donc il s'agit de molécules qui passent la barrière hémato-encéphalique, pouvant agir directement sur les récepteurs situés dans la moelle épinière et sur les fibres sensorielles périphériques. L'utilisation des antagonistes non peptidiques dans les modèles de douleur neuropathique est fortement indiquée, tenant compte de la complexité et l'amplitude des phénomènes qui se déroulent au niveau central (la sensibilisation centrale, la diminution

des mécanismes inhibiteurs) (Zimmermann, 2001), phénomènes qui jouent un rôle essentiel dans le développement de manifestations cliniques (hyperalgésie, allodynie) associées à la douleur neuropathique. D'autre part, l'utilisation d'antagonistes peptidiques (qui ne passent pas la barrière hémato-encéphalique, agissant seulement en périphérie sur les fibres sensorielles) permettrait de connaître la composante périphérique associée à la participation des récepteurs des kinines dans la douleur neuropathique. L'implication des kinines périphériques dans la douleur inflammatoire est évidente et soutenue par les effets analgésiques des antagonistes des kinines après l'administration locale, dans plusieurs modèles de douleur inflammatoire (formol, capsaïcine, glutamate) (Shibata et al., 1989; Corrêa et Calixto, 1993; Sufka et Roach, 1996; Beirith et al., 2003). Par contre, les récepteurs centraux des kinines semblent jouer un rôle majeur dans la douleur neuropathique après la lésion d'un nerf. Ceci est soutenu par nos données (augmentation des sites de liaison des récepteurs des kinines dans la moelle épinière).

Quatorze jours après la ligature du nerf sciatique, l'antagoniste LF 22-0542 du récepteur B₁ (administré par voie sous cutanée, 10mg/kg) et l'antagoniste LF 16-0687 du récepteur B₂ (administré par voie sous cutanée, 3mg/kg) ont bloqué complètement l'hyperalgésie thermique. Nous avons constaté des effets maximaux à 3 heures pour l'antagoniste LF 22-0542 (B₁) et à 1 heure pour l'antagoniste LF 16-0687 (B₂).

L'effet anti-hyperalgésique des antagonistes des récepteurs B₁ et B₂ a aussi été observé dans un autre modèle de douleur neuropathique, la constriction chronique du nerf sciatique (le modèle Bennett), utilisant l'antagoniste du récepteur B₂, la D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK (Hoe-140) et l'antagoniste du récepteur B₁, la des-Arg⁹-[Leu⁸]-

BK (i.p. ou i.v.) (Levy et Zochodone, 2000; Yamaguchi-Sase et al., 2003) ou un antagoniste B₁ non peptidique, le SSR240612 (per os) (Gougat et al., 2004).

Contrairement aux résultats obtenus par Yamaguchi-Sase et al. (2003) dans le modèle de Bennett (la constriction chronique du nerf sciatique) avec les antagonistes Hoe-140 et des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, le LF 22-0542 et le LF 16-0687 n'ont pas bloqué l'allodynie mécanique après la ligature partielle du nerf sciatique, ce qui suggère un rôle pour les kinines dans l'hyperalgésie thermique et non dans l'allodynie mécanique dans le modèle de Seltzer. Les récepteurs des kinines se trouvent principalement sur les fibres C (peptidergiques et non peptidergiques) et A δ (Wotherspoon et Winter, 2000; Ma, 2001) qui sont impliquées dans l'hyperalgésie thermique (Yeomans et Proudfit, 1996), tandis que l'allodynie est un phénomène central relayé par les fibres myélinisées A β de gros calibre. Ces fibres changent leur phénotype et poussent vers les couches superficielles de la corne dorsale (couches I et II) (Woolf et al., 1992; Shortland et al., 1997) et synthétisent des peptides, surtout la substance P, impliqués dans l'allodynie mécanique (Pitcher et Henry, 2000). Nos résultats suggèrent donc que les récepteurs B₁ et B₂ des kinines ne sont pas présents sur les fibres A β et ne participeraient pas à l'allodynie causée par ces fibres sensorielles.

Conclusion

Les récepteurs B₁ et B₂ des kinines sont exprimés de manière constitutive et leur expression augmente dans les tissus nerveux de rat en conditions inflammatoires ou après la lésion d'un nerf. Cette expression a été documentée au moyen de différentes techniques (expression de l'ARNm, immunohistochimie) et traitements pharmacologiques (antagonistes spécifiques) surtout dans des modèles animaux de douleur inflammatoire (aiguë ou chronique), suggérant un rôle équivalent pour les deux récepteurs dans les phases aiguë et chronique de l'inflammation. Les études effectuées jusqu'à ce moment dans des modèles de douleur neuropathique ont montré des augmentations de l'ARNm dans les ganglions de la racine dorsale dans le modèle de constriction chronique. Nous avons montré pour la première fois une surexpression des sites de liaison pour les récepteurs des kinines dans la moelle épinière et dans le ganglion de la racine dorsale dans un modèle de douleur neuropathique, la ligature partielle du nerf sciatique. L'augmentation de l'expression des récepteurs est observée tôt après la ligature du nerf (2 jours) et est maintenue à 14 jours, coïncidant avec les effets anti-hyperalgésiques des antagonistes des kinines. Nos résultats sont en concordance avec les données de la littérature et soulignent le rôle évident que ces récepteurs jouent dans la composante thermique de la nociception (l'hyperalgésie et l'allodynie thermique). Cependant, l'implication dans l'allodynie mécanique reste encore controversée.

Bibliographie

- Abelous JE, Bardier E.** Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. C.R. Seances Soc Biol. 66: 511, 1909.
- Adomeit A, Graness A, Gross S, Seedorf K, Wetzker R, Liebmann C.** Bradykinin B(2) receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in COS-7 cells requires dual signaling via both protein kinase C pathway and epidermal growth factor receptor transactivation. Mol Cell Biol. 19(8):5289-97, 1999.
- Agata J, Miao RQ, Yayama K, Chao L, Chao J.** Bradykinin B(1) receptor mediates inhibition of neointima formation in rat artery after balloon angioplasty. Hypertension 36: 364-370, 2000.
- Ametov AS, Barinov A, Dyck PJ, Hermann R, Kozlova N, Litchy WJ, Low PA, Nehrdich D, Novosadova M, O'Brien PC, Reljanovic M, Samigullin R, Schuette K, Stokov I, Tritschler HJ, Wessel K, Yakhno N, Ziegler D; SYDNEY Trial Study Group.** The sensory symptoms of diabetic polyneuropathy are improved with alpha-lipoic acid: the SYDNEY trial. Diabetes Care. 26(7):2227, 2003.
- Andrade SO, Rocha e Silva M.** Purification of bradykinin by ion exchange chromatography. Biochem J. 64: 701-705, 1956.
- Austin CE, Faussner A, Robinson HE, Chakravarty S, Kyle DJ, Bathon JM, Proud D.** Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. J. Biol. Chem. 272:11420-11425, 1997.

- Basbaum AI, Jessell TM.** The perception of pain. In: Kandel RE, Schwartz JH, Jessell TM (Eds), Principles of Neural Science 4th edn. pp472-492, 2000.
- Bascands JL, Schanstra JP, Couture R, Girolami JP.** Bradykinin receptors: towards new pathophysiological roles. Med. Sci. (Paris). 19: 1093-1100, 2003.
- Beirith A, Santos AR, Calixto JB.** The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. Brain Res. 18;969(1-2):110-6, 2003.
- Belichard P, Loillier B, Paquet JL, Luccarini JM, Pruneau D.** Haemodynamic and cardiac effects of kinin B1 and B2 receptor stimulation in conscious instrumented dogs. Br. J. Pharmacol. 117: 1565-1571, 1996.
- Belichard P, Landry M, Faye P, Bachvarov DR, Bouthillier J, Pruneau D, Marceau F.** Inflammatory hyperalgesia induced by zymosan in the plantar tissue of the rat: effect of kinin receptor antagonists. Immunopharmacology. 46(2):139-47, 2000.
- Bennett GJ, Xie YK.** A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain. 33(1):87-107, 1988.
- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K.** Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. Pharmacol. Rev. 44: 1-80, 1992.
- Bingham S, Beswick PJ, Bountra C, Brown T, Campbell IB, Chessell IP, Clayton N, Collins SD, Davey PT, Goodland H, Gray N, Haslam C, Hatcher JP, Hunter AJ, Lucas F, Murkitt G, Naylor A, Pickup E, Sargent B, Summerfield SG, Stevens A, Stratton SC, Wiseman J.** The cyclo-oxygenase 2 inhibitor, GW406381 is effective in animal models of neuropathic pain and central sensitisation. J Pharmacol Exp Ther. 2004 Nov 30. [Epub ahead of print]

- Blackburn-Munro G, Bomholt SF, Erichsen HK.** Behavioural effects of the novel AMPA/GluR5 selective receptor antagonist NS1209 after systemic administration in animal models of experimental pain. *Neuropharmacology*. 47(3):351-62, 2004.
- Boissonnas RA, Guttmann S Jaquenoud PA.** Synthèse de la L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-L-glycyl-L-phenylalanyl-L-Seryl-L-prolyl L-L-phenylalanyl-arginine, un nonapeptide présentant les propriétés de la bradykinine. *Helv. Chim. Acta*. 43: 1349-1355, 1960.
- Boyce S, Rupniak NM, Carlson EJ, Webb J, Borkowski JA, Hess JF, Strader CD, Hill RG.** Nociception and inflammatory hyperalgesia in B2 bradykinin receptor knockout mice. *Immunopharmacology*. 33(1-3):333-5, 1996.
- Burch RM, Axelrod J.** Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 6374-6378, 1987.
- Burgess GM, Perkins MN, Rang HP, Campbell EA, Brown MC, McIntyre P, Urban L, Dziadulewicz EK, Ritchie TJ, Hallett A, Snell CR, Wrigglesworth R, Lee W, Davis C, Phagoo SB, Davis AJ, Phillips E, Drake GS, Hughes GA, Dunstan A, Bloomfield GC.** Bradyzide, a potent non-peptide B(2) bradykinin receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*. 129(1):77-86, 2000.
- Campbell DJ.** Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides. *Braz J Med Biol Res*. 33(6):665-77, 2000.

- Campos MM, Souza GE, Calixto JB.** In vivo B₁ kinin-receptor up regulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways. *Br. J. Pharmacol.* 127: 1851-1859, 1999.
- Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM.** Kinins in pain and inflammation. *Pain.* 87: 1-5, 2000.
- Cesare P, Dekker LV, Sardini A, Parker PJ, McNaughton PA.** Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron.* 23(3):617-24, 1999.
- Chabot JG, Kar S, Quirion R.** Autoradiographical and immunohistochemical analysis of receptor localization in the central nervous system. *Histochem J.* 28: 729-745, 1996.
- Chen X, Orfanos SE, Ryan JW, Chung AY, Hess DC, Catravas JD.** Species variation in pulmonary endothelial aminopeptidase P activity. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 1301-1307, 1991.
- Cloutier F, Couture R.** Pharmacological characterization of the cardiovascular responses elicited by kinin B(1) and B(2) receptor agonists in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 130: 375-385, 2000.
- Correa CR, Calixto JB.** Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br J Pharmacol.* 110(1):193-8, 1993
- Couture, R., Harrison, M., Vianna R.M. & Cloutier, F.** Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 429: 161-176, 2001.

- Couture R & Lindsey CJ.** Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neural pathways and physiological functions. In: Quirion, R., Björklund, A., Hökfelt, T. (Eds), Handbook of Chemical Neuroanatomy. Peptide Receptors, Part 1, vol. 16, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands. 241-300, 2000.
- Cravatt BF, Lichtman AH.** The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *J Neurobiol.* 61(1):149-60, 2004.
- Decosterd I, Woolf CJ.** Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain.* 87(2):149-58, 2000.
- Decosterd I, Allchorne A, Woolf CJ.** Differential analgesic sensitivity of two distinct neuropathic pain models. *Anesth Analg.* 99(2):457-63, 2004.
- DeWitt BJ, Cheng DY, Kadowitz PJ.** des-Arg⁹-bradykinin produces tone-dependent kinin B1 receptor-mediated responses in the pulmonary vascular bed. *Circ. Res.* 75: 1064-72, 1994.
- Dray A.** Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can J Physiol Pharmacol.* 75(6):704-12, 1997.
- Drummond GR, Cocks TM.** Endothelium-dependent relaxations mediated by inducible B1 and constitutive B2 kinin receptors in the bovine isolated coronary artery. *Br. J. Pharmacol.* 116: 2473-2481, 1995.
- Eckert A, Segond von Banchet G, Sopper S, Petersen M.** Spatio-temporal pattern of induction of bradykinin receptors and inflammation in rat dorsal root ganglia after unilateral nerve ligation. *Pain.* 83(3):487-97, 1999.

England JD, Happel LT, Kline DG, Gamboni F, Thouron CL, Liu ZP, Levinson SR.

Sodium channel accumulation in humans with painful neuromas. *Neurology*. 47, 272-276, 1996.

Erdos EG. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension*. 16:363-370, 1990(a).

Erdos EG. Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*;15: S20-S24, 1990(b).

Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araujo RC, Bader M, Calixto JB. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology*. 41(8):1006-12, 2001.

Frampton JE, Scott LJ. Pregabalin: in the treatment of painful diabetic peripheral neuropathy. *Drugs*. 64(24):2813-20, 2004.

Francel PC, Miller RJ, Dawson G. Modulation of bradykinin-induced inositol trisphosphate release in a novel neuroblastoma x dorsal root ganglion sensory neuron cell line (F-11). *J Neurochem*. 48(5):1632-9, 1987.

Frey EK and Kraut H. Ein neues Kreislaufhormon und seine wirkung. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol*. 133: 1-5, 1928.

Gabra BH, Couture R, Sirois P. Dualité fonctionnelle des récepteurs des kinines en physiopathologie. *Med. Sci*. 19: 1101-1110, 2003.

Gallagher AM, Yu H, Printz MP. Bradykinin-induced reductions in collagen gene expression involve prostacyclin. *Hypertension* 32: 84-88, 1998.

- Gao X, Zhang Y, Wu G.** Effects of dopaminergic agents on carrageenan hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol.* 6;406(1):53-8, 2000.
- Geppetti P.** Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul Pept.* 13;47(1):1-23, 1993.
- Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T, Guagnini F, Urban-Szabo K, Martinolle JP, Soubrié P, Finance O, Le Fur G.** SSR240612, a new non-peptide antagonist of the bradykinin B₁ receptor. Biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther.* May; 309 (2): 661-9, 2004.
- Habermann E.** Über pH-bedingte Modifikationen des kininliefernden α -globulins (Kininogen) aus Rinderserum und das Molekulargewicht von Kininogen I. *Biochem. Z.* 337: 440-448, 1963.
- Hecquet C, Tan F, Marcic BM, Erdos EG.** Human bradykinin B(2) receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. *Mol. Pharmacol.* 58: 828-836, 2000.
- Hess JF, Borkowski JA, Stonesifer GY, MacNeil T, Strader CD & Ransom RW.** Cloning and pharmacological characterization of bradykinin receptors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27: 1725-1731, 1994.
- Hess JF, Derrick AW, MacNeil T, Borkowski JA.** The agonist selectivity of a mouse B₁ bradykinin receptor differs from human and rabbit B₁ receptors. *Immunopharmacology.* 33: 1-8, 1996.
- Hunt SP, Mantyh PW.** The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci.* 2(2):83-91, 2001.

- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U.** Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(11):6155-60.
- Jensen TS, Gottrup H, Sindrup SH, Bach FW.** The clinical picture of neuropathic pain. *Europ. J. Pharmacol.* 429: 1-13, 2001, 2000.
- Jones NG, Slater R, Cadiou H, McNaughton P, McMahon SB.** Acid-induced pain and its modulation in humans. *J Neurosci.* 24(48):10974-9, 2004.
- Kammerer S, Braun A, Arnold N, Roscher AA.** The human bradykinin B2 receptor gene: full length cDNA, genomic organization and identification of the regulatory region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211: 226-233, 1995.
- Khasar SG, McCarter G, Levine JD.** Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. *J Neurophysiol.* 81(3):1104-12, 1999.
- Kidd BL, Urban LA.** Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth.* 87(1):3-11, 2001
- Kim SH, Chung JM.** An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain.* 50(3):355-63, 1992
- Kim KJ, Yoon YW, Chung JM.** Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp Brain Res.* 113(2):200-6, 1997.
- Kitamura N, Kitagawa H, Fukushima D, Takagaki Y, Miyata T, Nakanishi S.** Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J. Biol. Chem.* 260: 8610-8617, 1985.

- Kozik A, Moore RB, Potempa J, Imamura T, Rapala-Kozik M, Travis J.** A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites. Diverse effects of a mixture of neutrophil elastase and mast cell tryptase versus tissue and plasma kallikreins on native and oxidized kininogens. *J. Biol. Chem.* 273: 33224-33229, 1998.
- Kraut H, Frey EK, Werle E.** Über die Inaktivierung des Kallikreins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 192: 1-21, 1930.
- Kuhar MJ, Lloyd DG, Appel N, Loats HL.** Imaging receptors by autoradiography: computer-assisted approaches. *J. Chem. Neuroanat.* 4: 319-327, 1991.
- Kuhar MJ, DeSouza EB.** "Autoradiographic imaging: Localization of binding sites other than neurotransmitter receptors." *Visualizations of Brain Functions* 57 – 66, 1989.
- Lai J, Hunter JC, Porreca F.** The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. *Curr Opin Neurobiol.* 13(3):291-7, 2003.
- Larrivee JF, Bachvarov DR, Houle F, Landry J, Huot J, Marceau F.** Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. *J. Immunol.* 160:1419-1426, 1998.
- Layer RT, Wagstaff JD, White HS.** Conantokins: peptide antagonists of NMDA receptors. *Curr Med Chem.* 11(23):3073-84, 2004.
- Lee SD, Lee BD, Kim Y, Suh PG, Ryu SH.** Bradykinin activates phospholipase D2 via protein kinase cdelta in PC12 cells. *Neurosci Lett* 294: 130-132, 2000.

- Levy D, Zochodne DW.** Increased mRNA expression of the B₁ and B₂ bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in animal model of neuropathic pain. *Pain* 86: 265-71, 2000.
- Like AA, Butler L, Williams RM, Appel MC, Weringer EJ, Rossini AA.** Spontaneous autoimmune diabetes mellitus in the BB rat. *Diabetes*. 1982;31(Suppl 1 Pt 2):7-13.
- LoGrasso P, McKelvy J.** Advances in pain therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*. 7(4):452-6, 2003.
- Lopes P, Couture R.** Cardiovascular responses elicited by intrathecal kinins in the conscious rat. *Eur. J. Pharmacol.* 210: 137-47, 1992.
- Lortie M, Regoli D, Rhaleb NE, Plante GE.** The role of B₁- and B₂-kinin receptors in the renal tubular and hemodynamic response to bradykinin. *Am. J. Physiol.* 262: R72-R76, 1992.
- MacLean DB, Wheeler F, Hayes L.** Basal and stimulated release of substance P from dissociated cultures of vagal sensory neurons. *Brain Res.* 1990 Jun 11;519(1-2):308-14.
- Ma JX, Wang DZ, Ward DC, Chen L, Dessai T, Chao J, Chao L.** Structure and chromosomal localization of the gene (BDKRB2) encoding human bradykinin B₂ receptor. *Genomics* 23: 362-369, 1994.
- Ma QP, Hill R, Sirinathsinghji D.** Basal expression of of bradykinin B₁ receptor in peripheral sensory ganglia in the rat. *Neuroreport.* 11: 4003-5, 2000.
- Ma QP.** The expression of bradykinin B₁ receptors on primary sensory neurons that give rise to small caliber sciatic nerve fibres in rats. *Neuroscience.* 107:665-73, 2001.

- Ma QP, Heavens RR.** Basal expression of of bradykinin B1 receptor in the spinal cord in humans and rats. *Neuroreport*. 12: 2311-4, 2001.
- Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y.** Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*. 1980 Jan;29(1):1-13.
- Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR.** The B₁ receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* 50: 357-386, 1998.
- Marceau F, Larrivee JF, Bouthillier J, Bachvarova M, Houle S, Bachvarov DR.** Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B1 and B2 receptor expression in the rabbit. *Am. J. Physiol.* 277: R1568-1578, 1999.
- Mason GS, Cumberbatch MJ, Hill RG, Rupniak NM.** The bradykinin B1 receptor antagonist B9858 inhibits a nociceptive spinal reflex in rabbits. *Can J Physiol Pharmacol.* 80(4):264-8, 2002.
- Matzner O, Devor M.** Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels. *J Neurophysiol.* 72(1):349-59, 1994
- McGaraughty S, Wismer CT, Zhu CZ, Mikusa J, Honore P, Chu KL, Lee CH, Faltynek CR, Jarvis MF.** Effects of A-317491, a novel and selective P2X₃/P2X_{2/3} receptor antagonist, on neuropathic, inflammatory and chemogenic nociception following intrathecal and intraplantar administration. *Br J Pharmacol.* 2003 Dec;140(8):1381-8. Epub 2003 Nov 17.
- Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess JF.** Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 21583-21586, 1994.

- Millan DJ.** Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 2002 Apr;66(6):355-474.
- Mombouli JV, Vanhoutte PM.** Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 679-705, 1995.
- Ni A, Chao L, Chao J.** Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B₁ receptor gene in inflammation. *J. Biol. Chem.* 273: 2784-2791, 1998a.
- Ni A, Chai KX, Chao L, Chao J.** Molecular cloning and expression of rat bradykinin B₁ receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1442: 177-185, 1998b.
- Nsa Allogho S, Gobeil F, Perron SI, Hess JF & Regoli D.** Effects of kinins on isolated stomachs of control and transgenic knockout B₂ receptor mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 357: 191-196, 1998.
- Okamoto H & Greenbaum LM.** Isolation and structure of T-kinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112: 701-708, 1983.
- Ouhtit A, Ueda M, Nakazawa H, Ichihashi M, Dumaz N, Sarasin A, Yamasaki H.** Quantitative detection of ultraviolet-specific p53 mutations in normal skin from Japanese patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 6: 433-438, 1997.
- Owolabi JB, Rizkalla G, Tehim A, Ross GM, Riopelle RJ, Kamboj R, Ossipov M, Bian D, Wegert S, Porreca F, Lee DK.** Characterization of antiallodynic actions of ALE-0540, a novel nerve growth factor receptor antagonist, in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 289(3):1271-6, 1999.
- Panesar MS, Gentry CT, Urban L, Walker K, Fox A.** A model of persistent, inflammation-induced mechanical hyperalgesia in the mouse. *Br. J. Pharmacol;* 125 : 122, 1998.

- Perkins MN, Campbell E, Dray A.** Antinociceptive activity of the bradykinin B₁ and B₂ receptor antagonists, des- Arg⁹, [Leu⁸]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. *Pain.* 53: 191-7, 1993
- Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, Lewin GR, Bader M.** Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B₁ receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 8140-8145, 2000.
- Petersen M, Eckert AS, Segond VB, Heppelmann B, Klusch A, Kniffki KD.** Plasticity in the expression of bradykinin binding sites in sensory neurons after mechanical nerve injury. *Neuroscience.* 83: 949-59, 1998.
- Phagoo SB, Poole S, Leeb-Lundberg LM.** Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1 β shift the repertoire of receptor subtypes from B₂ to B₁ in human lung fibroblasts. *Mol. Pharmacol.* 56: 325-333, 1999.
- Pitcher GM, Henry JL.** Cellular mechanisms of hyperalgesia and spontaneous pain in a spinalized rat model of peripheral neuropathy: changes in myelinated afferent inputs implicated. *Eur J Neurosci.* 12(6):2006-20, 2000.
- Pomonis JD, Harrison JE, Mark L, Bristol DR, Valenzano KJ, Walker K.** N-(4-Tertiarybutylphenyl)-4-(3-chlorophyridin-2-yl)tetrahydropyrazine -1(2H)-carboxamide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: II. in vivo characterization in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jul;306(1):387-93. Epub 2003 Apr 29.

- Powell SJ, Slynn G, Thomas C, Hopkins B, Briggs I, Graham A.** Human bradykinin B₂ receptor: nucleotide sequence analysis and assignment to chromosome 14. *Genomics* 15: 435-438, 1993.
- Prado GN, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, Mierke DF, Polgar P.** Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B₂ and B₁ receptors. *J. Cell. Physiol.* 193: 275-286, 2002.
- Prat A, Biernacki K, Pouly S, Nalbantoglu J, Couture R, Antel JP.** Kinin B₁ receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59: 896-906, 2000.
- Premkumar LS, Ahern GP.** Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature.* 408(6815):985-90, 2000 Dec 21-28.
- Priest BT, Garcia ML, Middleton RE, Brochu RM, Clark S, Dai G, Dick IE, Felix JP, Liu CJ, Reiseter BS, Schmalhofer WA, Shao PP, Tang YS, Chou MZ, Kohler MG, Smith MM, Warren VA, Williams BS, Cohen CJ, Martin WJ, Meinke PT, Parsons WH, Wafford KA, Kaczorowski GJ.** A disubstituted succinamide is a potent sodium channel blocker with efficacy in a rat pain model. *Biochemistry.* 43(30):9866-76, 2004.
- Raidoo DM, Bhoola KD.** Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol Ther.* 79: 105-127, 1998.
- Rashid MH, Inoue M, Matsumoto M, Ueda H.** Switching of bradykinin-mediated nociception following partial sciatic nerve injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 308(3):1158-64, 2004.

- Regoli D & Barabe J.** Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32: 1-46, 1980.
- Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ.** Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 348: 1-10, 1998.
- Sabourin T, Guay K, Houle S, Bouthillier J, Bachvarov DR, Adam A, Marceau F.** Absence of ligand-induced regulation of kinin receptor expression in the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 133: 1154-1162, 2001.
- Sardi SP, Daray FM, Errasti AE, Pelorosso FG, Pujol-Lereis VA, Rey-Ares V, Rogines-Velo MP, Rothlin RP.** Further pharmacological characterization of bradykinin B1 receptor up-regulation in human umbilical vein. *J Pharmacol Exp Ther.* 290(3):1019-25, 1999.
- Saunders MA, Belvisi MG, Cirino G, Barnes PJ, Warner TD, Mitchell JA.** Mechanisms of prostaglandin E2 release by intact cells expressing cyclooxygenase-2: evidence for a 'two-component' model. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 1101-1106, 1999.
- Schanstra JP, Bataille E, Marin Castaño ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP & Bascands JL.** The B₁-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B₁-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 101: 2080-2091, 1998.
- Seabrook GR, Bowery BJ, Heavens R, Brown N, Ford H, Sirinathsinghi DJ, Borkowski JA, Hess JF, Strader CD, Hill RG.** Expression of B1 and B2 bradykinin receptor mRNA and their functional roles in sympathetic ganglia and

sensory dorsal root ganglia neurones from wild-type and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology*. 36(7):1009-17, 1997.

Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 43: 205-18, 1990.

Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*. 38(3):347-52, 1989.

Shortland P, Kinman E, Molander C. Sprouting of A-fibre primary afferents into lamina II in two rat models of neuropathic pain. *Eur J Pain*. 1(3):215-27, 1997.

Shughrue PJ, Ky B, Austin CP. Localization of B₁ bradykinin receptor mRNA in the primate brain and spinal cord: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*. 465: 372-384, 2003.

Siebeck M, Schorr M, Spannagl E, Lehner M, Fritz H, Cheronis JC, Whalley ET. B1 kinin receptor activity in pigs is associated with pre-existing infection. *Immunopharmacology*. 40(1):49-55, 1998.

Simonnet G, Rivat C. Opioid-induced hyperalgesia: abnormal or normal pain? *Neuroreport*. 14(1):1-7, 2003.

Sufka KJ, Roach JT. Stimulus properties and antinociceptive effects of selective bradykinin B1 and B2 receptor antagonists in rats. *Pain*. 66(1):99-103, 1996.

Su JB, Houel R, Heloire F, Barbe F, Beverelli F, Sambin L, Castaigne A, Berdeaux A, Crozatier B, Hittinger L. Stimulation of bradykinin B(1) receptors induces vasodilation in conductance and resistance coronary vessels in conscious dogs: comparison with B(2) receptor stimulation. *Circulation* 101: 1848-53, 2000.

- Suh YG, Lee YS, Min KH, Park OH, Seung HS, Kim HD, Park HG, Choi J, Lee J, Kang SW, Oh UT, Koo JY, Joo YH, Kim SY, Kim JK, Park YH.** Novel non-vanilloid VR1 antagonist of high analgesic effects and its structural requirement for VR1 antagonistic effects. *Bioorg Med Chem Lett.* 13(24):4389-93, 2003.
- Tricklebank MD, Hutson PH, Curzon G.** Involvement of dopamine in the antinociceptive response to footshock. *Psychopharmacology (Berl).*82(3):185-8, 1984.
- Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Nishigaki M, Shibata Y, Shimada S.** Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J Clin Invest.* 110(8):1185-90, 2002.
- Vasta V, Meacci E, Romiti E, Farnararo M, Bruni P.** A role for phospholipase D activation in the lipid signalling cascade generated by bradykinin and thrombin in C2C12 myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1391: 280-286, 1998.
- Webb M, McIntyre P, Phillips E.** B₁ and B₂ bradykinin receptors encoded by distinct mRNAs. *J. Neurochem.* 62: 1247-1253, 1994.
- Weisel JW, Nagaswami C, Woodhead JL, De La Cardeua RA, Page JD, Colman RW.** The shape of high molecular weight kininogen. *J. Biol. Chem.* 269: 10100-10106, 1994.
- Wolfrum S, Dendorfer A, Dominiak P.** Identification of kallidin degrading enzymes in the isolated perfused rat heart. *Jpn. J. Pharmacol.* 79: 117-120, 1999.
- Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE.** Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature.* 355(6355):75-8, 1992.

- Wotherspoon G, Winter J.** Bradykinin B₁ receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neurosci Lett.* 12: 175-8, 2000.
- Xie Y, Zhang J, Petersen M, LaMotte RH.** Functional changes in dorsal root ganglion cells after chronic nerve constriction in the rat. *J Neurophysiol.* 73(5):1811-20, 1995.
- Yamaguchi-Sase S, Hayashi I, Okamoto H, Nara Y, Matsuzaki S, Hoka S, Majima M.** Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists or kininogen deficiency in chronic constriction nerve in rats. *Inflamm Res.* 52: 164-169, 2003.
- Yamasaki S, Sawada S, Komatsu S, Kawahara T, Tsuda Y, Sato T, Toratani A, Kono Y, Higaki T, Imamura H, Tada Y, Akamatsu N, Tamagaki T, Tsuji H, Nakagawa M.** Effects of bradykinin on prostaglandin I₂ synthesis in human vascular endothelial cells. *Hypertension* 36: 201-207, 2000.
- Yang HY, Erdos EG, Levin Y.** A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim. Biophys. Acta.* 214:374-376, 1970.
- Yeomans DC, Proudfit HK.** Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: electrophysiological evidence. *Pain.* 68(1):141-150, 1996.
- Zahn PK, Subieta A, Park SS, Brennan TJ.** Effect of blockade of nerve growth factor and tumor necrosis factor on pain behaviors after plantar incision. *J Pain.* 5(3):157-63, 2004.
- Zhou X, Polgar P, Taylor L.** Roles for interleukin-1 β , phorbol ester and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B₁ receptor gene expression. *Biochem. J.* 330: 361-366, 1998.

Zhou X, Prado GN, Taylor L, Yang X, Polgar P. Regulation of inducible bradykinin B₁ receptor gene expression through absence of internalization and resensitization. *J. Cell. Biochem.* 78: 351-362, 2000.

Ziegler D, Nowak H, Kempler P, Vargha P, Low PA. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a meta-analysis. *Diabet Med.* 21(2):114-21, 2004.

Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 429(1-3):23-37, 2001.

ANNEXE**List of Publications****Articles**

a) Published

1. Burcea M, Vintila L, Lascu L, Tudosie M, Miulescu L, **Petcu M**. Acute posterior or multifocal placoid pigment epitheliopathy. *Oftalmologia*. 2001;52(2):45-6
2. Ongali, B., Campos, M.M., **Petcu, M.**, Rodi, D., Cloutier, F., Chabot J.G. , Thibault, G. and Couture, R. Expression of kinin B1 receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat. *NeuroReport*. 2004 Nov 15;15(16):2463-2466

c) In Press

1. **Petcu, M.**, Ongali, B., El-Midaoui, A., Rodi, D., de Champlain, J. and Couture, R. (2004) Effects of alpha-lipoic acid on kinin B₁ and B₂ receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. *Peptides* (2005)
2. El-Midaoui, A., Ongali, B., **Petcu, M.**, Rodi, D., de Champlain, J., Neugebauer, W., and Couture, R.. (2004) Increases of spinal kinin receptor binding sites in two rat models of insulin resistance. *Peptides* (2005)

d) In preparation

1. **Petcu M**, Ongali B, Dias JP, Pruneau D, Couture R. (2004) Role of kinin B₁ and B₂ receptors in a rat model of neuropathic pain. *Pain* (2005)

Documents & Book chapters

a) Published

1. **Petcu, M.** Vasculitis. Electromyographical and clinical study. Diploma Thesis (1995) (Dir. Alexandru Serbanescu, University of Medicine and Pharmacy “Carol Davila”, Bucharest)

Abstracts

a) Published

1. Ongali, B., El-Midaoui A, **Petcu M.**, Rodi, D., de Champlain, J. and Couture, R. Effects of Alpha-lipoic acid on kinin B₁ and B₂ receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. The Canadian Hypertension Society, 25th Annual Meeting, Calgary, 23 – 27 October, 2004
2. El-Midaoui A, Ongali, B., **Petcu M.**, Rodi, D., de Champlain, J. and Couture, R.. Induction of kinin B₁ receptors in two rat models of insulin resistance: effect of alpha-lipoic acid. The Canadian Hypertension Society, 25th Annual Meeting, Calgary, 23 – 27 October, 2004
3. **Petcu M.**, Ongali, B., Couture R. Up-regulation of kinin B₁ and B₂ receptors in the spinal cord and dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain. 34th Annual meeting of Neurosciences. San Diego, USA, 23-27 October, 2004. Abstr. 64.14
4. **Petcu M.**, Ongali, B., Couture R. Up-regulation of kinin B₁ and B₂ receptors in the spinal cord and dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain. An International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, July 31-August 4 (2004) Abstr.60, P. 66

5. El-Midaoui A, Ongali, B., **Petcu M.**, Rodi, D., de Champlain, J. and Couture, R.. (2004) Induction of kinin B₁ receptors in two rat models of insulin resistance: effect of alpha-lipoic acid. An International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, July 31-August 4 (2004) Abstr. 72, P. 69
6. Ongali, B., Campos MM., **Petcu M.**, Chabot JG, Couture R. Distribution of mRNA and kinin B₁ receptor in the central nervous system of STZ-diabetic rats. An International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, July 31-August 4 (2004) Abstr. 73, P. 70
7. Ongali, B., Midaoui AE, **Petcu M.**, Rodi, D., de Champlain, J. and Couture, R. (2004) Effects of Alpha-lipoic acid on kinin B₁ and B₂ receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. An International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, July 31-August 4 (2004) Abstr.74, P. 70
8. Ongali, B., Rodi , D., Campos, M.M., Cloutier, F., **Petcu, M.**, Neugebauer, W., Thibault, G., Regoli, D., & Couture, R. Autoradiographic characterization of bradykinin B₁ and B₂ receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. 15^{eme} Congrès annuel du G.R.S.N.A. Université de Montréal, Montréal, Canada, december 4, 2003
9. Ongali, B., Rodi , D., Campos, M.M., Cloutier, F., **Petcu, M.**, Neugebauer, W., Thibault, G., Regoli, D., & Couture, R. Autoradiographic characterization of bradykinin B₁ and B₂ receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. 33th Annual meeting of Neurosciences. 8-12th November 2003, New Orleans,

USA

10. Campos, M.M., Ongali, B., Rodi, D., Cloutier, F., **Petcu, M.**, Neugebauer, W., Thibault, G., Regoli, D., & Couture, R. Autoradiographic characterization of bradykinin B₁ and B₂ receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats XXXV Congress of the Brazilian Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. September 21st - 24th 2003, Águas de Lindóia, SP, Brazil.

Oral presentation

1. El-Midaoui A, Ongali B., **Petcu M.**, Rodi, D., de Champlain, J. and Couture, R.. Induction of kinin B₁ receptors in two rat models of insulin resistance: effect of alpha-lipoic acid. The Canadian Hypertension Society, 25th Annual Meeting, Calgary, 23 – 27 October, 2004
2. **Petcu M.**, Ongali, B., Penna Dias, J., Couture R. Up-regulation of kinin B₁ and B₂ receptors in the spinal cord and dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain. 2004 Congress of ABCD (L'Association pour les bénéficiaires des cliniques de la douleur), Montréal, Canada, 1-3 October.
3. **Petcu, M.**, Ongali, B., and Couture R. Plasticité des récepteurs aux neuropeptides dans le ganglion de la racine dorsale et la moelle épinière dans un modèle de neuropathie chez le rat. 15^{eme} Congrès annuel du G.R.S.N.A. Université de Montréal, Montréal, Canada, December 4, 2003
4. Ongali, B., Campos, M.M., Rodi, D., **Petcu, M.**, and Couture, R. Expression nerveuse centrale des récepteurs B₁ et B₂ des kinines chez le rat diabétique. 15^{eme} Congrès annuel du G.R.S.N.A. Université de Montréal, Montréal, Canada, December 4, 2003.

5. **Petcu, M.**, Ongali, B., Cloutier, F., and Couture R. Le rôle des kinines en physiopathologie sensorielle, Séminaire de maîtrise en physiologie (PSL 6051), Université de Montréal, Montréal, Canada, February 13, 2003.

AWARDS

2003 - Best oral presentation, 15^{eme} Congrès annuel du G.R.S.N.A. Université de Montréal, Montréal, Canada

