

THESE  
Présentée pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG



Discipline : SCIENCES DU VIVANT  
Option : ASPECT MOLECULAIRE ET CELLULAIRE DE LA BIOLOGIE

Par  
Cédric WOLBER

Caractérisation du mécanisme impliqué dans la  
bronchoconstriction à l'adénosine potentialisée par une  
provocation allergique chez le rat «Brown Norway »  
activement sensibilisé.

Soutenue le 13 mai 2005 devant la Commission d'examen

N. Frossard,  
J.R. Frozard  
V. Schini-Kerth,  
V. Lagente,  
C. Page,

Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse  
Rapporteur interne  
Rapporteur externe  
Rapporteur externe

---

# Table des matières

<b>Table des matières.....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des figures et des tables .....</b>	<b>5</b>
 <b>SECTION 1.</b>	
<b>1. INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 L'adénosine .....</b>	<b>10</b>
1.1.1 Le métabolisme de l'adénosine .....	10
1.1.2 Principaux effets biologiques .....	11
1.1.3 Les récepteurs de l'adénosine .....	13
1.1.3.1 Aspects généraux.....	13
1.1.3.2 Récepteurs A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub> et A <sub>3</sub> .....	15
1.1.3.2.1 Le récepteur A <sub>1</sub> .....	15
1.1.3.2.2 Le récepteur A <sub>2A</sub> .....	17
1.1.3.2.3 Le récepteur A <sub>2B</sub> .....	18
1.1.3.2.4 Le récepteur A <sub>3</sub> .....	19
1.1.3.2.5 Autres "récepteurs" liés à l'adénosine .....	21
<b>1.2 L'asthme.....</b>	<b>22</b>
1.2.1 Aspects généraux.....	22
1.2.2 Pathophysiologie .....	23
1.2.3 L'hyperréactivité bronchique (HRB) .....	26
1.2.4 La réponse à l'allergène chez les asthmatiques.....	28
<b>1.3 L'adénosine et l'asthme .....</b>	<b>29</b>
1.3.1 Le rôle de l'adénosine dans l'asthme .....	29
1.3.2 La réponse bronchoconstrictive à l'adénosine chez les asthmatiques.....	32
1.3.3 La réponse bronchoconstrictive à l'adénosine dans le rat BN comme modèle de la bronchoconstriction à l'adénosine dans l'asthme.....	37

---

---

## SECTION 2.

<b>2. OBJECTIFS ET INTÉRÊTS DU PROJET.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1 Les asthmatiques .....</b>	<b>40</b>
<b>2.2 Le rat BN.....</b>	<b>40</b>
<b>2.3 Les objectifs fixés.....</b>	<b>41</b>

## SECTION 3.

<b>3. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1 Les animaux .....</b>	<b>43</b>
3.1.1 Les rats et les cochons d'Inde .....	43
3.1.2 Les chiens .....	43
<b>3.2 La sensibilisation active des rats BN à l'ovalbumine .....</b>	<b>44</b>
<b>3.3 Provocation avec l'ovalbumine .....</b>	<b>45</b>
<b>3.4 Bande de parenchyme du poumon de rat .....</b>	<b>45</b>
3.4.1 Prélèvement des poumons et préparation des bandes de parenchyme .....	45
3.4.2 Protocole expérimental standard .....	45
<b>3.5 Matériels.....</b>	<b>47</b>
<b>3.6 Analyse des données .....</b>	<b>48</b>

## SECTION 4.

<b>4. RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Quel rôle pour les mastocytes du poumon dans l'augmentation de la réponse à l'adénosine à la suite d'une provocation allergique ? .....</b>	<b>51</b>
4.1.1 Publication 1: <i>Interaction between adenosine and allergen or compound 48/80 on lung parenchymal strips from actively sensitized Brown Norway rats</i> .....	51
4.1.2 Résumé et expériences complémentaires .....	59

---

---

## **4.2 Caractérisation du(es) récepteur(s) impliqué(s) dans la réponse contractile à l'adénosine de la bande de parenchyme de poumons suite à une provocation allergique..... 68**

4.2.1 Un site d'action extracellulaire pour l'adénosine ? Effets du NBTI, un bloqueur du transport facilité de l'adénosine ..... 68

4.2.2 Tachyphylaxie croisée entre l'adénosine et le NECA : Un mécanisme d'action commun ? ..... 71

4.2.3 Effets des agonistes des récepteurs de l'adénosine ..... 76

4.2.3.1 Publication 2: *Evidence for an atypical receptor mediating the augmented bronchoconstrictor response to adenosine induced by allergen challenge in actively sensitised Brown Norway rats* ..... 76

4.2.3.2 Comparaison de l'activité des agonistes sur la bande de parenchyme prélevée de rats BN AS à l'OA et provoqués avec l'allergène..... 90

4.2.3.3 Publication 3: *The receptor mechanism mediating the contractile response to adenosine on lung parenchymal strips from actively sensitized, allergen-challenged Brown Norway rats* ..... 94

4.2.3.4 Les effets de CPA et 2-Cl-IB-MECA à des concentrations élevées et de l'inosine, un agoniste sélectif du récepteur A<sub>3</sub>..... 107

4.2.4 Effets des antagonistes des récepteurs de l'adénosine ..... 116

4.2.4.1 Publication 4: *Antagonist pharmacology of adenosine A<sub>2B</sub> receptors from rat guinea pig and dog*..... 116

4.2.4.2 Existe t'il des différences pharmacologiques entre les récepteurs A<sub>2B</sub> suivant les espèces ? ..... 124

4.2.4.3 Effets des antagonistes sélectifs et non sélectifs aux récepteurs à l'adénosine ..... 127

4.2.5 Les effets de la toxine pertussique ..... 135

## **SECTION 5.**

### **5. DISCUSSION GÉNÉRALE ..... 138**

**5.1 Chez le rat BN, est-ce que la réponse contractile à l'adénosine sur la bande de parenchyme *in vitro* reflète la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine *in vivo* ? .. 139**

**5.2 Est-ce que les mastocytes des poumons induisent la réponse augmentée à l'adénosine ?..... 141**

---

---

5.3 Est-ce que l'activation (ou «priming») des mastocytes est le mécanisme de la potentialisation de l'adénosine par l'allergène ? .....	142
5.4 Est-ce que le(s) récepteur(s) induisant la réponse à l'adénosine est(sont) intracellulaire(s) ? .....	147
5.5 Est-ce qu'un récepteur atypique induit la réponse à l'adénosine ? .....	147
5.6 Démêler le mystère du récepteur atypique de l'adénosine.....	148
5.7 La localisation cellulaire du récepteur A <sub>1</sub> qui induit une partie de la réponse augmentée à l'adénosine sur la bande de parenchyme.....	152
5.8 Les similarités et les différences entre la réponse contractile à l'adénosine sur la bande de parenchyme <i>in vitro</i> et la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine <i>in vivo</i> .....	153
5.9 Est-ce que l'hyperréactivité bronchique à l'adénosine induite par une provocation allergique chez le rat est un bon modèle pour la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine dans l'asthme ? .....	154
5.10 Quelles études pour l'avenir ? .....	155
 <b>SECTION 6.</b>	
<b>6. RÉFÉRENCES .....</b>	<b>157</b>
 <b>SECTION 7.</b>	
<b>7. ANNEXE .....</b>	<b>186</b>
<b>7.1 Abréviations.....</b>	<b>187</b>
<b>7.2 Présentations et Publications.....</b>	<b>190</b>
7.2.1 Présentations.....	190
7.2.2 Publications .....	190
<b>7.3 Publication 5: <i>Modeling the Response of the Asthmatic Airways to Adenosine: Mechanisms and Receptors</i>.....</b>	<b>191</b>
 <b>Summary .....</b>	<b>200</b>
 <b>Résumé.....</b>	<b>201</b>

---

## Liste des figures et des tables

### Figures

<i>Fig. 1.1</i> Synthèse et métabolisme de l'adénosine .....	12
<i>Fig. 1.2</i> Dendrogramme des récepteurs de l'adénosine .....	14
<i>Fig. 1.3</i> Pathophysiologie de l'asthme: les divers mécanismes y contribuant.....	25
<i>Fig. 3.1</i> Séquence de sensibilisation du rat.....	44
<i>Fig. 3.2</i> Exemple d'un tracé standard .....	47
<i>Fig. 3.3</i> Effet du DMSO (20 µl; concentration finale dans le milieu d'incubation 0.1 %) sur la réponse contractile à l'adénosine (30, 100, 300, 1000 µM) sur les bandes de parenchyme de poumons de rats BN AS et provoqués 3 h avant d'être sacrifiés avec de l'OA (0.3 mg kg <sup>-1</sup> ; i.t.).....	47
<i>Fig. 4.1</i> Interaction entre l'OA et l'adénosine sur les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS. Représentation de l'enregistrement expérimental des tissus traités avec l'OA (10 µg ml <sup>-1</sup> ) ou une solution saline. ....	60
<i>Fig. 4.2</i> Effets du méthysergide (Méthy, 10 ou 30 nM) et de l'iralukast (Ira, 1 µM) seuls ou combinés, sur les réponses des bandes de parenchyme de poumons prélevées chez des rats BN AS et provoqués à l'OA (10 µg ml <sup>-1</sup> ) .....	64
<i>Fig. 4.3</i> Interaction entre le composé 48/80 ou la 5-HT et l'adénosine sur la bande de parenchyme de poumons prélevée sur des rats BN AS.....	65
<i>Fig. 4.4</i> Interaction entre l'OA et le composé 48/80 sur la bande de parenchyme de poumons prélevée sur des rats BN AS.....	66
<i>Fig. 4.5</i> Schéma représentant le principe de l'expérience en présence de NBTI qui bloque le transport facilité de l'adénosine .....	69
<i>Fig. 4.6</i> Effet du S-(p-nitrobenzyl)-6-thio-inosine (NBTI), 100 nM, sur la réponse contractile à l'adénosine, au NECA et à la 5-HT sur les bandes de parenchyme de poumons de rats BN AS et provoqués 3 h avant d'être sacrifiés avec l'OA (0.3 mg kg <sup>-1</sup> ; i.t.) .....	71
<i>Fig. 4.7</i> Tachyphylaxie et tachyphylaxie croisée entre l'adénosine et le NECA dans les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués à l'OA (0.3 mg kg <sup>-1</sup> ) 3 h avant d'être sacrifiés .....	73
<i>Fig. 4.8</i> Effet de l'adénosine, du CPA, du CGS 21680 et du 2-Cl-IB-MECA ou de combinaisons de ces derniers sur les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA (0.3 mg kg <sup>-1</sup> ; i.t.) 3 h avant d'être sacrifiés .....	91

- 
- Fig. 4.9** Ces résultats représentent les changements de la sensibilité de la 5-HT dans les expériences présentées dans la Publication 3, Fig. 1, qui montrent les effets de l'adénosine, du CPA et du 2-Cl-IB-MECA, sur les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.t.) ou le véhicule 3 h avant d'être sacrifiés..... 109
- Fig. 4.10** Ces résultats représentent les changements de la sensibilité de la 5-HT dans les expériences présentées dans la Publication 3, Fig. 2, qui montrent les effets du DPCPX, du 2-Cl-IB-MECA et du méthysergide sur la réponse à l'adénosine, dans les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.t.) 3 h avant d'être sacrifiés..... 110
- Fig. 4.11** Ces résultats représentent les changements de la sensibilité de la 5-HT dans les expériences présentées dans la Publication 3, Fig. 3, qui montrent les effets du DPCPX et du méthysergide sur la réponse au CPA sur les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.t.) 3 h avant d'être sacrifiés..... 111
- Fig. 4.12** Ces résultats représentent les changements de la sensibilité de la 5-HT dans les expériences présentées dans la Publication 3, Fig. 4, qui montrent les effets du 2-Cl-IB-MECA sur la réponse à l'adénosine, dans les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.t.) 3 h avant d'être sacrifiés..... 113
- Fig. 4.13** Ces résultats représentent les changements de la sensibilité de la 5-HT dans les expériences présentées dans la Publication 3, Fig. 5, qui montrent premièrement (A) les effets de l'inosine sur les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.t.) ou le véhicule 3 h avant d'être sacrifiés, et deuxièmement (B) les effets du DPCPX, du 2-Cl-IB-MECA, du disodium cromoglycate et du méthysergide sur la réponse à l'inosine, dans les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.t.) 3 h avant d'être sacrifiés..... 114
- Fig. 4.14** Les effets des antagonistes des récepteurs à l'adénosine, 8-SPT, CGS 15943, XAC, MRS 1754, DPCPX, théophylline, MRS 1523 ou MRS 1191 en réponse à l'adénosine (1 mM) sur les bandes de parenchyme de poumon prélevées de rats BN AS et provoqués 3 h avant leur mort avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$  i.t.)..... 129
- Fig. 4.15** Les effets des antagonistes des récepteurs à l'adénosine, 8-SPT, CGS 15943, XAC, MRS 1754, DPCPX, théophylline, MRS 1523 ou MRS 1191 en réponse à la 5-HT (0.01 mM) sur les bandes de parenchyme de poumon prélevées de rats BN AS et provoqués 3 h avant leur mort avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$  i.t.)..... 130
- Fig. 4.16** Les effets de la durée d'incubation avec le 8-SPT sur la réponse à l'adénosine sur les bandes de parenchyme de poumon prélevées de rats BN AS et provoqués 3 h avant leur mort avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$  i.t.) ..... 131
-

- 
- Fig. 4.17** Les effets du CGS 15943 sur la réponse à l'adénosine (1 mM) ou celle au NECA (100  $\mu$ M) sur les bandes de parenchyme de poumon prélevées de rats BN AS et provoqués 3 h avant leur mort avec l'OA (0.3 mg kg<sup>-1</sup> i.t.) ..... 132
- Fig. 5.1** Schéma illustrant la différence entre le «priming» et l'activation des mastocytes représentant une explication possible pour l'augmentation de la réponse à l'adénosine suite à une provocation avec l'OA ou le composé 48/80 sur les bandes de parenchyme de poumons de rats BN AS ..... 143
- Fig. 5.2** Représentation schématique des voies de signalisations intracellulaires couplées aux récepteurs A<sub>3</sub> ou Fc $\epsilon$ RI et activées par le composé 48/80 ..... 146

## Tables

- Table 1.1** Classification et propriétés des récepteurs de l'adénosine ..... 16
- Table 4.1** Affinités des antagonistes pour les sous-types de récepteurs à l'adénosine du rat et leur efficacité comme antagonistes sur la réponse à l'adénosine sur les bandes de parenchyme de poumons prélevées chez des rats BN AS et provoqués 3 h avant d'être sacrifiés avec l'OA ..... 133
- Table 5.1** Comparaison des principales caractéristiques de la bronchoconstriction induite par l'adénosine dans l'asthme avec les réponses bronchoconstrictives à l'adénosine chez le rat BN (*in vivo*) et les réponses contractiles à l'adénosine sur les bandes de parenchyme de poumons (*in vitro*). ..... 155
-

## **SECTION 1.**



### **1. Introduction Générale**

---

La potentialisation de la sensibilité des voies respiratoires aux bronchospasmogènes est une des composantes qui définit le mieux l'asthme (Global initiative for asthma, 2002). L'une des caractéristiques les plus remarquables du phénomène est l'augmentation de cette sensibilité à l'adénosine ou au 5'-adénosine monophosphate (AMP). Généralement, seuls les asthmatiques, et plus particulièrement les asthmatiques allergiques, répondent à l'adénosine par une forte bronchoconstriction alors que les non-asthmatiques ne le font pas (Polosa et Holgate, 1997; Meade *et al.*, 2001; Polosa, 2002; van den Berge *et al.*, 2004b).

Le laboratoire du Dr. Fozard s'intéresse depuis quelques années aux mécanismes de régulation de la réponse à l'adénosine chez les asthmatiques (Fozard *et al.*, 2003). Un modèle expérimental d'hyperréactivité bronchique à l'adénosine a été développé chez des rats de l'espèce Brown Norway (BN), qui imite beaucoup de caractéristiques des réponses cliniques chez les patients asthmatiques (Fozard et Hannon, 2000; Hannon *et al.*, 2001). En effet, il a été démontré que la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine est régulée de manière très marquée par une provocation allergique chez les animaux activement sensibilisés (AS).

Mon projet a débuté en 2001. Il s'agissait de mieux définir le mécanisme de l'augmentation de la réponse à l'adénosine à la suite d'une exposition à l'allergène chez le rat BN AS et de le comparer avec la réponse à l'adénosine ou l'AMP chez les patients asthmatiques. Dans les sections suivantes, je fournirai des bases d'informations sur les éléments clés concernant mes études. Premièrement je passerai en revue l'adénosine, sa formation et son métabolisme, ses récepteurs et ses effets physiologiques et pharmacologiques. Ensuite, je définirai les différentes formes d'asthme et le rôle de l'adénosine dans ces conditions. Je mettrai particulièrement l'accent sur la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine chez les asthmatiques et sur le rôle des mastocytes dans cette réponse. Finalement, je décrirai le rôle de

---

la sensibilisation active et de la provocation allergénique afin de déterminer les effets de la réponse à l'adénosine sur les voies aériennes de rat BN.

## 1.1 L'adénosine

On retrouve dans la littérature un grand nombre d'études récentes et très complètes concernant l'adénosine, ses récepteurs ainsi que les effets physiologiques et pharmacologiques liés à leur activation (Collis et Hourani, 1993; Feoktistov et Biaggioni, 1997; Ralevic et Burnstock, 1998; Fredholm *et al.*, 2001a; Fozard et Hannon, 2002; Fozard et McCarthy, 2002; Polosa, 2002; Fozard *et al.*, 2003; Yaar *et al.*, 2004). Je me suis beaucoup servi de ces publications pour écrire les parties suivantes.

### 1.1.1 Le métabolisme de l'adénosine

L'adénosine (9- $\beta$ -D-ribofuranosyl-6-aminopurine) est un nucléoside ubiquitaire de type purine qui est formé à partir de deux voies de synthèse principales: la déphosphorylation du 5'-adénosine monophosphate (AMP) et/ou l'hydrolyse de la S-adénosinehomocystéine (SAH) (Fig. 1.1). La première voie de synthèse est la plus importante quantitativement. C'est une voie dépendante de l'ATP (adénosine triphosphate) et de l'ADP (adénosine diphosphate). L'ATP est synthétisée à partir de l'ADP au cours de la glycolyse, mais surtout au cours de la respiration mitochondriale, grâce à une ATPase de type F ou une ATP synthase. L'ATP va former de l'ADP via une ATPase et cet ADP va lui-même former de l'AMP via une adénylate kinase (Fig. 1.1 cycle bleu). L'adénosine provient de l'hydrolyse de l'adénosine-monophosphate, AMP, sous l'influence d'une 5-nucléotidase, enzyme à la fois intra et extracellulaire. Lors de la seconde voie de synthèse le catabolisme de la SAH par la S-adénosylhomocystéine hydrolase, forme de l'homocystéine et de l'adénosine (Fig. 1.1 cycle vert).

---

L'adénosine est métabolisée en inosine sous l'influence de l'adénosine déaminase. L'inosine produit elle-même l'hypoxanthine sous l'influence d'une purine nucléoside phosphorylase. L'inhibition de l'adénosine déaminase tend à augmenter la concentration d'adénosine. De plus ces nucléosides peuvent être recyclés en 5'-AMP par le biais de la voie de synthèse des purines (Fig. 1.1 cycle rouge). La majorité de l'adénosine exogène est captée par les tissus via des transporteurs facilités qui peuvent être inhibés de façon compétitive à l'aide d'une grande variété de nucléosides ou de substances non nucléosidiques tel que le dipyridamole, le S-(p-nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBTI) et le N6-(L-2-phenylisopropyl) adénosine (Fitzgerald, 1987, Clanachan et Parkinson, 1990; voir section 4.2.1). Le blocage de ce processus produit une augmentation de la réponse à l'adénosine. L'adénosine libérée dans le plasma a une demi-vie extrêmement courte, environ une seconde, car, outre les biotransformations métaboliques, elle est captée par les érythrocytes et d'autres tissus. Des effets à distance des sites de sa libération sont donc peu probables.

### **1.1.2 Principaux effets biologiques**

L'adénosine est une molécule qui recouvre un très large spectre d'activités biologiques et qui affecte plusieurs systèmes ou organes vitaux. Au niveau du système respiratoire l'adénosine régule la contraction du muscle lisse bronchique, augmente la sécrétion de mucus et module l'activité d'un grand nombre de cellules immuno-inflammatoires associées avec certaines maladies pulmonaires inflammatoires (Feoktistov et Biaggioni, 1998; Ralevic et Burnstock, 1998; Fozard et Hannon, 1999; Fredholm *et al.*, 2001a; Fozard et McCarthy, 2002; Holgate, 2002; Polosa 2002; Yaar *et al.*, 2004). D'autres effets biologiques importants se manifestent au niveau des vaisseaux (vasodilatation et vasoconstriction), des plaquettes (effet anti-agrégant), du rein (inhibition de la libération de rénine et de la réabsorption tubulaire), du cœur (effets inotropique négatif, dromotropique et chronotropique) et du système nerveux

---

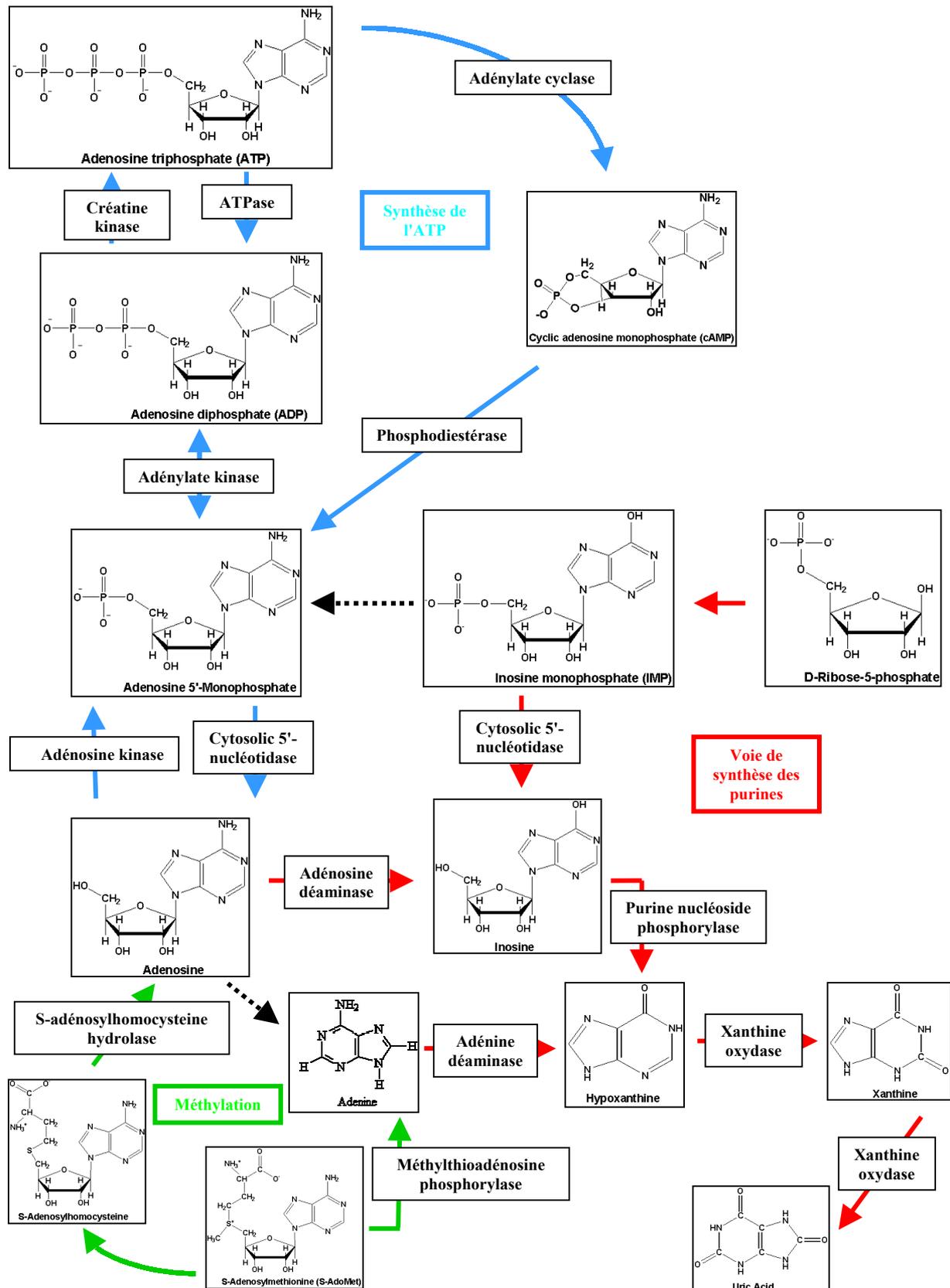


Fig. 1.1 Synthèse et métabolisme de l'adénosine (d'après Olsson et Pearson, 1990)

autonome (réduction de l'activité des neurones sympathiques et parasympathiques). Dans le système nerveux central, l'adénosine induit un effet analgésique, anti-convulsant, neuroprotecteur, anxiolytique et inhibe l'activité motrice (Collis et Hourani, 1993; Ralevic et Burnstock, 1998; Fredholm *et al.*, 2001a).

## **1.1.3 Les récepteurs de l'adénosine**

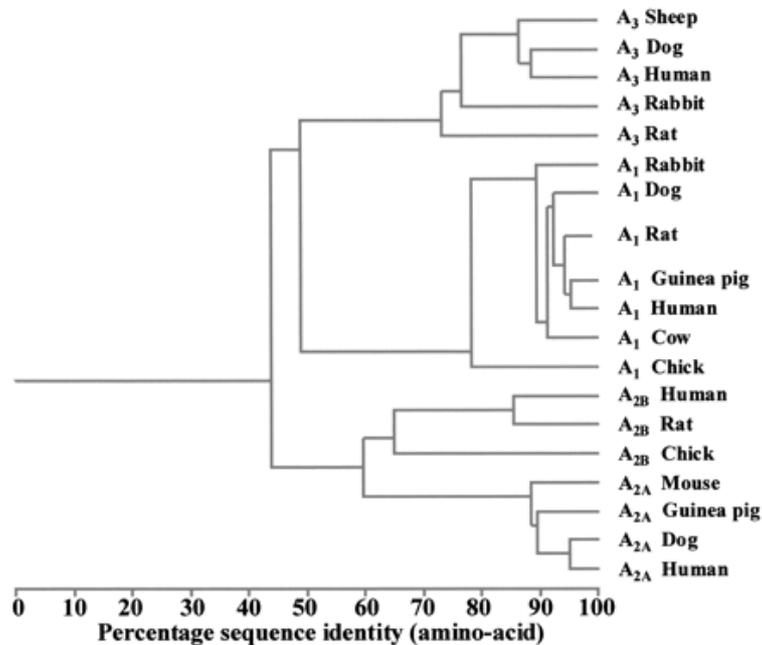
### **1.1.3.1 Aspects généraux**

Les premiers concepts de stimulation par l'adénosine ont été élaborés dans le cerveau et mettent en avant une implication de récepteurs spécifiques situés à la surface de la cellule (Sattin et Rall, 1970). Un peu plus tard, une nouvelle subdivision fait son apparition. On classe alors les récepteurs en deux catégories, ceux activés par l'adénosine, les récepteurs purinergiques (P1), et ceux activés par l'ATP, les récepteurs purinergiques (P2) (Burnstock, 1978). Les récepteurs P1 sont alors eux même divisés en A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> en fonction de leur activité respective, soit l'inhibition (A<sub>1</sub>), soit la stimulation (A<sub>2</sub>) de l'adénylate cyclase (van Calker *et al.*, 1979; Londos *et al.*, 1980). La classe des récepteurs A<sub>2</sub> a alors été divisée en deux groupes; A<sub>2A</sub> et A<sub>2B</sub>, selon que leur site de liaison soit de haute ou de basse affinité (Daly *et al.*, 1983). Plus récemment il a été décrit un quatrième sous-type de récepteur à l'adénosine: A<sub>3</sub> (Zhou *et al.*, 1992). Ces quatre sous-types de récepteurs ont tous été clonés à partir de plusieurs espèces différentes et leur structure est au jour d'aujourd'hui bien identifiée.

Comme le démontre le dendrogramme (Fig. 1.2), il existe une faible homologie des acides aminés entre les différents récepteurs de l'adénosine d'une même espèce et entre les mêmes récepteurs de l'adénosine d'espèces différentes. Cela pourrait expliquer la différence entre les espèces, la puissance et la sélectivité des ligands pour cette classe de récepteurs. Par exemple, bien que les récepteurs de l'homme et du mouton sont susceptibles d'être antagonisés par les xanthines et leurs dérivés, les récepteurs A<sub>3</sub> du rat, du lapin et de la gerbille y sont résistants

---

(Yaar *et al.*, 2004). Il existe aussi des différences pharmacologiques significatives entre les récepteurs  $A_1$  et  $A_{2A}$  pour différentes espèces (Tucker *et al.*, 1992; Kull *et al.*, 1999).



**Fig. 1.2** Dendrogramme des récepteurs de l'adénosine (d'après Fredholm *et al.*, 2001a)

Les quatre sous-types des récepteurs de l'adénosine sont tous des récepteurs comprenant 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G. La partie N-terminale du récepteur est extracellulaire. Bien que la troisième boucle intracellulaire et la partie C-terminale contribuent au couplage du récepteur  $A_1$  avec les protéines G, seule la troisième boucle intracellulaire est impliquée dans le couplage des protéines G avec  $A_{2A}$  (Tucker *et al.*, 2000). La phosphorylation des boucles intracellulaires semble aussi être impliquée dans la désensibilisation des récepteurs à l'adénosine (Palmer et Stiles, 1997).

Les récepteurs de l'adénosine couplés aux protéines G réagissent à une activation ou à une exposition à un agoniste en s'internalisant. Cela a été montré pour le récepteur  $A_1$  sur les neutrophiles (Falleni *et al.*, 1999) et le muscle lisse (Saura *et al.*, 1998), ainsi que pour les autres sous types de récepteurs à l'adénosine,  $A_{2A}$  (Mundell et Kelly, 1998),  $A_{2B}$  (Penn *et al.*,

2001) et A<sub>3</sub> (Macchia *et al.*, 2001). L'internalisation des récepteurs est suivie par un recyclage et une réexposition sur la membrane ou une dégradation qui à long terme réduit le nombre de récepteur sur la cellule.

Les protéines G<sub>γ</sub> peuvent être réparties en quatre classes en fonction des homologies de séquence: G<sub>s</sub> ("s" pour : stimulant l'adénylate cyclase) est composée de quatre types de sous-unités G<sub>s</sub>, issues d'un épissage alternatif, et de la protéine G<sub>olf</sub>, spécifique de l'épithélium olfactif. G<sub>i/o</sub>("i" pour : inhibant l'adénylate cyclase) comporte les deux types de transducine G<sub>t1</sub> et G<sub>t2</sub> (des cellules en bâtonnet et en cône de la rétine), trois sous-unités G<sub>i</sub>, trois sous-unités G<sub>o</sub> ("o" pour : other) et la sous-unité G<sub>z</sub>. G<sub>q/11</sub> est constituée de G<sub>q</sub>, G<sub>11</sub>, G<sub>14</sub>, G<sub>15</sub>, G<sub>16</sub>. G<sub>12</sub> est formée des sous unités G<sub>12</sub> et G<sub>13</sub>. Le couplage des protéines G avec les divers récepteurs de l'adénosine ainsi que les seconds messagers impliqués est décrit dans la Table 1.1.

### **1.1.3.2 Récepteurs A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub>**

Les récepteurs A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub> sont localisés dans divers endroits du corps et leur mécanisme d'action se différencie par un couplage à des protéines G dont les sous-unités varient (Table 1.1). Ils sont également caractérisés par leur sensibilité face à divers agonistes et antagonistes. Le rôle clef de ces récepteurs, en particulier dans les voies respiratoires normales et lors d'une inflammation pulmonaire, sera caractérisé plus loin.

#### **1.1.3.2.1 Le récepteur A<sub>1</sub>**

L'élimination génétique du récepteur A<sub>1</sub> chez la souris s'exprime de manière surprenante par une physiologie tout à fait normale. Toutefois, quand l'organisme est perturbé (par exemple sujet à une hypoxie, une ischémie, une douleur ou une augmentation du travail des reins) des différences apparaissent entre des animaux intacts et des animaux dépourvus du récepteur A<sub>1</sub>

---

(Fredholm *et al.*, 2003). Les résultats obtenus dans des expériences où il manque le récepteur A<sub>1</sub> des souris sont en accord avec ceux obtenus par une approche pharmacologique classique.

Sous-types	Protéine G couplée	Mécanisme de transduction	Agonistes	Antagonistes	Localisation
A <sub>1</sub>	G <sub>i/o</sub>	↓AMPc ↓Ca <sup>2+</sup> ↑IP <sub>3</sub> ↑K <sup>+</sup>	CPA > CHA > NECA >> CGS 21680	DPCPX > XAC > CGS 15943 > 8-SPT	Cœur, adipocyte, muscle lisse respiratoire, neutrophile, rein, hippocampe, cortex
A <sub>2A</sub>	G <sub>s</sub>	↑AMPc	ATL 146 > CGS 21680 = NECA >> CHA	SCH 58261 > ZM 241385 ≈ CGS 15943 ≥ XAC > DPCPX	Plaquette, neutrophile, système vasculaire, pancréas, striatum
A <sub>2B</sub>	G <sub>s</sub> G <sub>q/11</sub>	↑AMPc ↑Ca <sup>2+</sup> ↑IP <sub>3</sub> ↑ERK	NECA > CHA >> CGS 21680	MRS 1754 > XAC > CGS 15943 > DPCPX	Muscle lisse vasculaire, intestinal et respiratoire, cellule chromaffine, mastocyte, cerveau
A <sub>3</sub>	G <sub>i</sub> G <sub>q/11</sub>	↓AMPc ↑IP <sub>3</sub>	2-CI-IB-MECA > APNEA > NECA ≈ CGS 21680	MRS 1523 ≈ MRS 1191 > I- ABOXP >> XAC > DPCPX	Testicule, rein, poumon, mastocyte, éosinophile, neutrophile, cœur, cortex, striatum

**Table 1.1** Classification et propriétés des récepteurs de l'adénosine. Basé sur Ralevic et Burnstock (1998); Fozard et Hannon (1999); Fredholm *et al.* (2001a); Mueller (2003).

Les récepteurs A<sub>1</sub> sont couplés à des systèmes de seconds messagers qui conduisent soit à l'activation, soit à l'inhibition des cellules suite à une stimulation du récepteur. Par exemple, l'activation des récepteurs A<sub>1</sub> couplés à G<sub>i</sub> inhibe l'adénylate cyclase, diminue la concentration d'AMP cyclique intracellulaire et augmente la formation de l'IP<sub>3</sub> (inositol triphosphate). De tels effets favorisent l'activation des cellules comme par exemple la dégranulation des éosinophiles et la libération de médiateurs lorsqu'ils sont stimulés (Ezeamuzie et Phillips,

1999). Les neutrophiles humains possèdent un récepteur  $A_1$  qui facilite l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium et la chémotaxie (Cronstein *et al.*, 1990).

Les travaux effectués sur des lapins rendus allergiques à la naissance par immunisation avec divers antigènes mettent en évidence l'implication du récepteur  $A_1$  dans l'asthme expérimental (Ali *et al.*, 1994a; 1994b; El-Hashim *et al.*, 1996). Les résultats montrent que la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine est médiée par le récepteur  $A_1$  sur le muscle lisse et est surexprimée dans les animaux allergiques. Nyce et Metzger (1997) ont traité des lapins avec un oligodésoxynucléotide antisens ciblé contre le codon d'initiation de l'ARN<sub>m</sub> (acide ribonucléique de type m) du récepteur  $A_1$ . Les animaux auxquels on a sélectivement retiré le récepteur  $A_1$  présentent une inhibition significative de la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine et à l'allergène.

L'activation du récepteur  $A_1$  favorise l'ouverture des canaux potassiques (par exemple dans le coeur et les neurones). Ceci résulte en une diminution des effets cardiaques, dont l'activation produit des effets chronotropiques, inotropiques et dromotropiques négatifs, ainsi qu'en une réduction de l'excitabilité neuronale et de la libération de transmetteurs.

Les analogues de l'adénosine, le CPA ( $N^6$ -cyclopentyladénosine) et le CHA ( $N^6$ -cyclohexyladénosine) sont des exemples d'agonistes avec une forte puissance et une grande sélectivité pour le récepteur  $A_1$ . XAC et DPCPX montrent une activité antagoniste sélective pour ce site (Table 1.1).

#### **1.1.3.2.2 Le récepteur $A_{2A}$**

Le récepteur  $A_{2A}$ , comme le récepteur  $A_1$ , a été découvert au niveau du cerveau, mais avec une distribution différente; en effet il est surtout présent dans le striatum et le tubercule olfactif (Jarvis et Williams, 1989). Plus tard on a également établi une distribution dans la majorité des organes périphériques (Stehle *et al.*, 1992; Dixon *et al.*, 1996). Les souris auxquelles il

---

manque le récepteur  $A_{2A}$  présentent une augmentation de leur niveau d'anxiété, d'agressivité, de leur pression sanguine (Ledent *et al.*, 1997) ainsi que de la sensibilité à une gamme de stimuli inflammatoires (Ohta et Sitkovsky, 2001). Le récepteur  $A_{2A}$  est couplé à une protéine  $G_s$  qui va stimuler la formation d'AMPc, ce qui a pour but d'inhiber généralement une fonction cellulaire comme par exemple au niveau de l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium (Grisham *et al.*, 1989; Cronstein *et al.*, 1992; Fredholm *et al.*, 1996; Hannon *et al.*, 1998), l'augmentation de l'expression des intégrines (Wollner *et al.*, 1993), l'activation des lymphocytes T (Koshiba *et al.*, 1999) et la suppression de la libération par les mastocytes pulmonaires humains de la tryptase induite par Fc $\epsilon$ RI (Récepteur de haute affinité pour les IgE [Immunoglobuline E]) (Suzuki *et al.*, 1998). En supprimant l'action des mastocytes, des lymphocytes T, des neutrophiles et des macrophages, la stimulation du récepteur  $A_{2A}$  résulte en un effet anti-inflammatoire (Cronstein, 1994). Les récepteurs  $A_{2A}$  induisent aussi la vasodilatation et inhibent l'agrégation plaquettaire (Ralevic et Burnstock, 1998).

Il existe un grand nombre de ligands sélectifs pour le récepteur  $A_{2A}$ ; CGS 21680 et ATL 146 (dérivé du NECA modifié en C2) sont des agonistes puissants et sélectifs. SCH 58261 et ZM 214385 sont des antagonistes qui montrent une bonne sélectivité pour ce site (Table 1.1).

### **1.1.3.2.3 Le récepteur $A_{2B}$**

Le récepteur  $A_{2B}$  est réparti dans l'ensemble du corps mais en faible densité (Stehle *et al.*, 1992; Dixon *et al.*, 1996). Il est couplé à une protéine  $G_s$  qui active l'adénylate cyclase ou à une protéine  $G_q$  qui active la phospholipase C (PLC). L'activation du récepteur  $A_{2B}$  peut donc conduire à une activation ou une inhibition d'une fonction similaire. L'activation des récepteurs  $A_{2B}$  conduit à l'inhibition de plusieurs muscles lisses (voir section 4.2.4.2), à l'inhibition de la libération de TNF $\alpha$  des monocytes humains, THP-1 (Munro *et al.*, 1998), induit par le LPS et supprime l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les

---

macrophages de souris induit par l'INF $\gamma$  (Xaus *et al.*, 1999). Au contraire, dans la lignée des mastocytes humains, MHC-1, l'activation du récepteur A<sub>2B</sub> résulte en une augmentation de la libération d'IL-8 (Interleukine 8) *per se* et une augmentation de la sécrétion d'IL-8 induite du phorbol myristyl acétate (PMA) (Feoktistov et Biaggioni, 1997; 1998). Il existe d'autres preuves de l'implication des récepteurs A<sub>2B</sub> dans la dégranulation des mastocytes de l'homme (voir section 4.2.4.2). Le principe est similaire dans la lignée mastocytaire canine (Meade *et al.*, 1996; Feoktistov et Biaggioni, 1997; Auchampach *et al.*, 1997).

Bien que l'affinité pour le NECA soit relativement élevée, il n'existe pas d'agonistes ou d'antagonistes sélectifs pour le récepteur A<sub>2B</sub>. Dans la littérature, il a été revendiqué que MRS 1754 est un antagoniste sélectif pour le récepteur A<sub>2B</sub> (Kim *et al.*, 2000), mais dans la réalité il montre également une forte affinité pour le récepteur A<sub>1</sub> de rat (Fozard, résultats non publiés).

#### **1.1.3.2.4 Le récepteur A<sub>3</sub>**

Le récepteur A<sub>3</sub> diffère des autres récepteurs par le fait que sa structure, sa distribution dans les tissus et sa pharmacologie sont très variables entre les espèces (Linden, 1994; Ralevic et Burnstock, 1998). Les études effectuées sur des souris dépourvues du récepteur A<sub>3</sub> démontrent un rôle clé pour ce récepteur dans la dégranulation des mastocytes, dans la régulation du flux coronaire et dans le contrôle de la pression intraoculaire (Yaar *et al.*, 2004). Le récepteur A<sub>3</sub> partage avec le récepteur A<sub>1</sub> les mécanismes de transduction des messagers secondaires (inhibition de l'adénylate cyclase, augmentation de l'IP<sub>3</sub>) ce qui induit une activation de la cellule. De plus, les récepteurs A<sub>3</sub> sont présent sur les éosinophiles de l'homme (Ji *et al.*, 1994) et leur activation conduit à une augmentation du calcium intracellulaire (Kohno *et al.*, 1996). Paradoxalement, il n'est pas évident de prouver la stimulation des éosinophiles à partir de ces sites d'action. En réalité, Ezeamuzie et Phillips (1999), Reeves *et al.* (2000) et Baraldi *et al.* (2000) ont découvert que l'agoniste pour le

---

récepteur A<sub>3</sub>, 2-Cl-IB-MECA, bien qu'utilisé à de fortes concentrations, inhibent la fonction des éosinophiles. Il a aussi été décrit que l'activation des récepteurs A<sub>3</sub> induit une inhibition de la chémotaxie des éosinophiles (Reeves *et al.*, 2000). De manière similaire, l'activation du récepteur A<sub>3</sub> résulte en une inhibition de la dégranulation des neutrophiles induite par LPS ou TNF $\alpha$  (Bouma *et al.*, 1997). Afin de mieux comprendre les mécanismes des voies de signalisation impliquées dans l'activation cellulaire, des études *in vitro* (Ali *et al.*, 1990; Ramkumar *et al.*, 1993; Thorne *et al.*, 1996) et *in vivo* (Hannon *et al.*, 1995; Fozard *et al.*, 1996) ont établi un rôle central pour les récepteurs A<sub>3</sub> dans la dégranulation des mastocytes chez les rats et les cochons d'Inde. Bien que, comme discuté auparavant, le récepteur A<sub>2B</sub> est connu pour induire l'activation de l'adénosine des mastocytes humain, un rôle du récepteur A<sub>3</sub> ne peut être totalement exclu. Ainsi, les résultats de Konnaris *et al.* (1996) impliquent le récepteur A<sub>3</sub> dans la libération de médiateurs induite par les antigènes, suite à l'augmentation de l'adénosine sur des poumons humains. De plus, dans une revue récente, Meade *et al.* (2001) prétendent que l'ARNm du récepteur A<sub>3</sub> est présent, bien qu'à de faibles concentrations, dans les mastocytes de poumon humain, ce qui leur permet d'argumenter qu'on ne peut exclure l'hypothèse que le récepteur A<sub>3</sub> soit impliqué dans l'activation du mastocyte par l'adénosine.

2-CL-IB-MECA est un agoniste puissant et sélectif du récepteur A<sub>3</sub> et est souvent utilisé comme un outil expérimental pour activer ces sites (Ralevic et Burnstock, 1998; Fredholm *et al.*, 2001a). L'inosine est moins puissante que le 2-CL-IB-MECA mais montre une meilleure sélectivité pour le récepteur A<sub>3</sub> (Jin *et al.*, 1997). MRS 1523 et MRS 1191 sont des antagonistes sélectifs du récepteur A<sub>3</sub> de rat mais pas particulièrement puissants (Mueller, 2003) (Table 1.1).

---

### 1.1.3.2.5 Autres “récepteurs” liés à l’adénosine

Il existe plusieurs exemples dans la littérature où l’adénosine produit des effets via des mécanismes inconnus ou interagissant avec des récepteurs différents des quatre sous-types de récepteurs connus pour l’adénosine. Afin d’illustrer cela, on démontre que l’adénosine est reconnue pour inhiber l’exocytose des granules des cellules tueuses chez la souris en interagissant avec un nouveau récepteur extracellulaire (Williams *et al.*, 1997). Le fait que le NECA, qui est un analogue de l’adénosine, ne peut reproduire ces effets dans ce modèle démontre qu’il ne s’agit pas d’un des quatre sous-types de récepteurs connus pour l’adénosine. Récemment, il a été décrit un récepteur atypique A<sub>3</sub> dans les éosinophiles humains qui est couplé positivement à l’adénylate cyclase (Ezeamuzie et Phillips, 2003). Toutefois, de fortes concentrations de l’agoniste sélectif du récepteur A<sub>3</sub> sont nécessaires pour activer ce récepteur et le blocage par l’antagoniste sélectif du récepteur A<sub>3</sub>, MRS 1220, n’a lieu que pour des concentrations supérieures de deux unités logarithmiques à celles qui bloquent le récepteur A<sub>3</sub>. Récemment, un nouveau récepteur qui répond à l’adénosine et à l’AMP a été décrit (Inbe *et al.*, 2004). Le récepteur P2Y<sub>15</sub> est présent dans les tissus du tractus respiratoire, les reins et plus important dans les mastocytes de l’homme. L’activation de ces récepteurs induit une mobilisation du calcium et une production d’AMPc qui est similaire à celle observée suite à l’activation du récepteur A<sub>2B</sub>. Le récepteur P2Y<sub>15</sub> peut être bloqué par le 8-SPT et la théophylline à de très faibles concentrations et activé avec le NECA, bien qu’une concentration 10 fois supérieure à celle de l’adénosine soit requise. Toutefois, la validité des résultats de Inbe *et al.* (2004) a récemment été discuté par les représentants du «Comité de Nomenclature» des récepteurs P2Y (Abbracchio *et al.*, 2005) qui suggérait que les résultats étaient plutôt dus aux niveaux élevés d’expression des récepteurs endogènes de l’adénosine dans le clone des cellules HEK293 utilisées dans ces études ou à d’autres

---

artéfacts. Finalement, plusieurs protéines couplées à l'adénosine sont liées au [<sup>3</sup>H]-NECA (Lorenzen et Schwabe, 2001). Ni l'adénosine-1 (protéine de faible affinité liant l'adénosine), ni l'adénosine-2 (protéine de liaison du type [<sup>3</sup>H]-NECA liant le NECA), ni le site d'action de l'adénosine/inosine identifié dans le striatum bovin n'ont un profil pharmacologique similaire aux sous-types de récepteurs connus de l'adénosine

## **1.2 L'asthme**

### **1.2.1 Aspects généraux**

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires caractérisée par une obstruction des voies respiratoires qui est réversible, une sécrétion de mucus, un œdème, un remodelage des voies respiratoires, et une hyperréactivité bronchique (Barnes, 2002). Selon le Global Initiative for Asthma (2002), la définition de l'asthme est la suivante:

*« L'asthme est un désordre inflammatoire chronique des voies respiratoires, dans lequel différents éléments cellulaires et différentes cellules jouent un rôle, en particulier les mastocytes, les éosinophiles, les lymphocytes T, les macrophages, les neutrophiles, et les cellules épithéliales. Chez des individus sensibilisés, cette inflammation cause des périodes de respiration difficile, bruyante, de compression de la poitrine, et de toux, le soir ou le matin. Ces événements sont généralement associés avec des obstructions généralisées du flux respiratoire ce qui peut être réversible de manière spontanée ou à la suite d'un traitement. Cette inflammation cause aussi une augmentation de l'hyperréactivité bronchique liée à une variété de stimuli. »*

---

Les patients asthmatiques peuvent être séparés en deux grands groupes, suivant qu'ils démontrent une hyperréactivité à des antigènes de l'environnement (asthme extrinsèque) ou pas (asthme intrinsèque). Ces catégories respectives sont habituellement assimilées à l'asthme atopique (allergique) et à l'asthme non atopique. Les facteurs conduisant à un asthme non-atopique comprennent l'exposition à une irritation aérienne comme la fumée de cigarette, chimique, industrielle, ou certaines infections virales (Lim et Weller, 1997).

### **1.2.2 Pathophysiologie**

Comme mentionné ci-dessus, quelques soient les bases sous-jacentes, l'asthme est maintenant considéré comme une maladie prédominante et inflammatoire des voies aériennes. Des études histologiques de la muqueuse bronchique et l'analyse du liquide du lavage bronchioalvéolaire ont montrés une augmentation du nombre de cellules pro-inflammatoires et de médiateurs dans les voies respiratoires des asthmatiques comparées à celle des non asthmatiques. Les plus importantes cellules sont les éosinophiles, les lymphocytes T, les macrophages et les mastocytes. Toutes ces cellules à travers leurs sécrétions de médiateurs pré ou nouvellement formés, contribuent à établir et à maintenir l'inflammation asthmatique. Les cellules structurelles des voies respiratoires comme les cellules endothéliales et épithéliales, les fibroblastes ou les cellules du muscle lisse contribuent également au processus inflammatoire, libérant des médiateurs inflammatoires comme les cytokines ou les chimiokines (Barnes, 2002).

**Les éosinophiles** sont des cellules clés de l'inflammation chez l'asthmatique. Leur présence quasi constante et leur riche équipement en médiateurs sont tenus pour responsable de la majorité des lésions observées (Barnes, 2002). L'action cytotoxique de ses composants protéiques (protéine basique majeure [MBP], peroxydase éosinophilique [EPO], envers l'épithélium et les effets bronchoconstricteurs de ses médiateurs (le facteur d'activation

---

plaquettaire [PAF], les leucotriènes cystényles), contribuent à l'activité pro-inflammatoire de ces cellules (Strek et Leff, 1997). Cependant le rôle des éosinophiles dans l'asthme est remis en question depuis de récentes études faites sur l'homme et cherchant à définir de nouvelles cibles thérapeutiques (Adamko *et al.*, 2003). Chez les asthmatiques le blocage de l'éosinophilie par l'utilisation d'un anticorps monoclonal humain sur IL-5 n'a aucun effet sur la réponse retardé à l'allergène ni sur l'hyperréactivité bronchique (Leckie *et al.*, 2000; Leckie et Walker, 2001).

**Les lymphocytes T** ont un rôle important dans l'initiation et le maintien de l'inflammation dans les voies respiratoires. Les lymphocytes T helper (Th) sont classés en deux sous groupes (Th1 et Th2) qui au travers de leur différent motif de libération de cytokines induisent la réponse allergique à l'asthme. Dans l'atopie la balance penche en faveur des cellules Th2 qui libèrent des cytokines et des interleukines, IL-4, IL-5 et IL-13 (Corrigan et Kay, 1997; Kay, 2003).

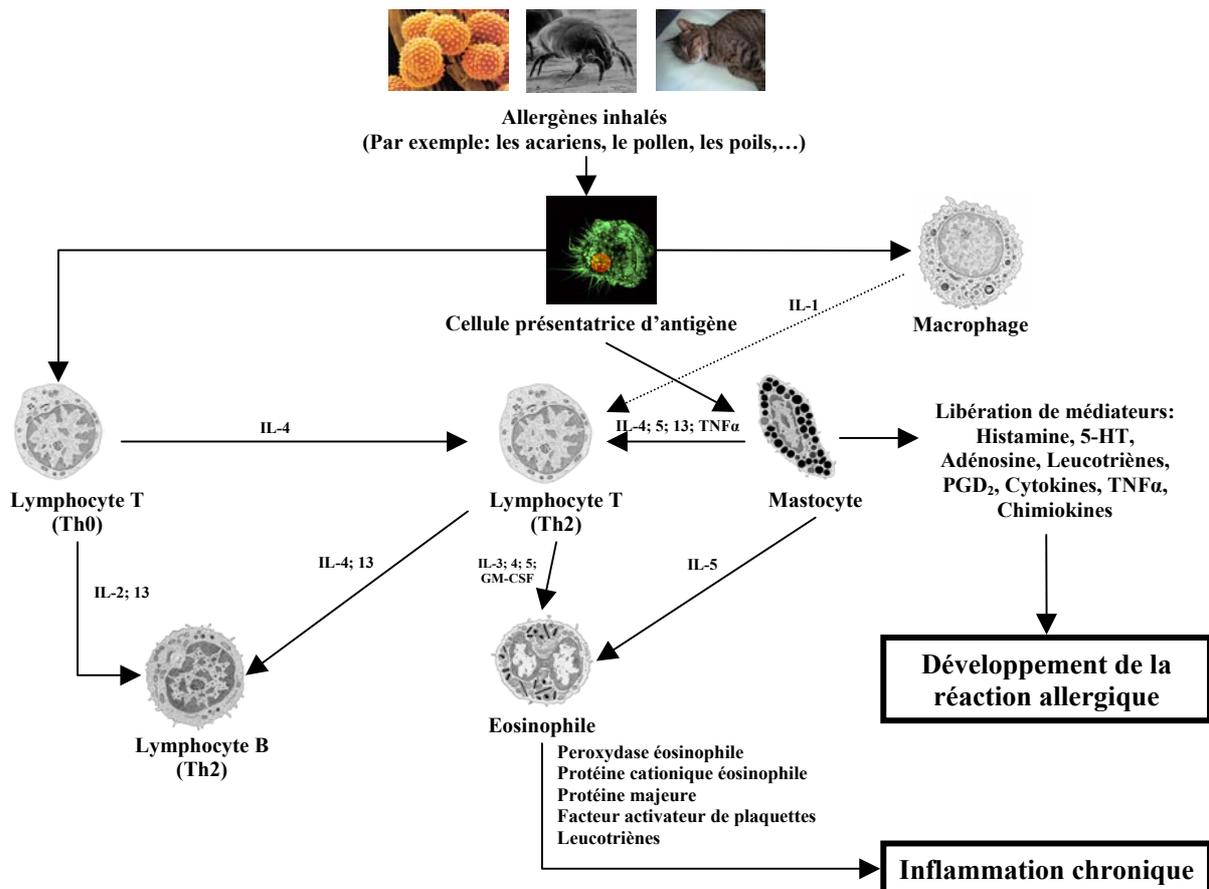
**Les macrophages** sont des cellules phagocytaires impliquées dans la phagocytose de débris cellulaires. Cette activité essentielle est cependant fortement pro-inflammatoire. A l'état normal, ils tapissent la surface épithéliale et alvéolaire. Chez l'asthmatique ils sont présents dans la muqueuse bronchique. Le macrophage secrète des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-8 (Calhoun et Jarjour, 1997). Toutefois les macrophages peuvent aussi inhiber l'inflammation allergique par l'intermédiaire de la sécrétion de médiateurs inhibiteurs comme l'IL-10 (Barnes, 2002).

**Les mastocytes** sont quantitativement peu nombreux dans la muqueuse bronchique, mais ils sont présents en plus grandes quantités chez les asthmatiques allergiques et non allergiques (Shimizu et Schwartz, 1997). Ils sont très souvent en contact avec les cellules du muscle lisse et les terminaisons nerveuses sensibles. Le mastocyte, en libérant l'histamine stocké et en

---

synthétisant rapidement des leucotriènes, est la cellule clé qui enclenche la réaction immédiate en réponse à l'allergène. Elle joue également un rôle dans l'asthme chronique car cette cellule produit et libère une large gamme de cytokines (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 et GM-CSF) (Forsythe et Ennis, 1999; Kanbe *et al.*, 2000).

Toutes ces interactions sont représentées sur la Fig. 1.3.



**Fig. 1.3** Pathophysiologie de l'asthme: les divers mécanismes y contribuant.

L'innervation des voies respiratoires est aussi importante dans la pathophysiologie de l'asthme. Les fibres efférentes du nerf vague sont distribuées au niveau des muscles lisses et des glandes bronchiques. Elles ont un rôle bronchoconstricteur et représentent le principal système de contrôle neurologique du tonus et des sécrétions bronchiques (Coulson et Fryer, 2003). Le fait que les antagonistes sélectifs des récepteurs muscariniques et cholinergiques

démontrent une efficacité dans le traitement de l'asthme suggère que le nerf vague contribue aux symptômes. Au contraire les stratégies utilisées pour démontrer l'innervation des voies respiratoires n'ont pas prouvé leur efficacité et la question de l'implication des nerfs sensoriels dans l'asthme reste ouverte (Belvisi, 2003).

L'écoulement microvasculaire est une autre composante importante de l'inflammation des voies respiratoires. Il peut être induit par une variété de médiateurs pro-inflammatoires et résulte en un œdème des voies respiratoires (Persson, 1997). L'exudation plasmatique peut aussi fournir les substrats pour produire des médiateurs pro-inflammatoires comme la bradykinine (Ellis et Fozard, 2002).

### **1.2.3 L'hyperréactivité bronchique (HRB)**

L'hyperréactivité bronchique, ou l'hyperréactivité des voies respiratoires est une composante essentielle de l'asthme. Le concept décrit une augmentation de la sensibilité des voies respiratoires des asthmatiques à des stimuli bronchoconstricteurs (immunologique, physiologique et/ou pharmacologique) qui sont essentiellement sans effet sur les non asthmatiques (Colasurdo et Larsen, 1995). Dans un contexte clinique, le terme de HRB comprend une augmentation de la sensibilité (définie comme un abaissement de la concentration qui produit une chute de 20 % du VEMS [Volume expiratoire maximal par seconde]) et une réactivité (définie comme une augmentation de la pente ou une perte du plateau de la courbe dose réponse) des voies respiratoires à l'inhalation de spasmogènes. Quelques bronchoconstricteurs utilisés cliniquement pour détecter l'HRB agissent directement sur les voies respiratoires des muscles lisses (par exemple l'histamine et la méthacholine) mais d'autres stimuli dépendent de l'implication de mécanismes cellulaires ou neurogéniques conduisant indirectement à la contraction du muscle lisse (par exemple l'adénosine, la bradykinine, le sodium métabisulphite) (Joos, 2003).

---

Bien que l'HRB caractérise l'asthme, nous ne connaissons pas précisément son rôle. Il existe un rapport entre la sévérité de l'inflammation des voies respiratoires et le degré d'HRB de ces dernières. Toutefois, tandis que la vaste majorité des asthmatiques présente une HRB, certains sujets présentant une hyperréactivité ne sont pas asthmatiques et il y a des exemples d'asthmatiques qui manifestent une sensibilité normale aux spasmogènes. Ceci peut, éventuellement démontrer que l'HRB ne caractérise pas entièrement les différents types d'inflammation sur les divers tissus. Ceci limite l'utilisation de l'HRB pour indiquer la sévérité de l'asthme (Colasurdo et Larsen, 1995; Cockcroft, 1997; Pauwels, 1997; O'Connor *et al.*, 1999).

Le degré de l'HRB est aussi fortement dépendant des spasmogènes et le changement de sensibilité avec un spasmogène ne permet pas de définir les changements pour un autre. Par exemple, dans les études cliniques de l'HRB, la réponse à l'adénosine et à la bradykinine ne peut pas être déterminée à partir de la sensibilité à la méthacholine inhalée (O'Connor *et al.*, 1999; De Meer *et al.*, 2002). Il est reconnu que les résultats obtenus avec des agents provoquant de manière indirecte, reflètent mieux l'inflammation des voies respiratoires, que la réponse directe à un autre agent (van den Berge *et al.*, 2001a). De ce fait l'HRB mesurée avec l'AMP apparaît mieux refléter les mécanismes sous-jacents de l'inflammation dans l'asthme et les effets à court terme du traitement avec des stéroïdes que la méthacholine (van den Berge *et al.*, 2001b). Toutefois, les spasmogènes agissant directement tels l'histamine et la méthacholine peuvent être utiles, pour détecter les lentes conséquences qui se développent suite au remodelage des voies respiratoires résultant d'un asthme chronique (Joos, 2003).

Les mécanismes sous-jacents possibles de l'hyperréactivité bronchique sont nombreux. Ils impliquent les inflammations chroniques et aiguës des voies respiratoires, le remodelage des parois et un changement de réactivité du muscle lisse et/ou des cellules intermédiaires, activés

---

par les spasmogènes. On observe aussi des changements inflammatoires comme l'hyperémie, l'exudation plasmatique, l'hypersécrétion de mucus et l'œdème qui conduisent à un écoulement muqueux et péribronchial qui exacerbe le rétrécissement des voies respiratoires (Cheung *et al.*, 1999). Les changements structuraux qui conduisent au même effet comprennent l'hypertrophie du muscle lisse et la fibrose subépithéliale (Boulet *et al.*, 1998). Toutefois, le manque de corrélation entre les différents spasmogènes utilisés pour définir la HRB ne permet pas de démontrer que l'altération de la géométrie des voies respiratoires est un facteur essentiel de la genèse de l'HRB (James *et al.*, 1989).

### **1.2.4 La réponse à l'allergène chez les asthmatiques**

L'inhalation de l'allergène par des asthmatiques atopiques résulte en une bronchoconstriction et jusqu'à 50 % des sujets asthmatiques présentent des signes d'une réponse biphasique. La réponse aiguë à l'allergène chez les asthmatiques atopiques se développe 10 minutes après l'inhalation de l'allergène, atteint un pic environ 30 minutes après la provocation et disparaît généralement dans les 1 à 3 heures qui suivent. La réponse tardive à l'allergène constitue une seconde période de bronchoconstriction qui commence environ 4 à 6 heures après l'exposition à l'allergène et peut durer jusqu'à 12 heures ou plus (Durham, 1990; Weersink *et al.*, 1994).

Le profil des médiateurs présents dans le sang et le liquide bronchoalvéolaire après la provocation avec l'allergène, ainsi que les propriétés biologiques connus de ces médiateurs, impliquent fortement le mastocyte dans la réponse obstructive précoce. Le mécanisme dépend de l'attachement du IgE à des récepteurs FcεRI sur les mastocytes des voies respiratoires. Les IgE, déjà fixées à la membrane plasmique des mastocytes ou des basophiles et activées par l'arrivée d'un antigène spécifique, qui réunit les fragments Fab des IgE, provoquent par l'intermédiaire de leur fragment Fc la dégranulation des mastocytes et la libération de divers messagers qu'ils contiennent (Siraganian, 2003). Dans les mastocytes cette cascade mène à la

---

libération de médiateurs préformés, comme l'histamine et la tryptase, et à la stimulation de synthèse *de novo*, des produits du métabolisme de l'acide arachidonique (prostaglandines variées, et leucotriènes) et des cytokines comme le TNF $\alpha$ , l'IL-4 et l'IL-5. L'allergène peut aussi s'attacher à des récepteurs de faible affinité (Fc $\epsilon$ RII) sur les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Dans l'activation du Fc $\epsilon$ RII des macrophages, il y a sécrétion de médiateurs spasmogéniques comme le TxA<sub>2</sub>, des leucotriènes cystényles variés et du PAF en plus des radicaux oxygénés et des enzymes lysosomales (Towes, 1997).

La sécrétion à court terme de médiateurs chimiotactiques par les mastocytes, les macrophages alvéolaires et peut-être les cellules épithéliales pourrait aussi être impliquées dans le développement de la réaction tardive à l'allergène qui est caractérisée par un influx de cellules inflammatoires (monocytes, neutrophiles, lymphocytes et d'éosinophiles), dans le poumon. Les éosinophiles sont très importants car ils résultent de la libération d'une multitude de médiateurs pro-inflammatoires qui causent la contraction du muscle lisse, l'HRB, l'hypersécrétion de mucus, la vasodilatation et l'augmentation de l'écoulement vasculaire avec la production d'un œdème. Ils sont tous caractéristiques des pathophysiologies observées durant la réponse retardée (Strek et Leff, 1997).

## **1.3 L'adénosine et l'asthme**

### **1.3.1 Le rôle de l'adénosine dans l'asthme**

Il y a longtemps que le rôle de l'adénosine dans l'asthme a été évoqué. Le sujet a été régulièrement et compréhensiblement abordé dans un certain nombre de revues récentes: Meade *et al.* (2001), Rorke et Holgate (2002), Fozard et McCarthy (2002), Polosa (2002) et Fozard (2003). Les points essentiels de ces revues peuvent être résumés de la manière suivante:

---

- La production d'adénosine est augmentée par l'hypoxie ou l'activation des cellules inflammatoires.
  - Les concentrations d'adénosine dans le liquide du lavage bronchioalvéolaire et dans l'air expiré des patients asthmatiques sont élevées. Les concentrations d'adénosine plasmatiques sont augmentées par une provocation allergique.
  - L'adénosine (ou l'AMP) induit une bronchoconstriction chez les patients asthmatiques mais pas chez les patients sains.
  - L'hyperréactivité des voies respiratoires à l'adénosine est un meilleur marqueur de l'inflammation pulmonaire dans l'asthme que l'action directe d'un bronchospasmodique tel la méthacholine.
  - L'adénosine augmente la libération de médiateurs induite par l'allergène dans les mastocytes de l'homme lors d'expérience *in vitro* et potentialise la réponse immédiate des asthmatiques à l'allergène.
  - Une plus forte concentration d'adénosine est observée dans le plasma des asthmatiques après un bronchospasme induit par l'exercice (BIE) que dans celui de volontaires en bonne santé. Cette augmentation est liée au degré d'obstruction des voies respiratoires. Il existe une tachyphylaxie croisée entre l'AMP et l'asthme induit par un exercice.
  - Le dipyridamole, un bloqueur de la recapture d'adénosine, potentialise la réponse à l'adénosine et précipite la crise d'asthme.
  - Une thérapie bien établie dans l'asthme et qui consiste à utiliser de faibles doses de théophylline bloque sélectivement la bronchoconstriction due à l'AMP chez les asthmatiques. Ces effets ne sont pas dus au blocage des phosphodiésterases.
  - L'exacerbation des symptômes de l'asthme et l'HRB à l'adénosine ont toutes deux été observées lorsque le traitement avec la théophylline est discontinu. Une explication commune
-

probable à ces deux résultats est le blocage par la théophylline de l'augmentation de l'expression des récepteurs de l'adénosine.

La majorité des points précédents contribue à supposer, mais ne prouve pas de manière directe, un rôle de l'adénosine dans l'asthme, à l'exception toutefois du BIE et de la tachyphylaxie croisée entre la provocation à l'AMP et le BIE (Finnerty et Holgate, 1990). Bien que le mécanisme n'ait pas été élucidé, l'observation implique un mécanisme d'action commun pour les deux stimuli bronchoconstricteurs. En accord avec cela, le BIE ressemble à l'adénosine car il induit une bronchoconstriction de courte durée qui implique les mastocytes (Finnerty et Holgate 1990) et qui est rarement suivie par une réponse retardée (Fozard, 2003). Il a récemment été rapporté que l'inhalation d'AMP et, par déduction, l'adénosine induise une réponse inflammatoire rapide (en plus ou moins 1 h) et augmente le nombre des éosinophiles dans les voies respiratoires des asthmatiques (van den Berge *et al.*, 2004a). Cet effet n'est pas présent après une inhalation de méthacholine. Bien que le mécanisme de cet effet n'ait pas été établi, une explication possible est la libération des médiateurs inflammatoires mastocytaires (van den Berge *et al.*, 2004b).

Il existe d'autres preuves d'une implication de l'adénosine dans l'asthme, par exemple la découverte de Blackburn et de ces collègues qu'un phénotype du genre asthmatique (hyperréactivité des voies respiratoires, hyperplasie des cellules sécrétrices de mucus et inflammation éosinophilique des voies respiratoires) se développe chez une souris rendue déficiente en adénosine déaminase (ADA). Ces changements peuvent être inversés par une thérapie enzymatique à base d'adénosine déaminase et atténués par la théophylline ce qui indique qu'ils sont la conséquence d'une surconcentration d'adénosine (Blackburn, 2003). Plus récemment, le même laboratoire a défini un rôle important pour l'adénosine dans la production et dans les effets pro-inflammatoire d'IL-13, qui est une cytokine clef impliquée

---

dans la pathogénèse de l'asthme (Blackburn *et al.*, 2003). IL-13 induit une accumulation d'adénosine et régule de façon positive l'expression des récepteurs pro-inflammatoires, A<sub>1</sub>, A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub>, et de façon négative le récepteur anti-inflammatoire A<sub>2A</sub>. L'adénosine induit aussi IL-13 de manière significative. Ainsi, IL-13 et l'adénosine stimulent l'un et l'autre une partie de l'amplification de la voie qui est à l'origine de la pathophysiologie de l'asthme et qui relie les maladies inflammatoires du poumon (Blackburn *et al.*, 2003). Les études de Blackburn ont été effectuées sur des souris, de ce fait, il faut faire preuve d'une certaine prudence en extrapolant ces résultats sur l'homme.

Néanmoins, cette situation impliquant un rôle de l'adénosine dans l'asthme a été récemment résumée par Fozard (2003) qui conclut de la manière suivante:

*« Ce cas (le rôle de l'adénosine) peut maintenant être considéré comme convainquant et le temps est venu de concevoir et d'évaluer des molécules basées sur l'adénosine et les sites d'action de ses récepteurs comme de nouvelles thérapeutiques. La disponibilité et l'évaluation clinique de tels agents devront renforcer l'évidence d'un rôle de l'adénosine dans la pathophysiologie de l'asthme. »*

### **1.3.2 La réponse bronchoconstrictive à l'adénosine chez les asthmatiques**

Comme l'adénosine est faiblement soluble en solution saline, c'est l'AMP (son nucléoside mère) qui est couramment utilisé dans les études de provocation avec l'adénosine. L'AMP est rapidement déphosphorylé *in vivo* et il est généralement reconnu que l'adénosine induit la réponse bronchoconstrictive observée après l'administration d'AMP. L'inhalation d'adénosine (ou d'AMP) ne contracte pas les voies respiratoires des sujets non-allergiques ou non-asthmatiques. Toutefois, lorsqu'il est inhalé par des asthmatiques atopiques, l'adénosine

---

produit une bronchoconstriction très marquée qui atteint son maximum en 3 à 5 minutes et dure généralement 1 h. Il n'existe pas de réponse retardée équivalente à celle observée avec l'allergène (Cushley *et al.*, 1983; 1984; Phillips et Holgate, 1988). La réponse des voies respiratoires à l'adénosine n'est pas spécifique aux patients qui ont de l'asthme allergique, car les asthmatiques non-atopiques (intrinsèques), les atopiques sans asthme et les fumeurs avec une obstruction bronchique, répondent à l'AMP (Cushley *et al.*, 1986; Oosterhoff *et al.*, 1993). Il y a au mieux une faible corrélation entre la réponse des voies respiratoires à l'adénosine et celle activant directement les spasmogènes comme l'histamine et la méthacholine (Oosterhoff *et al.*, 1993; van den Berge, 2001a; De Meer *et al.*, 2002; van den Berge *et al.*, 2004b), ce qui suggère que la bronchoconstriction à l'adénosine ne reflète pas une augmentation non spécifique de la réactivité des muscles lisses bronchiques, mais implique une interaction sélective avec les cellules dans les voies respiratoires des asthmatiques et pas des sujets normaux.

La possibilité pour l'innervation parasympathique des voies respiratoires de contribuer à la bronchoconstriction déclenchée par l'adénosine a été étudiée par l'utilisation d'un antagoniste muscarinique et cholinergique, l'ipratropium. Pour une concentration produisant une protection des voies respiratoires de l'ordre de 200 fois à la méthacholine, la réponse à l'adénosine n'est pas affectée (Mann *et al.*, 1985). Ainsi, les mécanismes cholinergiques ne contribuent pas de façon significative à la réponse des voies respiratoires à l'adénosine chez les asthmatiques.

Polosa et ses collègues (Polosa *et al.*, 1997) se posèrent la question de l'implication d'un chemin peptidergique et du relargage de neuropeptides spasmogéniques lors de la réponse bronchoconstrictive à l'AMP en surveillant les effets de l'inhalation de phosphoramidon, un inhibiteur neutre de l'endopeptidase sur cette réponse. Ils n'ont trouvé aucun changement

---

dans la réactivité bronchique à l'AMP après le phosphoramidon, ce qui suggère que l'activation des peptides et le relargage des neuropeptides ne sont pas importants dans la réponse des voies respiratoires à l'adénosine.

Il existe des faits démontrant que la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine chez les asthmatiques est en grande partie liée à l'activation des mastocytes. Ainsi, la bronchoconstriction induite par l'AMP est inhibée approximativement de 80 % par un traitement avec les antagonistes sélectifs du récepteur H<sub>1</sub> de l'histamine, terfenadine et astemizole (Phillips *et al.*, 1987; Rafferty *et al.*, 1987; Polosa *et al.*, 1991). Les puissants inhibiteurs de la cyclo-oxygénase, le flurbiprofène et l'indométhacine, l'inhibiteur de la 5-lypoxigénase, ABT-761, et l'antagoniste du récepteur des leucotriènes cystényles, montelukast, inhibent tous partiellement la réponse bronchoconstrictive induite par l'AMP, indiquant que les leucotriènes jouent également un rôle dans la bronchoconstriction induite par l'adénosine dans l'asthme (Crimi *et al.*, 1989; Phillips et Holgate, 1989; Rorke *et al.*, 2002). La réponse contractile à l'adénosine sur des bronches isolées peut être bloquée par une combinaison d'antagonistes de l'histamine et des leucotriènes, ce qui confirme les thèses formulées lors des découvertes *in vivo* (Björck *et al.*, 1992). La bronchoconstriction induite par l'adénosine peut aussi être empêchée par un traitement avec du disodium cromoglycate ou du nedocromil sodium, des composés qui inhibent la dégranulation des mastocytes et ainsi la libération de médiateurs (Phillips *et al.*, 1988; Pauwels *et al.*, 1989; Richards *et al.*, 1989). L'administration par inhalation de frusemide et de bumétanide, inhibe la bronchoconstriction induite par l'adénosine par le biais de leur effet inhibiteur sur les canaux chlorhydriques des mastocytes afin de réduire l'activation et la libération de médiateurs (Polosa *et al.*, 1993a).

Une autre preuve que la réponse bronchoconstrictive induite par l'adénosine est une conséquence de la libération de médiateurs mastocytaires est apportée par le fait qu'on

---

observe une augmentation des concentrations dans le liquide du lavage bronchoalvéolaire d'histamine, de  $\text{PGD}_2$  et de tryptase, un marqueur très spécifique des mastocytes. Après une provocation avec l'AMP la concentration d'histamine dans le plasma veineux et celle des leucotriènes dans la condensation de l'air expiré des asthmatiques sont augmentées (Phillips *et al.*, 1990; Bucchioni *et al.*, 2004).

Bien que le(s) récepteur(s) induisant la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine chez les asthmatiques n'ait(ent) pas été établi(s), l'évidence la plus plausible, suggère l'implication d'un récepteur  $A_{2B}$ . Des expériences déjà réalisées sur les mastocytes des rongeurs et de l'homme ont montré que l'adénosine était un puissant stimulateur de l'adénylate cyclase des basophiles et des mastocytes qui vont augmenter les niveaux d'AMPc par l'intermédiaire du récepteur  $A_2$  (Church *et al.*, 1983; Hughes *et al.*, 1984) Toutefois, ce paradoxe ne peut être expliqué. Comment un agent capable d'augmenter l'AMPc dans les basophiles et les mastocytes peut-il augmenter plutôt qu'inhiber la libération des médiateurs comme cela fut le cas avec d'autres antagonistes comme les  $\text{PGE}_2$  (Peters *et al.*, 1982) et les agonistes  $\beta_2$ -adréno-récepteurs (Okayama et Church, 1992). Ce paradoxe a pu être élucidé quand on a découvert que le mastocyte contenait les deux récepteurs  $A_2$ ,  $A_{2A}$  lié à l'adénylate cyclase et impliquant la protéine  $G_s$  et  $A_{2B}$  lié à l'adénylate cyclase et à l'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) et impliquant les protéines  $G_s$  et  $G_{q/11}$  (Feoktistov et Biaggioni, 1997).

L'activation du récepteur  $A_{2B}$  dans le mastocyte pulmonaire de la lignée humaine (MCH-1) conduit à l'augmentation de l'hydrolyse des phosphoinositides et à la mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire qui potentialise la libération d'IL-8 en réponse au PMA (phorbol myristyl acetate) (Feoktistov *et al.*, 1999). D'autres rapports ont démontré que le MRS 1754 et l'IPDX (3-isobutyl-8-pyrrolidinoxanthine), qui sont des antagonistes sélectifs pour le récepteur  $A_{2B}$  de l'homme, suppriment l'activation des mastocytes de l'homme induite par le NECA (Kirschenbaum *et al.*, 2001; Feoktistov *et al.*, 2001). Rétrospectivement, une analyse

---

pharmacologique limitée *in vitro* des effets de l'adénosine qui augmentent la libération dans les mastocytes de l'homme de médiateurs est consistante avec l'implication du récepteur A<sub>2B</sub> (Hughes *et al.*, 1984; Peachell *et al.*, 1988).

Les études effectuées sur les asthmatiques avec la théophylline et dérivé xanthine, l'enprofylline montrent également l'implication du récepteur A<sub>2B</sub> dans la bronchoconstriction induite par l'adénosine chez l'homme. La théophylline bloque la réponse à l'AMP sélectivement (vis-à-vis de l'histamine) suite à l'inhalation (Cushley *et al.*, 1984) ou l'administration orale (Mann et Holgate, 1985). Un blocage sélectif de la bronchoconstriction à l'adénosine est incompatible avec un antagonisme fonctionnel dû à l'inhibition de la phosphodiesterase qui est un mécanisme d'action de la théophylline. Des études récentes ont démontré que l'une des propriétés les plus importantes de la théophylline est le blocage du récepteur A<sub>2B</sub> (K<sub>B</sub> 7µM; Feoktistov *et al.*, 1998). Depuis que les concentrations plasmatiques de théophylline obtenues après des dosages cliniques (28-55 µM; Barnes et Pauwels, 1994) ont été bien plus grandes que cette valeur, on attend un blocage du récepteur A<sub>2B</sub> (voir Fozard et Hannon, 1999). L'enprofylline contrairement à la théophylline est très sélective en dépit d'être un faible antagoniste du récepteur A<sub>2B</sub> (Feoktistov *et al.*, 1998) et lorsqu'elle est injectée de façon intraveineuse elle bloque sélectivement la bronchoconstriction à l'AMP chez les asthmatiques (Clarke *et al.*, 1989).

Ces constatations, bien que non prouvées, suggèrent fortement que la réponse bronchoconstrictive dépendante des mastocytes chez les asthmatiques est induite par un récepteur A<sub>2B</sub>.

---

### **1.3.3 La réponse bronchoconstrictive à l'adénosine dans le rat BN comme modèle de la bronchoconstriction à l'adénosine dans l'asthme**

Le rat BN a beaucoup de caractéristiques qui en font un modèle particulièrement adapté pour les études de l'asthme allergique. Il peut être sensibilisé à l'antigène et produire des taux élevés d'IgE (Pauwels *et al.*, 1979; Haczku *et al.*, 1996). L'immunopathologie des réponses respiratoires allergiques vues dans le rat BN reproduit de manière très proche celle connue dans les réponses respiratoires allergiques humaines (Chung, 1997). De ce fait, la bronchoconstriction de phase précoce et tardive a lieu après la provocation allergique dans les animaux AS, avec une accumulation de neutrophiles, d'éosinophiles et de lymphocytes dans la phase tardive (Elwood *et al.*, 1992; Underwood *et al.*, 2002). De plus, une HRB est observée (Elwood *et al.*, 1992; Elwood *et al.*, 1993; Haczku *et al.*, 1997; Hannon *et al.*, 2001). Nombre de caractéristiques pathologiques découlant de la provocation antigénique peuvent être supprimées par traitement avec des composés anti-asthmatiques déjà établis (Sapienza *et al.*, 1992; Tarayre *et al.*, 1992). De plus, en comparaison avec d'autres souches de rats, le nombre de mastocytes est plus élevé dans l'appareil respiratoire des rats BN (Xu *et al.*, 1992).

Le laboratoire Fozard montre depuis longtemps de l'intérêt pour le rôle de l'allergène dans la définition de la sensibilité des voies respiratoires de rats BN AS aux bronchospasmogènes, incluant la bradykinine (Ellis *et al.*, 2004) et l'adénosine (Fozard *et al.*, 2003), et leur rapport avec l'asthme clinique. Quand j'ai rejoint le laboratoire en 2001, la situation après les analyses faites sur l'adénosine était la suivante. L'adénosine induit une bronchoconstriction minimale sur les animaux non sensibilisés ou sensibilisés alors que sur les animaux sensibilisés provoqués avec l'allergène se manifeste une réponse bronchoconstrictive très marquée. Une analyse approfondie de cette réponse a alors été conduite *in vivo* avec pour

---

objectif de la comparer avec la réponse bronchoconstrictive qui se manifeste chez les asthmatiques (Fozard et Hannon, 2000; Hannon *et al.*, 2001).

La réponse augmentée à l'adénosine dans le rat n'implique pas l'activation des neurones cholinergiques ou les nerfs sensoriels sensibles à la capsaïcine. Ceci est aussi le cas pour la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine chez les asthmatiques (voir section 1.3.2). En accord avec les résultats cliniques, la réponse augmentée à l'adénosine chez le rat présente une tachyphylaxie. Chez les rats BN et les asthmatiques, la réponse à l'adénosine est principalement une conséquence de l'activation mastocytaire, qui conduit à la libération des médiateurs, plus particulièrement l'histamine, la 5-HT et les leucotriènes. Puisque le muscle lisse des voies respiratoires du rat ne répond pas à l'histamine, c'est donc la 5-HT qui induit la bronchoconstriction (Joos *et al.*, 1997). Au contraire, chez les asthmatiques, c'est l'histamine (et de façon moins importante les leucotriènes) qui induit la réponse. Chez le rat BN, la réponse à l'adénosine a été supprimée par un traitement répété avec de fortes concentrations de composé 48/80 qui conduit à un épuisement des médiateurs mastocytaires. Toutefois, des preuves directes de la dégranulation des mastocytes dans les poumons suite à l'activation par l'adénosine ont été obtenues de manière histologique. En terme de récepteurs qui induisent la réponse à l'adénosine chez les asthmatiques, les résultats *in vivo* et *in vitro* impliquent le récepteur A<sub>2B</sub> (voir section 4.2.3.2). Chez le rat, le récepteur reste encore à définir.

En se basant sur ces analyses, Hannon *et al.* (2001) ont conclu que l'augmentation de la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine implique une colonie de mastocytes discrète et basée dans le poumon qui libèrent principalement de la 5-HT et sont impliqués dans la réponse par une exposition à l'allergène (Hannon *et al.*, 2001).

---

## **SECTION 2.**



### **2. Objectifs et intérêts du projet**

Le status quo entre, respectivement, la réponse à l'adénosine chez les asthmatiques et chez le rat BN, au début de mes études, peut être résumé de la manière suivante

## 2.1 Les asthmatiques

- Les voies respiratoires des asthmatiques sont hyperréactives à l'adénosine
- La réponse bronchoconstrictive à l'adénosine est dépendante de l'activation des mastocytes et présente une tachyphylaxie
- L'histamine et les leucotriènes induisent la réponse à l'adénosine
- Le récepteur  $A_{2B}$  à l'adénosine semble induire la réponse bronchoconstrictive

## 2.2 Le rat BN

- Les voies respiratoires des animaux AS exposés à l'allergène sont hyperréactives à l'adénosine
- La réponse bronchoconstrictive à l'adénosine est dépendante de l'activation des mastocytes et présente une tachyphylaxie
- La 5-HT induit la réponse à l'adénosine
- La potentialisation de l'adénosine est observée sur les bandes de parenchymes *ex vivo*
- L'identité du récepteur impliqué dans la réponse à l'adénosine n'est pas connue

Malgré les connaissances précédentes, il restait plusieurs questions importantes sans réponses qui dictèrent la direction générale de mon projet.

---

## 2.3 Les objectifs fixés

- Les éléments dont nous disposons sont-ils suffisants pour prouver que les mastocytes du poumon sont la source de la 5-HT qui induit la réponse contractile à l'adénosine sur la bande de parenchyme ?
- Est-ce que l'activation mastocytaire, suggérée comme étant la base de la potentialisation de l'adénosine par l'allergène, s'étend à un stimulus non immunologique du mastocyte ?
- Est-ce que le(s) récepteur(s) induisant la réponse contractile augmentée à l'adénosine sur la bande de parenchyme est(sont) intra ou extracellulaire(s) ?
- Quel(s) récepteur(s) induit(sent) la réponse contractile augmentée à l'adénosine sur la bande de parenchyme suite à une provocation allergique chez le rat ?
- Quelle est la voie de signalisation de ce(s) récepteur(s) ?
- Quelles sont les différences et les similitudes entre le mécanisme de la bronchoconstriction chez les asthmatiques et les réponses bronchoconstrictives (*in vivo*) et celles contractiles sur les bandes de parenchyme (*in vitro*) chez le rat ?

Pour le type d'études envisagées, il était préférable (ou même nécessaire) d'utiliser une préparation *in vitro* du poumon. Dans des expériences préliminaires, la préparation des bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'allergène *in vivo*, imitaient les résultats obtenus *in vivo* qui montraient des réponses contractiles robustes et accentuées à l'adénosine comparées aux contrôles (Hannon *et al.*, 2001). De ce fait, les bandes de parenchyme ont été adoptées comme la préparation *in vitro* pour la plupart de mes études.

---

## **SECTION 3.**



### **3. Matériels et méthodes**

Une description détaillée des méthodes et matériels utilisés dans ces expériences se trouve dans chaque publication que j'ai incluse dans ma thèse. Lorsque les résultats n'ont pas été publiés j'ai inclus les méthodes dans la section 4 avec les résultats. La méthodologie générale est toutefois résumée dans cette section incluant des détails sur les animaux utilisés, la sensibilisation et la provocation des rats de l'espèce BN, et le protocole expérimental de base pour la majorité de mes expériences.

## **3.1 Les animaux**

### **3.1.1 Les rats et les cochons d'Inde**

Les rats mâles de l'espèce BN pesant de 270 à 320 g et les cochons d'Inde mâles de l'espèce Hartley pesant de 300 à 500 g, proviennent des laboratoires Charles River (IFFA-CREDO, Arbresle, France). Les rats sont placés par groupe de cinq dans des cages (de dimensions 560 x 335 x 200 mm) et les cochons d'Inde sont placés par groupe de quatre dans des cages (de dimensions 750 x 550 x 250 mm), toutes tapissées de sciure avec un accès à la nourriture (Boulettes de NAFAG<sup>®</sup> fournies par Nahr et Futtermittel AG, Gossau, Suisse) et à l'eau *ad libitum*. L'animalerie est maintenue à une température de 22°C ± 2°C sous un cycle de phase lumière/obscurité de 12 heures. Toutes les expériences ont lieu avec l'accord des autorités vétérinaires de la ville de Bâle (Kantonales Veterinaeramt, Basel-Stadt).

### **3.1.2 Les chiens**

Les chiens males ou femelles de l'espèce Beagle pèsent de 6 à 10 kg, et proviennent des laboratoires Marshall (Lyon, France). Ils sont placés dans des box individuels (d'une surface de 2 m<sup>2</sup>) pour permettre une meilleure manipulation et dans des espaces ouverts où ils peuvent

---

vivre en communauté. Les animaux dont ont été prélevés les organes étaient des animaux utilisés comme contrôles dans des expériences de toxicologie.

### 3.2 La sensibilisation active des rats BN à l'ovalbumine (OA)

Voici la procédure générale qui est basée sur celle décrite par Tarayre *et al.* (1992). Ce procédé est similaire aux méthodes de routine utilisées par un certain nombre de groupes sur des rats BN. (Pauwels *et al.*, 1979; Underwood *et al.*, 2002). L'ovalbumine ( $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) est mélangée (30 min dans la glace) par un mixeur (Polytron, Kinematica Ltd) avec de l'hydroxyde d'aluminium ( $20 \text{mg ml}^{-1}$ ) et injectée (0.5 ml par animal s.c.). L'injection d'OA est répétée 14 et 21 jours après. Les animaux sont utilisés pour les expériences entre le 28<sup>ème</sup> et le 35<sup>ème</sup> jour après la première sensibilisation (Fig. 3.1).

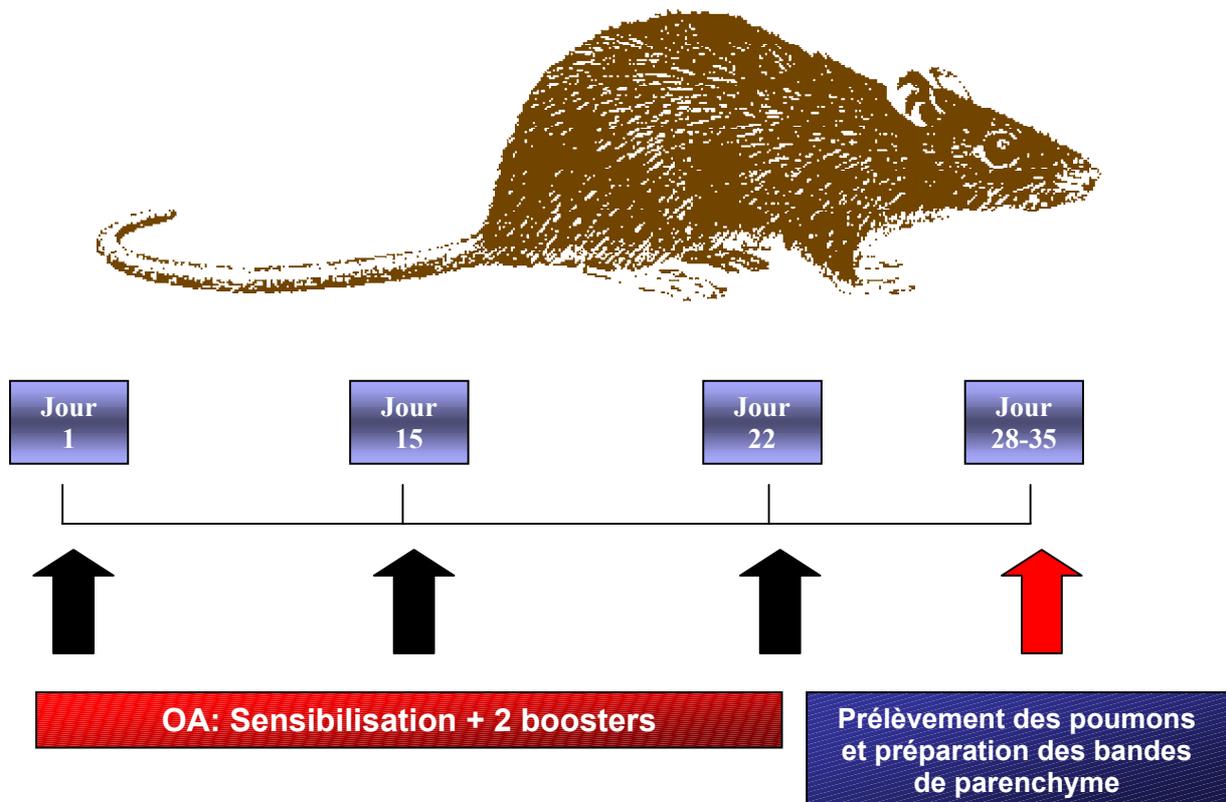


Fig. 3.1 Séquence de sensibilisation du rat

### **3.3 Provocation avec l'ovalbumine**

Les animaux sont anesthésiés par inhalation (4 % isoflurane) dans des chambres d'anesthésies, puis on effectue une administration intratrachéale d'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$  i.t. dans 0.2 ml de chlorure de sodium ou NaCl 0.9 %) ou de véhicule. Les animaux se réveillent dans les minutes après la provocation.

### **3.4 Bande de parenchyme du poumon de rat**

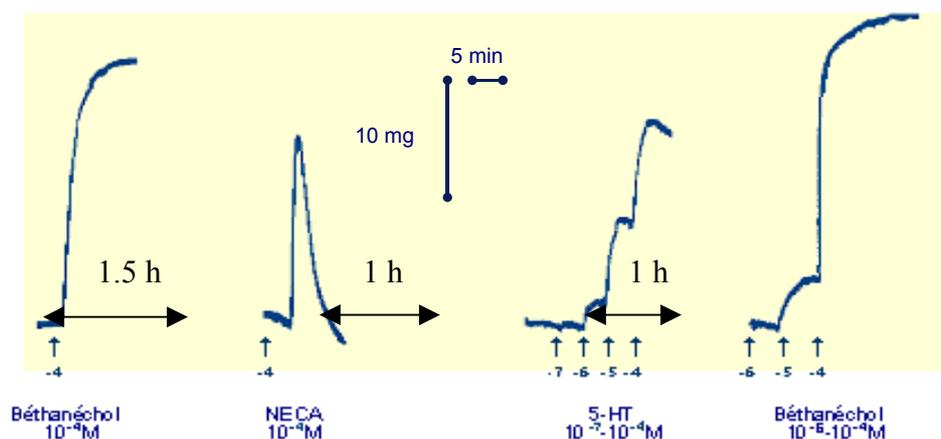
#### **3.4.1 Prélèvement des poumons et préparation des bandes de parenchyme**

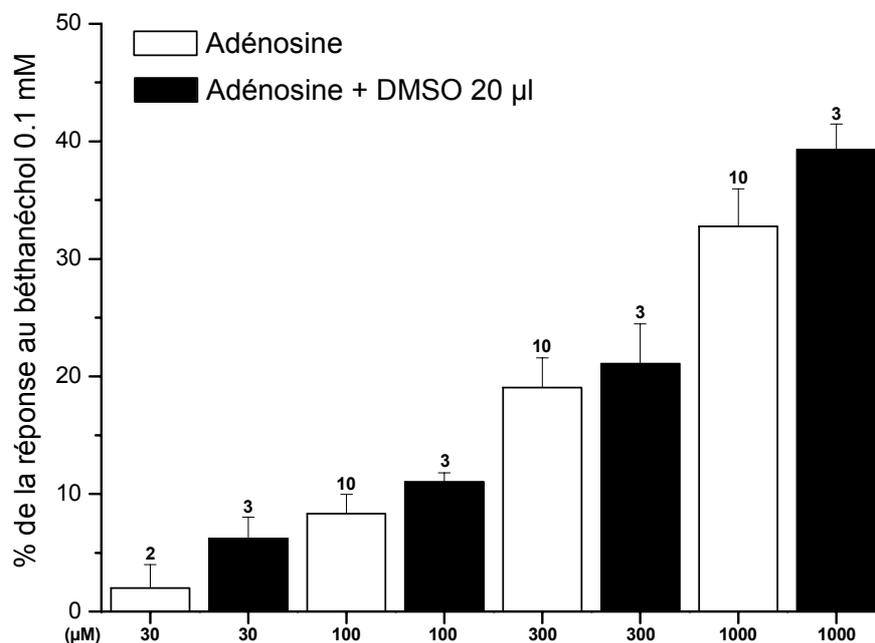
Les rats sont sacrifiés par une exposition au dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). Les poumons sont alors perfusés *in situ* par 50 ml de phosphate buffered saline (PBS) via une seringue insérée dans le ventricule droit du cœur, afin d'éliminer le sang des tissus. Les poumons sont alors prélevés et découpés, en quatre bandes (de 10 à 12 mm de long pour 3 mm d'épaisseur) à partir du lobe principal (le gauche). Les tissus sont alors suspendus pour mesurer leur tension dans des bains d'organes isolés de 20 ml contenant une solution modifiée de Krebs (de composition (mM) : NaCl, 118; KCl, 4.8;  $\text{MgSO}_4$ , 1.2;  $\text{CaCl}_2$ , 2.5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2;  $\text{NaHCO}_3$ , 25; glucose, 11) à  $37^\circ\text{C}$  aéré avec  $\text{O}_2$  95% /  $\text{CO}_2$  5%. Les tissus sont maintenus sous une tension constante de 1g. Les bandes de parenchyme de poumons sont préparées à partir d'animaux sensibilisés ou non, provoqués ou pas avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) 3 h avant d'être euthanasiés.

#### **3.4.2 Protocole expérimental standard**

---

Le protocole standard utilisé pour la plupart des expériences est le suivant: après une période de stabilisation de 1 h durant laquelle les tissus sont lavés de manière répétitive, on applique dans le bain une concentration supramaximale d'un agoniste muscarinique: le béthanéchol (100  $\mu$ M). Une heure et demi plus tard et après une nouvelle série de rinçages on introduit une dose d'agoniste dans le bain (une seule dose d'agoniste est testée par tissu). Après de nouveaux rinçages, on établit une courbe dose-réponse pour la 5-HT (0.1  $\mu$ M à 100  $\mu$ M) suivie, une heure plus tard et après une série de lavages répétés, par une courbe dose-réponse au béthanéchol (1  $\mu$ M à 100  $\mu$ M). Les mesures de tension sont toujours comparées avec la réponse maximale à la sérotonine (100  $\mu$ M) et/ou au béthanéchol (100  $\mu$ M) (Fig. 3.2). Les agonistes des récepteurs à l'adénosine ou leur véhicule sont introduits une heure et demi après la première réponse au béthanéchol. Les antagonistes ou leur véhicule sont ajoutés 30 minutes avant l'adénosine et les agonistes, la 5-HT ou le béthanéchol. Le véhicule des antagonistes est le solvant utilisé pour dissoudre ces derniers, le DMSO (diméthyle sulfoxyde). La concentration finale du DMSO dans le milieu d'incubation est de 0.1 %. Nous avons étudié les effets de cette concentration de DMSO sur la réponse à l'adénosine; il n'y a pas d'inhibition ni de potentialisation de la réponse (Fig. 3.3).



**Fig. 3.2** Exemple d'un tracé standard

**Fig. 3.3** Effet du DMSO (20 µl; concentration finale dans le milieu d'incubation 0.1 %) sur la réponse contractile à l'adénosine (30, 100, 300, 1000 µM) sur les bandes de parenchyme de poumons de rats BN AS et provoqués 3 h avant d'être sacrifiés avec de l'OA (0.3 mg kg<sup>-1</sup>; i.t.). La réponse à l'adénosine est exprimée en fonction de la réponse au béthanéchol (0.1 mM) qui représente 100%. Les valeurs moyennes (± s.e.m) représentées sont celles de 2 à 10 expériences individuelles (indiqué au dessus des colonnes).

### 3.5 Matériels

L'aluminium hydroxyde est de Merck, Allemagne. Le Forene (isofluran, 100%) a été obtenu de Abbott, Switzerland. L'OA a été obtenue de Fluka, Switzerland. Le béthanéchol (carbamyl-β-methyl-choline-chloride), la sérotonine (5-hydroxytryptamine créatinine sulfate), le XAC (8-[-[[[(2-aminoethyl)amino]-carbonyl]methyl]oxy]phenyl]-1,3-dipropylxanthine, le composé 48/80 (produit de la condensation du N-méthyl-p-méthoxyphényléthaylamine avec le formaldéhyde), le MRS 1191 (3-Ethyl-5-benzyl-2-méthyl-4-phenylethynyl-6-phenyl-1,4-(±)-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate), MRS 1523 (3-propyl-6-ethyl-5-[(ethylthio)carbonyl]-

2-phenyl-4-propyl-3-pyridine carboxylate), l'inosine (hypoxanthine 9- $\beta$ -D-ribofuranoside), la toxine pertussique, NBTI (6-[(4-Nitrobenzyl)thio]-9- $\beta$ -D-ribofuranosylpurine), l'adénosine hemisulphate (9- $\beta$ -D-ribofuranosyladenine), la L-phénylèphrine et l'aminophylline (3,7-dihydro-1,3-dimethyl-1H-purine-2,6-dione) ont été obtenus de Sigma, Switzerland. 9-chloro-2,2-(furanyl)[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline-5-amine (CGS 15943), 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX), 8-p-(sulphophenyl) théophylline (8-SPT), 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA), 2-[p-(2carboxyethyl)phenylamino]-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (CGS 21680), N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine (CPA) et 2-chloroN<sup>6</sup>-(3-iodobenzyl)adénosine-5'-N-methyl-carboxamide (2-Cl-IB-MECA) ont été obtenus de Research Biochemicals International, U.S.A. 4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phénol (ZM 241385) était un cadeau de AstraZeneca Pharmaceuticals, U.K. N-(4-cyano-Phenyl)-2-[4-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1H-purin-8-yl)-phenoxy]-acetamide (MRS 1754) et le CGH 2473 ont été synthétisés à Novartis Horsham Research Centre (UK). L'iralukast et le méthysergide ont été synthétisés à Novartis Basel (CH). Les substances ont été dissoutes soit dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), ceci est détaillé soit dans les publications soit dans les protocoles de la section 3 (Résultats); la concentration finale dans le liquide d'incubation est de 0.1 %, soit dans l'H<sub>2</sub>O. On emploie les véhicules appropriés à chaque expérience. L'adénosine, l'inosine, la 5-HT, le béthanéchol, le composé 48/80, l'OA et la théophylline ont été dissous dans de l'H<sub>2</sub>O, tous les autres composés ont été dissous dans le DMSO.

### 3.6 Analyse des données

Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes  $\pm$  écart type à la moyenne (s.e.m). Les études comparatives ont été faite avec des valeurs contrôles issus de tissus provenant des mêmes animaux que ceux utilisés pour tester les composés. Le t-test de Student

pour deux échantillons n'ayant pas la même variance a été effectué pour comparer les groupes tests et les groupes contrôles. On a ensuite appliqué une correction de Bonferroni ou de Hochberg pour des comparaisons multiples. Dans les expériences on considère les valeurs marquées par \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  comme différentes significativement des valeurs contrôle équivalentes.

## **SECTION 4.**



### **4. Résultats et discussion**

---

## **4.1 Quel rôle pour les mastocytes du poumon dans l'augmentation de la réponse à l'adénosine à la suite d'une provocation allergique ?**

### **4.1.1 Publication 1**

#### **Interaction between adenosine and allergen or compound 48/80 on lung parenchymal strips from actively sensitized Brown Norway rats**

**C. Wolber, F. Baur, J.R. Fozard**

*European Journal of Pharmacology* 498, 227-232 (2004)

---

## Résumé

Nous avons étudié les effets de l'activation des mastocytes, induits par des stimuli immunologiques ou non-immunologiques, sur la sensibilité à l'adénosine des bandes de parenchyme de poumons de rats Brown Norway (BN) activement sensibilisés (AS) avec l'ovalbumine (OA). Les bandes répondent à l'OA par une réponse contractile biphasique. Les réponses à l'adénosine sont augmentées de façon très marquée 30 min après l'incubation des tissus avec l'OA. La première phase de la réponse à l'OA est éliminée par l'antagoniste du récepteur de la 5-hydroxytryptamine (5-HT<sub>2</sub>), le méthysergide, mais n'est pas affectée par l'antagoniste du récepteur des leucotriènes cystényls, l'iralukast. La seconde phase est éliminée par l'iralukast et n'est pas affectée par le méthysergide. La réponse à l'adénosine est fortement réduite par le méthysergide mais pas significativement altérée par l'iralukast. Le composé 48/80 induit une contraction de la bande de parenchyme sensible au méthysergide et potentialise l'adénosine; la réponse augmentée à l'adénosine est bloquée par le méthysergide. Ainsi, l'activation des mastocytes dans les poumons par des stimuli immunologiques ou non-immunologiques résulte dans une augmentation de la réponse contractile à l'adénosine.

---

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Cedric Wolber**, François Baur, John R. Frozard

**Interaction between adenosine and allergen or compound 48/80 on lung parenchymal strips from actively sensitized Brown Norway rats.**

European Journal of Pharmacology 498, 227-232 (2004)

Pages 227-232 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.053>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

### 4.1.2 Résumé et expériences complémentaires

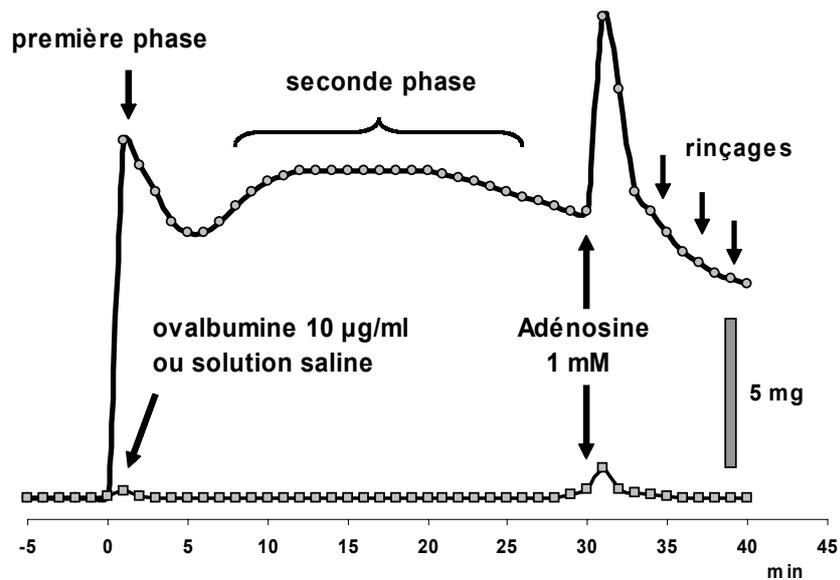
Les précédents travaux effectués dans le laboratoire ont montré une augmentation, sélective et très marquée de la bronchoconstriction à l'adénosine après une provocation antigénique chez le rat BN AS avec l'OA (Fozard et Hannon, 2000; Hannon *et al.*, 2001). Les bandes de parenchyme préparées à partir de poumons prélevés sur des rats BN, AS et provoqués avec l'allergène, révèlent également une amplification de leur réponse à l'adénosine (Hannon *et al.*, 2001). Que ce soit la bronchoconstriction à l'adénosine *in vivo*, ou la réponse contractile de la bande de parenchyme *ex vivo*, les résultats suggèrent qu'elles sont toutes deux dépendantes de la libération de la 5-HT suite à l'activation des mastocytes pulmonaires (Hannon *et al.*, 2001; 2002 [Publication 2]; Fozard *et al.*, 2003). Toutefois, est il possible que d'autres cellules inflammatoires qui entrent dans le poumon après la provocation allergique (Ellis *et al.*, 2004) contribuent également à la réponse, soit en étant la source de la 5-HT libérée par l'allergène (Csaba *et al.*, 2003) et/ou en créant des conditions qui sensibilisent les mastocytes à l'adénosine ?

Le but du travail présenté dans cette section est de confirmer que les mastocytes pulmonaires sont effectivement le site d'action de l'interaction entre l'allergène (OA) et l'adénosine. A cet effet, nous avons prélevé les poumons d'animaux AS mais non provoqués et nous avons exploré l'interaction entre l'OA et l'adénosine sur la bande de parenchyme de poumons sous des conditions entièrement *in vitro*. Afin de mettre en avant l'implication du mastocyte dans ce phénomène, les effets du composé 48/80 (produit de la condensation de N-méthyl-p-méthoxyphényléthylamine avec le formaldéhyde), un agent de dégranulation mastocytaire non immunologique qui active directement la protéine G<sub>i</sub> couplée à la GTP (Shefler et Sagi-Eisenberg, 2001), ont été étudiés.

---

Les détails de la méthode employée et la plupart des résultats ont été publiés dans *European Journal of Pharmacology* 498, 227-232 (2004) (Publication 1). Des expériences complémentaires à celles présentées dans cette publication seront décrites plus en détail dans ce résumé.

La réponse à l'OA de la bande de parenchyme, préparée à partir de poumons prélevés de rats BN AS est biphasique. Une première phase courte qui dure de 2 à 5 minutes est suivie d'une deuxième phase qui se développe plus lentement et dure au moins 30 minutes (Publication 1, Fig. 1; Fig. 4.1). Au contraire, l'administration d'une solution saline sur des tissus sensibilisés ne produit aucune réaction (Publication 1, Fig. 1; Fig. 4.1).



**Fig. 4.1** Interaction entre l'OA et l'adénosine sur les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS. Représentation de l'enregistrement expérimental des tissus traités avec l'OA ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) ou une solution saline.

Les valeurs des analyses des mécanismes des deux phases de la réponse à l'OA sont présentées dans la Publication 1, Fig. 2. De plus, la Fig. 4.2 inclut l'ensemble des valeurs obtenues dans les expériences avec deux concentrations de méthysergide seul ou en combinaison avec l'iralukast. Les résultats montrent que le premier pic de l'OA est

partiellement bloqué par une faible concentration de méthysergide (10 nM) et totalement bloqué par une concentration plus élevée (30 nM) mais pas par l'iralukast (1  $\mu$ M), indiquant l'implication de la 5-HT. Le second pic est bloqué par l'iralukast mais pas par le méthysergide et semble donc impliquer les leucotriènes cystényles. La Figure 4.2 justifie aussi l'utilisation de méthysergide 30 nM comme étant une concentration inhibitrice juste suffisante pour bloquer complètement la 5-HT. Les résultats indiquent que les deux phases de la réponse contractile à l'adénosine sont une conséquence de l'activation des mastocytes.

La réponse à l'adénosine est potentialisée après la provocation allergique avec l'OA (Publication 1, Fig. 1). Le blocage de la réponse à l'adénosine, par le méthysergide mais pas par l'iralukast, montre qu'elle est largement dépendante de la 5-HT mais pas des leucotriènes (Publication 1, Fig. 2; Fig. 4.2.C). Ceci reflète précisément la situation dans les expériences *in vivo* ou *ex vivo*, où l'augmentation de la bronchoconstriction ou de la réponse contractile de la bande de parenchyme à l'adénosine est dépendante de la 5-HT (Hannon *et al.*, 2001). L'absence de potentialisation de la réponse à la 5-HT après provocation avec l'OA (publication 1, Fig. 1) revendique que la réponse de l'adénosine ne peut s'expliquer par une augmentation de la sensibilité des muscles lisses bronchiques.

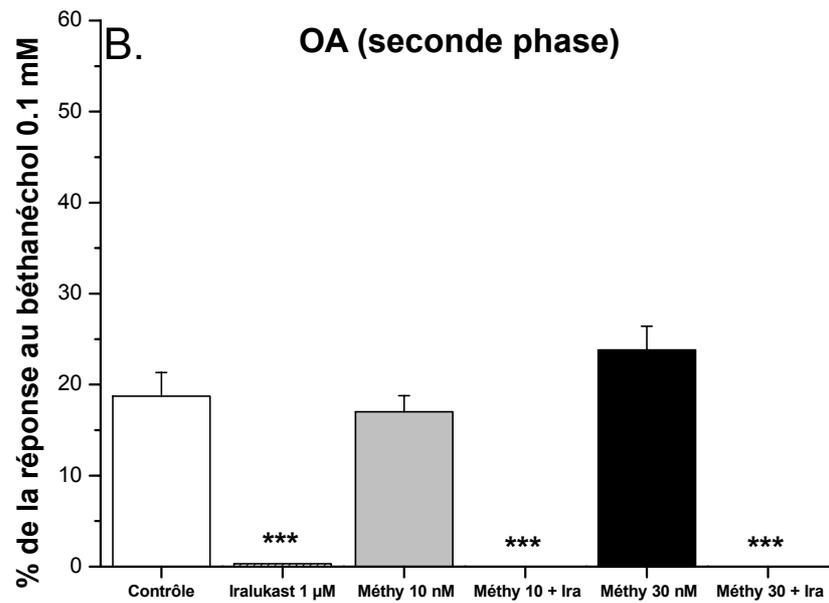
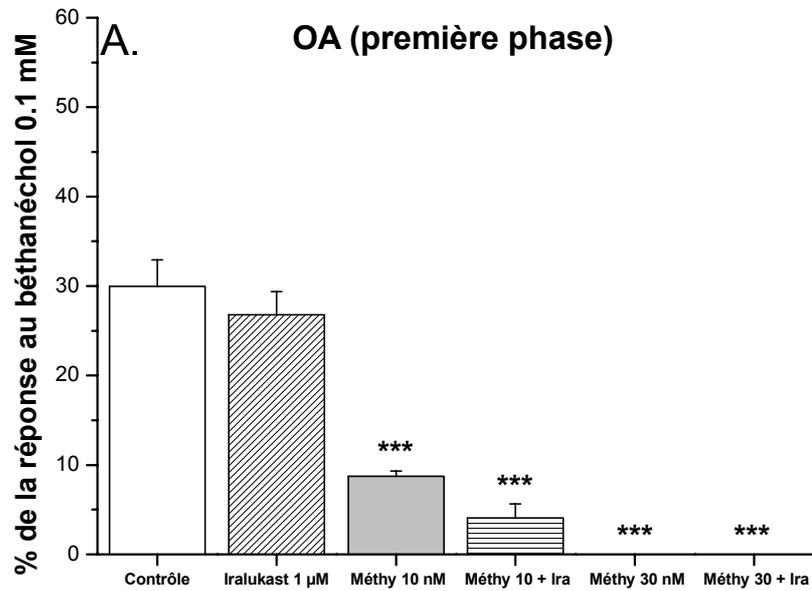
L'ensemble de ces données, générées entièrement sous conditions *in vitro*, consolide la théorie suivant laquelle les mastocytes des voies respiratoires seraient la source de la 5-HT, dont dépend l'augmentation de la réponse à l'adénosine après une provocation allergique. D'une part, les poumons prélevés sont perfusés *in situ* afin d'en éliminer le sang, ce qui empêche toute implication de la 5-HT provenant d'agents sanguins tels les plaquettes ou les basophiles. D'autre part, après la provocation à l'OA sous conditions entièrement *in vitro*, il n'y a aucune possibilité d'avoir un influx de cellules inflammatoires dans le poumon comme cela ce produit quand la provocation se fait dans l'animal entier (Ellis *et al.*, 2004). Dans de telles conditions expérimentales, les cellules inflammatoires comme par exemple les

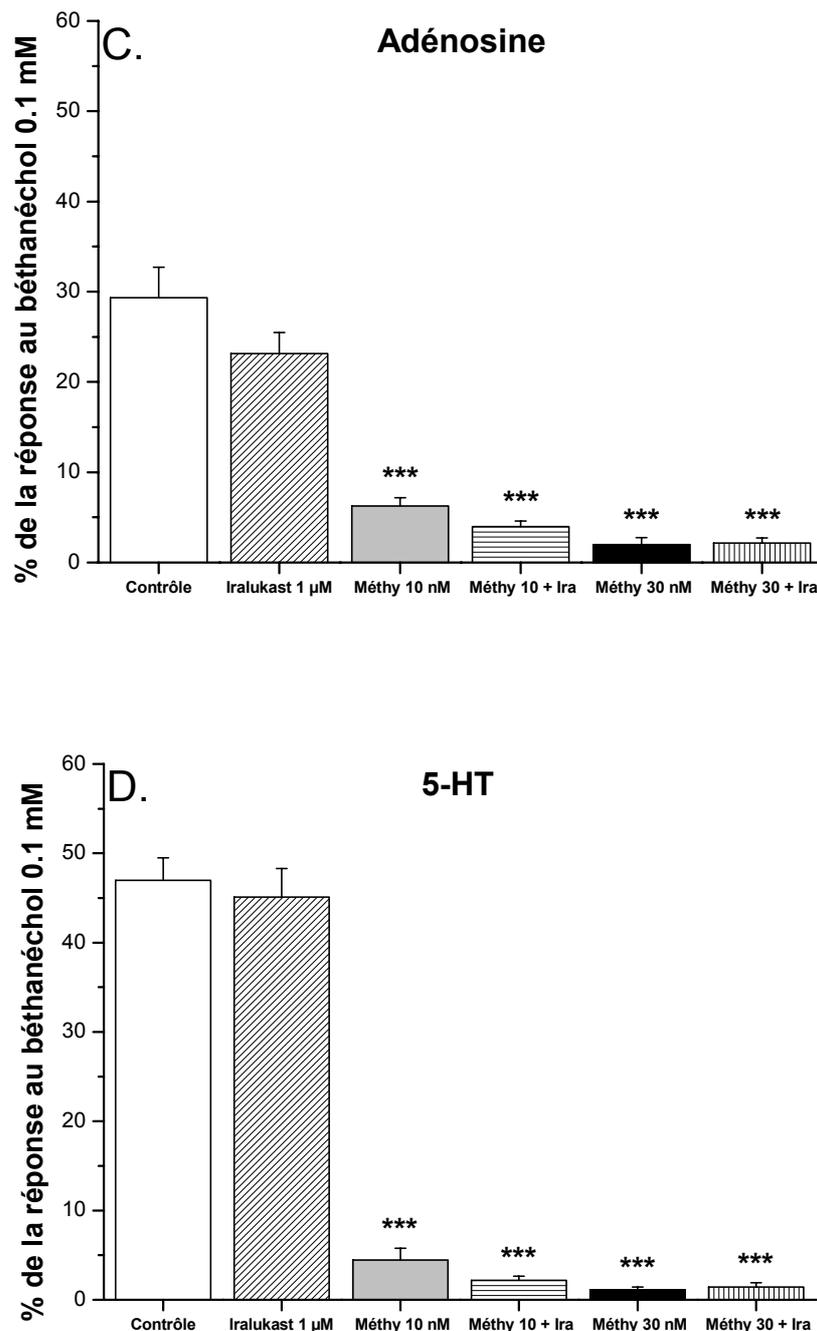
---

granulocytes (Csaba *et al.*, 2003) ne peuvent pas être la source de la libération de 5-HT suite à l'incubation des tissus avec l'adénosine. Elles ne peuvent pas non plus générer des conditions qui résultent en une sensibilisation des mastocytes à l'allergène. Enfin, comme mentionné précédemment, le site d'action de l'OA est le mastocyte. Le fait que la réponse contractile du spasmogène agissant directement (la 5-HT) ne soit pas augmentée après la provocation à l'OA, bien que celle à l'adénosine le soit, implique le mastocyte dans l'augmentation de la réponse à l'adénosine.

Dans des études *in vivo*, le composé 48/80, comme l'allergène, induit la dégranulation des mastocytes ainsi que la libération des médiateurs inflammatoires tels que l'histamine et la 5-HT (Mazingue *et al.*, 1978; Hannon *et al.*, 1995; Fozard *et al.*, 1996; Ferjan *et al.*, 1997). Dans des études *in vitro*, le composé 48/80 a été démontré comme étant un agent de dégranulation des mastocytes et comme induisant une contraction sensible à la méthysergide dans les trachées de rat (Ikawati *et al.*, 2000). Le mécanisme de dégranulation mastocytaire induit par le composé 48/80, est non immunologique et implique une activation directe de la protéine de la famille  $G_i$ , couplée à la GTP (Mousli *et al.*, 1990). Les résultats obtenus avec le composé 48/80 fournissent de nouvelles preuves de l'implication des mastocytes dans la réponse à l'adénosine. Ils montrent que le composé 48/80 ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) induit une contraction de la bande de parenchyme ( $11.5 \pm 1.4 \%$  de la réponse au béthanéchol  $0.1 \text{ mM}$ ,  $n = 8$ ), qui est complètement supprimée par le méthysergide ( $30 \text{ nM}$ ;  $n = 4$ ), indiquant une implication des mastocytes (Ikawati *et al.*, 2000). D'ailleurs, comme c'était le cas avec l'allergène (OA), la potentialisation de la réponse à l'adénosine mais pas celle à la 5-HT est présente 30 min après incubation avec le composé 48/80 (Publication 1, Fig. 3).

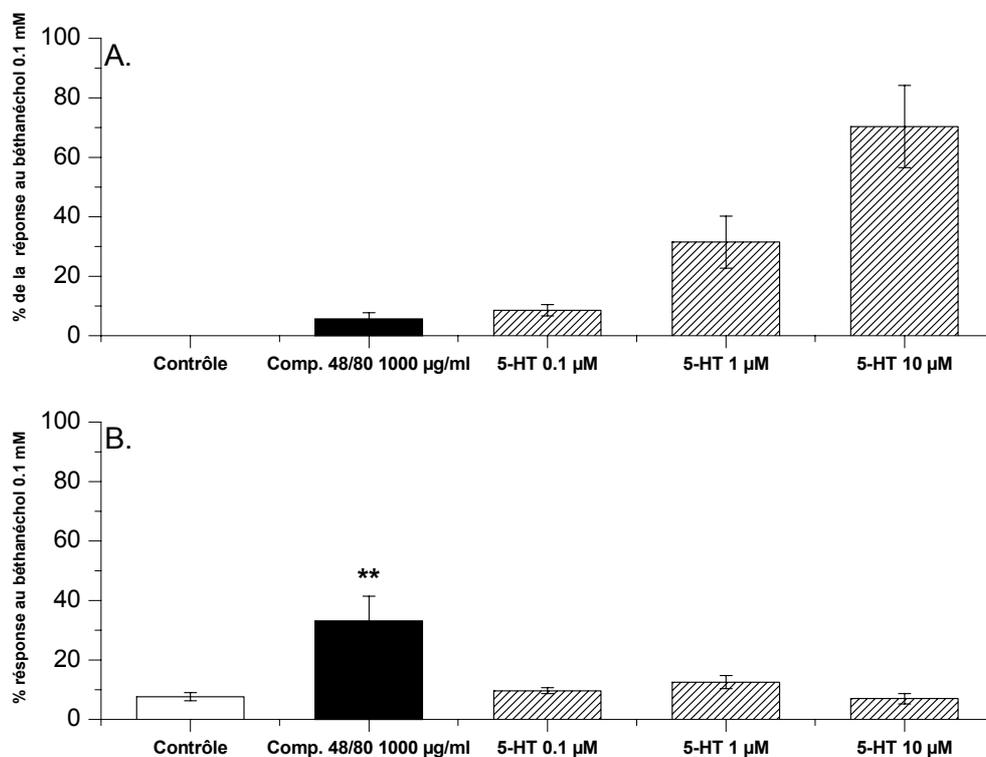
---





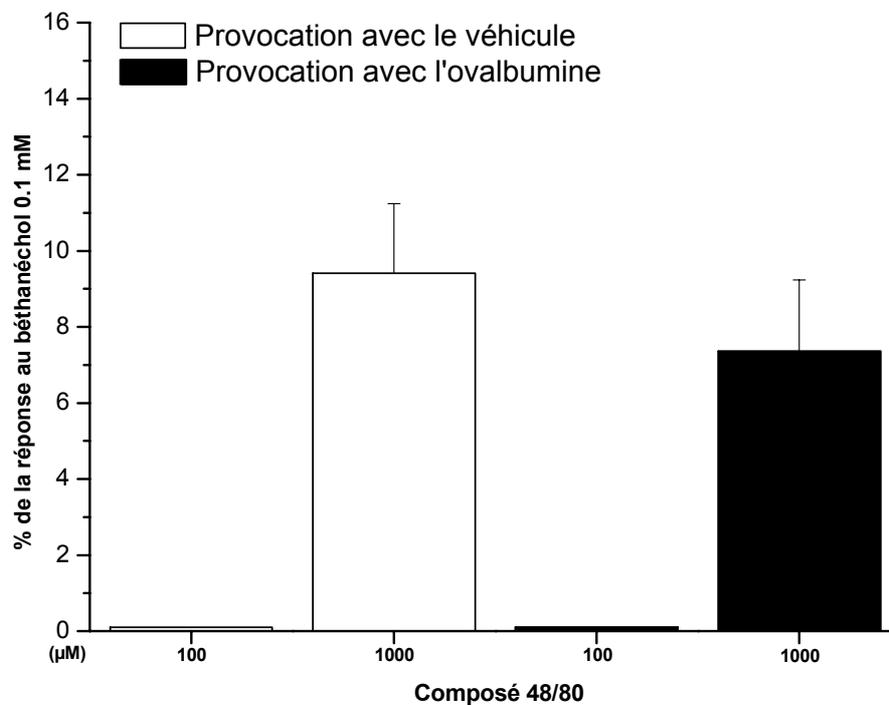
**Fig. 4.2** Effets du méthysergide (Méthy, 10 ou 30 nM) et de l'iralukast (Ira, 1 µM) seuls ou combinés, sur les réponses des bandes de parenchyme de poumons prélevées chez des rats BN AS et provoqués à l'OA (10 µg ml<sup>-1</sup>). A. première phase; B. seconde phase; C. adénosine (1 mM); D. 5-HT (0.1 mM). Pour plus de clarté, seule la concentration maximale de 5-HT (0.1 mM) utilisée dans l'établissement de la courbe concentration-réponse cumulative est représentée. Les valeurs moyennes ( $\pm$  s.e.m.) de 3 à 8 expériences individuelles (contrôle, iralukast, méthysergide et les combinaisons) sont représentées. \*\*\*P<0.001 montre que la valeur est significativement différente à celle équivalente au groupe contrôle.

Une des explications possibles de l'effet du composé 48/80 (ou de l'OA) est que la potentialisation se produit à partir de la 5-HT libérée, et pas à partir de l'interaction entre le composé 48/80 (ou l'OA) et le mastocyte. Afin de déterminer ceci, la 5-HT a été administrée 30 minutes avant la provocation de la bande de parenchyme avec l'adénosine. Les concentrations de 5-HT qui donnent une réponse contractile équivalente ou supérieure à celle du composé 48/80 n'ont aucun effet sur la réponse à l'adénosine (Fig. 4.3). Ainsi les effets observés avec le composé 48/80 ne peuvent être attribués à l'action de la 5-HT libérée.



**Fig. 4.3** Interaction entre le composé 48/80 ou la 5-HT et l'adénosine sur la bande de parenchyme de poumons prélevée sur des rats BN AS. Le composé 48/80 (comp. 48/80, 1000 µg ml<sup>-1</sup>) et la 5-HT (0.1, 1 et 10 µM) sont ajoutés 30 minutes avant l'adénosine (1000 µM). (A.) Réponse contractile de la 5-HT et du composé 48/80. (B.) La réponse contractile à l'adénosine après la 5-HT, le composé 48/80 ou le véhicule (contrôle). Les valeurs moyennes (± s.e.m.) de 3 expériences individuelles sont représentées. \*\*P<0.01 montre que la valeur est significativement différente à celle équivalente au groupe contrôle.

L'effet similaire produit par l'OA et le composé 48/80 sur l'augmentation des réponses à l'adénosine implique un mécanisme commun, qui est probablement dû à une activation des mastocytes des voies respiratoires. Cette conclusion s'accorde avec les nombreux exemples de la littérature basés sur des expériences animales, qui documentent la synergie entre l'activation des récepteurs à l'adénosine et la dégranulation des mastocytes induite par l'allergène (Marquardt *et al.*, 1978; 1994; Marquardt et Walker, 1990; Peachell *et al.*, 1991; Ramkumar *et al.*, 1993; Konnaris *et al.*, 1996; Auchampach *et al.*, 1997; Salvatore *et al.*, 2000; Laffargue *et al.*, 2002).



**Fig. 4.4** Interaction entre l'OA et le composé 48/80 sur la bande de parenchyme de poumons prélevée sur des rats BN AS. La réponse du composé 48/80 (100 ou 1000 µg ml<sup>-1</sup>) a été établie 30 min après la provocation avec l'OA (10 µg ml<sup>-1</sup>) ou le véhicule. Les valeurs moyennes (± s.e.m.) de 4 expériences individuelles sont représentées.

Dans des études récentes, nous nous sommes posés la question de savoir si la réponse au composé 48/80 pouvait être augmentée si l'on provoquait l'animal avec l'allergène. Dans une

expérience basée sur le même schéma que celle utilisée pour définir l'interaction entre l'allergène et l'adénosine (Fig. 4.1), la provocation avec l'OA n'a eu aucun effet sur la réponse au composé 48/80 (Fig. 4.4).

Il est surprenant d'observer que la provocation allergénique ne potentialise pas la réponse au composé 48/80. Les résultats présentés dans la section 4.2.5 établissent que la réponse à l'adénosine est sensible à la toxine pertussique, ce qui implique une protéine  $G_i$  dans la réponse. Le composé 48/80 active aussi le mastocyte, via la protéine  $G_i$  (Shefler et Sagi-Eisenberg, 2001) bien que dans ce cas l'interaction soit directe et n'implique pas de récepteur. Si l'on cherche à expliquer pourquoi le composé 48/80 n'est pas potentialisé par l'OA, il faut étudier le lien qui existe entre le récepteur et le complexe protéique G couplé à la GTP. Ce point est considéré en détail dans la discussion générale (voir section 5.3).

Dans les précédentes études, la potentialisation de l'adénosine par l'allergène suggérait une implication d'une population discrète de mastocytes des poumons, contenant et libérant principalement de la 5-HT après une exposition à l'allergène (Hannon *et al.*, 2001). Les résultats obtenus dans nos expériences montrent une potentialisation de l'adénosine suivant une activation immunologique ou non immunologique des mastocytes, sous des conditions entièrement *in vitro*, fournissant une nouvelle évidence permettant d'appuyer cette conclusion.

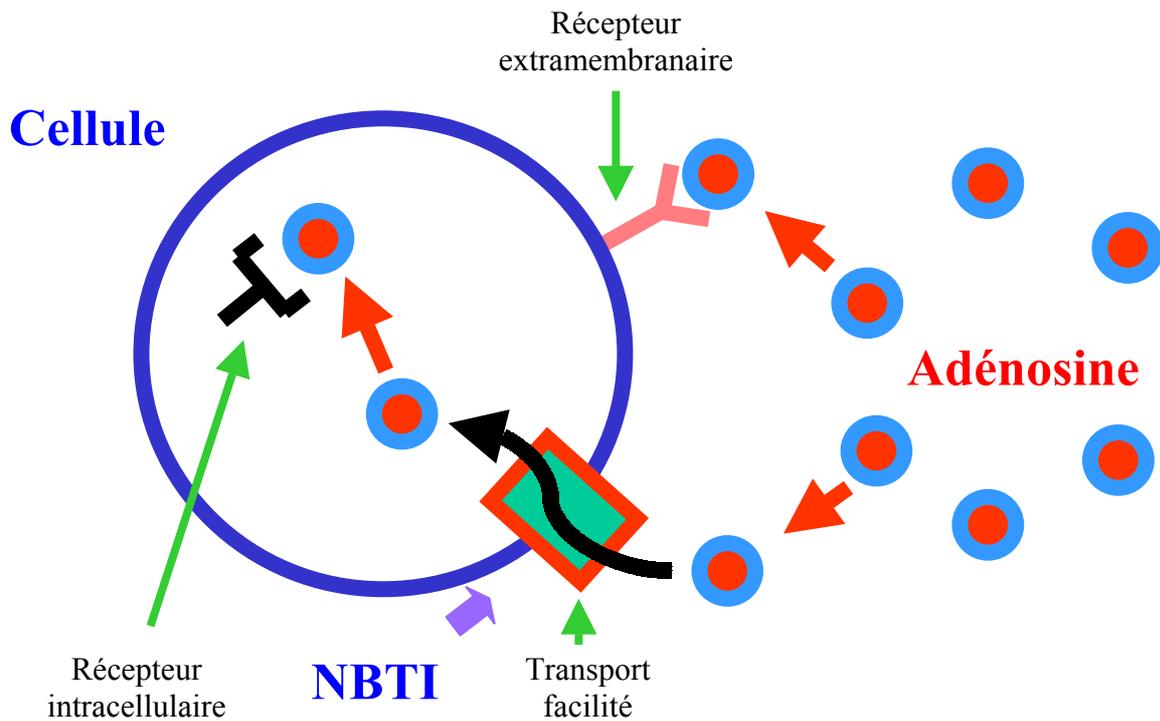
---

## **4.2 Caractérisation du(es) récepteur(s) impliqué(s) dans la réponse contractile à l'adénosine de la bande de parenchyme de poumons suite à une provocation allergique**

### **4.2.1 Un site d'action extracellulaire pour l'adénosine ? Effets du NBTI, un bloqueur du transport facilité de l'adénosine**

Il y a beaucoup d'exemples dans la littérature où l'adénosine induit des effets biologiques en se liant sur un site d'action intracellulaire (voir par exemple Bradley *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2001). Pour mettre ceci en évidence on inhibe généralement l'accès à l'adénosine intracellulaire en utilisant des inhibiteurs du transport facilité de l'adénosine dans la cellule tels que le dipyridamole ou le S-(p-nitrobenzyl)-6-thio-inosine (NBTI) (Hertz, 1991). En effet, le récepteur qui induit la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine chez les asthmatiques, apparaît à la vue des résultats avec le dipyridamole être localisé à la surface de la cellule (Crimi *et al.*, 1988). Cette expérience a pour but d'étudier si le site d'action de l'adénosine, qui induit une réponse contractile des bandes de parenchyme de poumons de rats BN AS et provoqués avec l'OA, est intracellulaire. En bloquant la recapture de l'adénosine on augmente sa concentration extracellulaire et de ce fait, si la réponse à l'adénosine est potentialisée, le récepteur se trouve probablement à l'extérieur de la cellule. Au contraire, si la réponse est inhibée, c'est que l'adénosine doit pénétrer dans la cellule pour que l'on observe une réponse (Fig. 4.5).

---



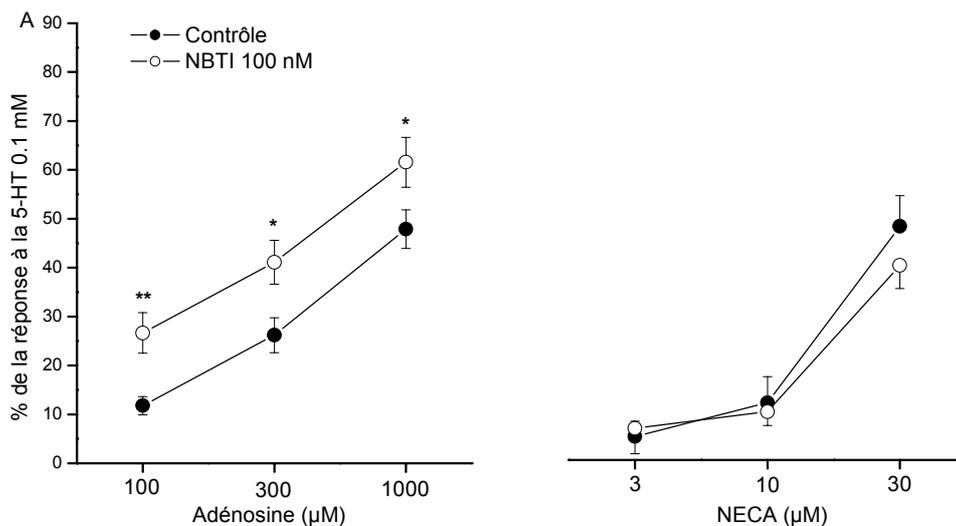
**Fig. 4.5** Schéma représentant le principe de l'expérience en présence de NBTI qui bloque le transport facilité de l'adénosine.

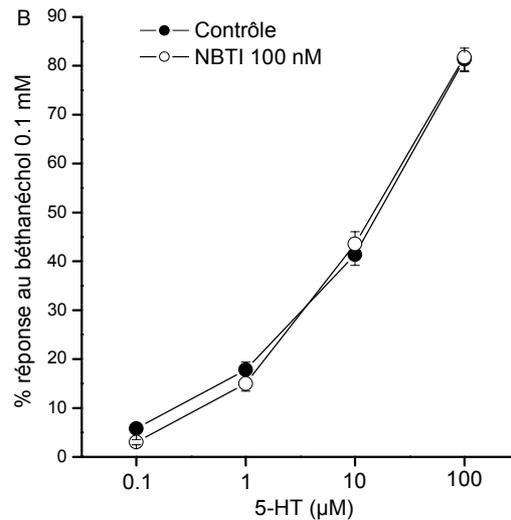
**Protocole expérimental:** Les bandes de parenchyme de poumons sont prélevées sur des animaux sensibilisés et provoqués avec de l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.t.) 3 h avant d'être sacrifiés. Durant une période de stabilisation d'1 h, les tissus sont rincés de manières répétitives, puis on ajoute une concentration supramaximale de béthanéchol ( $0.1 \text{ mM}$ ). Après de nouveaux rinçages répétés pendant 1-1.5 h, on ajoute dans le bain une concentration d'adénosine ( $100$ ,  $300$  ou  $1000 \text{ }\mu\text{M}$ ) ou de NECA ( $3$ ,  $10$  ou  $30 \text{ }\mu\text{M}$ ). Pour éviter une tachyphylaxie une seule concentration est testée par tissu. Après avoir rincé le tissu de manière répétitive, on établit une courbe concentration-réponse à la 5-HT ( $100 \text{ nM}$  –  $0.1 \text{ mM}$ ). On rince à nouveau les tissus puis on établit une courbe concentration-réponse au béthanéchol ( $1 \text{ }\mu\text{M}$  –  $0.1 \text{ mM}$ ). Le changement de tension pour l'adénosine et le NECA est exprimé en fonction de la réponse à la 5-HT ( $0.1 \text{ mM}$ ) de la courbe concentration-réponse. Le changement de tension de la 5-HT est exprimé en fonction de la réponse au béthanéchol ( $0.1 \text{ mM}$ ) de la courbe concentration-réponse. Le NBTI ( $100 \text{ nM}$ ) est inclus dans les bains 30 min avant l'addition d'adénosine, de NECA ou des courbes concentration-réponse à la 5-HT et au béthanéchol.

L'incubation des bandes de parenchyme de poumons de rat BN avec le NBTI ( $100 \text{ nM}$ ) induit une augmentation significative de la réponse à l'adénosine (Fig. 4.6). Cette augmentation correspond à un déplacement d'environ trois fois, de la courbe vers la gauche par rapport à l'axe des concentrations. Contrairement à l'adénosine, l'incubation des bandes de parenchyme avec le NBTI ( $100 \text{ nM}$ ) n'a absolument aucun effet sur la courbe concentration-réponse à la

5-HT (Fig. 4.6). Ainsi, la modulation de la réponse à l'adénosine ne peut être causée par un changement de sensibilité des éléments contractiles du tissu à la 5-HT.

Une concentration de 100 nM de NBTI est suffisante pour bloquer le plupart des transporteurs de l'adénosine (Chaudary *et al.*, 2002). Toutefois, Il n'est pas sur que l'entrée d'adénosine dans les cellules soit entièrement bloquée. Malgré cela, la réponse à l'adénosine est potentialisée, ce qui implique une réponse directe de l'adénosine par l'intermédiaire d'un récepteur extracellulaire. Cette conclusion est soutenue par le fait que le NECA, qui est un analogue stable de l'adénosine avec une affinité négligeable pour les transporteurs de l'adénosine (Balvierzack *et al.*, 1989; Mun *et al.*, 1998) et qui imite la réponse à l'adénosine (voir section 4.2.3.2), n'est pas potentialisé par le NBTI (Fig. 4.6). De manière importante comme le NECA ne pénètre pas la cellule et la réponse qu'il induit n'est pas potentialisée par le NBTI mais imite l'effet de l'adénosine; on peut donc formuler l'hypothèse de l'existence d'un même mécanisme d'action et étudier s'il existe une tachyphylaxie croisée entre le NECA et l'adénosine.





**Fig. 4.6** Effet du S-(p-nitrobenzyl)-6-thio-inosine (NBTI), 100 nM, sur la réponse contractile à l'adénosine, au NECA et à la 5-HT sur les bandes de parenchyme de poumons de rats BN AS et provoqués 3 h avant d'être sacrifiés avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.t.). A. La réponse à l'adénosine ou au NECA est exprimée en fonction de la réponse à la 5-HT (0.1 mM) qui représente 100%. B. La réponse à la 5-HT est exprimée en fonction de la réponse au béthanéchol (0.1 mM) qui représente 100%. Les valeurs moyennes ( $\pm$  s.e.m) représentées sont celles de 3 à 11 expériences individuelles. \* $P < 0.05$  et \*\* $P < 0.01$  montrent que la valeur est significativement différente à celle équivalente au groupe incubé avec le véhicule (contrôle).

#### 4.2.2 Tachyphylaxie croisée entre l'adénosine et le NECA : Un mécanisme d'action commun ?

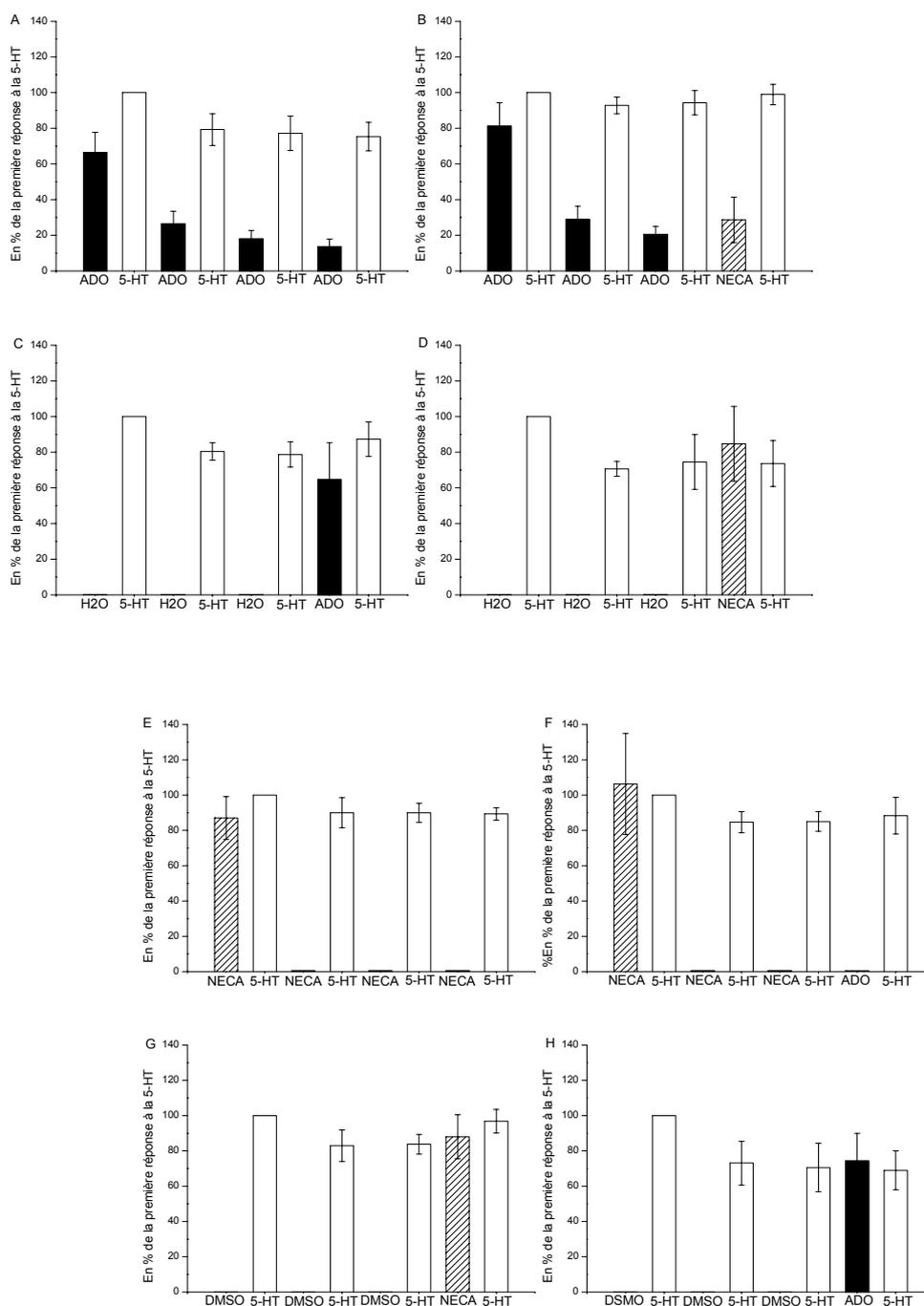
L'une des caractéristiques de la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine chez les rats BN AS et provoqués avec l'OA est le fait qu'elle présente une tachyphylaxie ainsi qu'une tachyphylaxie croisée avec le NECA (Fozard et Hannon, 2000). Ceci porte à croire qu'il existe un mécanisme commun entre les deux agonistes. Afin de chercher des similarités entre le mécanisme de la réponse bronchoconstrictive augmentée à l'adénosine *in vivo* et la réponse contractile sur la bande de parenchyme *in vitro*, nous avons étudié l'existence d'une tachyphylaxie entre l'adénosine et le NECA.

**Protocole expérimental:** Les bandes de parenchyme de poumons sont prélevées sur des animaux sensibilisés et provoqués avec de l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) 3 h avant d'être sacrifiés. Durant une période de stabilisation d'1 h, les tissus sont rincés de manière répétitive, puis on ajoute une concentration de 5-HT (0.03 mM) qui produit une réponse contractile submaximale (voir Fig. 4.6). Les réponses à l'adénosine (3mM), au NECA (0.1 mM) ou à leur véhicule respectif (l'eau pour l'adénosine et le DMSO pour le NECA) sont établies et répétées 3 fois. Une réponse à la 5-HT (0.03 mM) est établie entre chaque réponse à l'adénosine ou au NECA. Il existe un intervalle de 30 minutes entre chaque administration de substance. Le changement de tension de l'adénosine, du NECA et de la 5-HT est exprimé en fonction de la première réponse à la 5-HT (0.03 mM; comme 100%) de la série.

L'administration répétée d'adénosine (3 mM) induit une tachyphylaxie qui a pour effet de diminuer la réponse contractile à l'adénosine au court du temps; la réponse à la 5-HT est également un peu réduite mais pas significativement (Fig. 4.7 A). Une première administration de NECA (0.1 mM) suffit à supprimer totalement les réponses suivantes au NECA, dans ce cas aussi on observe une légère inhibition de la réponse à la 5-HT (Fig. 4.7 E). Une tachyphylaxie croisée semble évidente car les tissus désensibilisés par l'adénosine (3 mM) répondent pauvrement au NECA (0.1 mM) (Fig. 4.7 B). Quant aux tissus désensibilisés par le NECA (0.1 mM), ils ne répondent plus du tout à l'adénosine (3 mM) (Fig. 4.7 F). Les contrôles respectifs sont présentés dans les Fig. 4.7 C; D; G; H. Ils montrent qu'il n'y a pas de changement dans les réponses à l'adénosine ou au NECA après une administration répétée de véhicules.

Dans les expériences *in vivo* effectuées sur des rats BN on avait déjà observé une tachyphylaxie croisée entre l'adénosine et le NECA (Fozard et Hannon, 2000). Les résultats présentés dans cette section sont en accord avec les observations *in vivo* parce qu'ils montrent qu'il existe bien une tachyphylaxie, ainsi qu'une tachyphylaxie croisée, entre l'adénosine et le NECA sur la bande de parenchyme. Ces résultats impliquent donc que l'adénosine et le NECA partagent un mécanisme commun.

---



**Fig. 4.7** Tachyphylaxie et tachyphylaxie croisée entre l'adénosine et le NECA dans les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués à l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) 3 h avant d'être sacrifiés. Des réponses contractiles aux additions répétées (toutes les 30 min) de 5-HT ( $0.03 \text{ mM}$ ), d'adénosine (ADO,  $3 \text{ mM}$ ) ou de NECA ( $0.1 \text{ mM}$ ) sont obtenues. Toutes les valeurs sont exprimées de façon relative par rapport à la première réponse de 5-HT de chaque série qui compte comme 100%. Les valeurs moyennes ( $\pm$  s.e.m) représentées sont celles de 3 à 6 expériences individuelles.

Il y a toutefois une différence entre l'adénosine et le NECA par rapport au degré d'inhibition atteint après des administrations répétées. Alors que la réponse au NECA est entièrement bloquée après la première administration, celle à l'adénosine est inhibée d'environ 60 % après une unique administration et une réponse résiduelle (environ 20 %) demeure même après quatre administrations. De plus, alors que le NECA désensibilise complètement les tissus à l'adénosine, le degré d'inhibition du NECA après l'adénosine est similaire à celui obtenu avec l'adénosine. Vu le rôle probable de l'activation du récepteur dans le mécanisme de la tachyphylaxie (voir ci-dessous), cette observation pourrait refléter le fait qu'aux concentrations utilisées, le NECA produit un stimulus plus puissant envers le récepteur que l'adénosine ce qui est consistant avec le fait que la réponse au NECA exprimée en terme de 5-HT est légèrement plus grande que celle à l'adénosine (l'amplitude de la première réponse à l'adénosine et au NECA est respectivement de  $72 \pm 8 \%$ ,  $n=10$ , et de  $95 \pm 13 \%$ ,  $n=10$ , de la première réponse à la 5-HT). Il aurait été très intéressant de tester des concentrations plus élevées d'adénosine, mais à cause de problèmes de solubilité cela n'a pas été possible. Cependant le fait que le NECA induise une inhibition complète et sélective de l'adénosine (5-HT n'est pas affectée) implique que les deux agonistes partagent un mécanisme d'action commun. Nos résultats sont consistants avec l'hypothèse que nous avons formulée après les études faites avec le NBTI (voir section 4.2.1).

La tachyphylaxie à l'adénosine ou à ses agonistes a déjà été observée dans différentes espèces et sur différents tissus; par exemple l'adénosine induit une tachyphylaxie de la réponse bronchoconstrictive dans les poumons et les trachées perfusées de cochon d'Inde (Thorne et Broadley, 1992). L'adénosine administrée de façon répétée en inhalation diminue également la bronchoconstriction chez les sujets asthmatiques (Phillips *et al.*, 1989).

Nos résultats ne permettent pas de définir le mécanisme de la tachyphylaxie. Il ne peut pas s'agir d'une désensibilisation de la médiation de la réponse contractile à la 5-HT, car celle ci

---

n'est pas très affectée quand les réponses à l'adénosine et au NECA sont fortement réduites ou éliminées. L'explication la plus vraisemblable est qu'il existe un phénomène de désensibilisation des récepteurs à l'adénosine à la surface des mastocytes qui empêche la libération de la 5-HT. Dans la littérature, il est reconnu que tous les sous-types de récepteurs connus de l'adénosine présentent une désensibilisation suite à une exposition à l'un de leurs agonistes (Ralevic et Burnstock, 1998; Fredholm *et al.*, 2001a).

Cependant, les réponses à l'adénosine et au NECA sont indirectement le résultat de la libération de 5-HT des mastocytes des voies respiratoires, et il reste possible qu'un épuisement du stock des médiateurs soit responsable (Hannon *et al.*, 2001). Toutefois, cette hypothèse semble plutôt improbable car les observations *in vivo* sur les animaux ayant reçu une seule dose d'adénosine ne montre qu'un faible nombre de mastocytes qui ont dégranulé (Hannon *et al.*, 2001). Quelque soit l'explication, il est clair que l'adénosine et le NECA partagent un mécanisme d'action commun.

---

### **4.2.3 Effets des agonistes des récepteurs de l'adénosine**

#### **4.2.3.1 Publication 2**

## **Evidence for an atypical receptor mediating the augmented bronchoconstrictor response to adenosine induced by allergen challenge in actively sensitised Brown Norway rats**

**J.P. Hannon, B. Tigani, C. Wolber, I. Williams, L. Mazzone, C. Howes, J.R. Fozard**

*British Journal of Pharmacology* 135, 685-696 (2002)

---

## Résumé

Nous avons étudié la potentialisation de la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine. Elle est potentialisée sélectivement et de façon très marquée après la provocation avec l'OA. Nous présentons une analyse pharmacologique du récepteur induisant cette réponse. Comme l'adénosine, le NECA, un de ses analogues, induit une bronchoconstriction chez les animaux AS et provoqués avec l'OA. Au contraire, ni CPA, ni CGS 21680, ni 2-Cl-IB-MECA, les agonistes sélectifs respectivement pour les récepteurs  $A_1$ ,  $A_{2A}$  et  $A_3$ , n'induisent une réponse, même minimale. Ni l'antagoniste sélectif du récepteur  $A_1$ , le DPCPX, ni celui sélectif pour  $A_{2A}$ , le ZM 241385, ne bloquent la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine. MRS 1754, qui a la même affinité pour les récepteurs  $A_{2B}$  et  $A_1$ , ne parvient pas à bloquer la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine malgré le fait qu'il bloque le récepteur  $A_1$  qui est impliqué dans la bradycardie induite par le NECA. Le 8-SPT et le CGS 15943, les antagonistes des récepteurs  $A_1$ ,  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$  mais pas  $A_3$ , inhibent la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine. Toutefois, le degré de ce blocage ne reflète pas les concentrations plasmatiques, qui sont respectivement 139 et 21 fois plus grandes que la valeur du  $K_B$  au récepteur  $A_{2B}$  de rat. L'adénosine et le NECA, mais pas le CPA, ni le CGS 21680 ou le 2-Cl-IB-MECA, induisent une contraction des bandes de parenchyme de poumons prélevées de rats BN AS et provoqués avec l'OA. Les réponses à l'adénosine ne peuvent être inhibées par le 8-SPT ou le MRS 1754 à des concentrations 50 fois supérieures à leurs affinités pour le récepteur  $A_{2B}$  de rat. Le récepteur induisant la réponse bronchoconstrictive potentialisée à l'adénosine après la provocation allergénique chez le rat BN AS, ne peut être classé comme l'un des quatre sous-types de récepteurs connus de l'adénosine.

---

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

J.P. Hannon, B. Tigani, **C. Wolber**, I. Williams, L. Mazzoni, C. Howes & J.R. Frozard

**Evidence for an atypical receptor mediating the augmented bronchoconstrictor response to adenosine induced by allergen challenge in actively sensitized Brown Norway rats.**

British Journal of Pharmacology 135, 685-696 (2002)

Pages 685-696 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

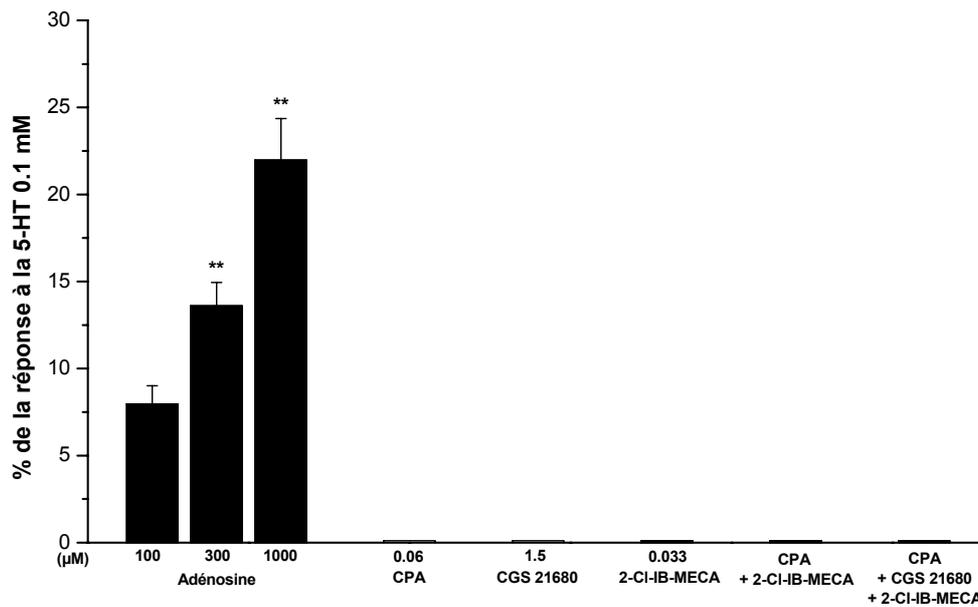
Il est possible de la consulter dans la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

#### **4.2.3.2 Comparaison de l'activité des agonistes sur la bande de parenchyme prélevée de rats BN AS à l'OA et provoqués avec l'allergène**

Lors d'une première étape visant à définir pharmacologiquement le(s) récepteur(s) impliqué(s) dans la réponse contractile à l'adénosine sur les bandes de parenchyme prélevées d'animaux AS et provoqués à l'OA, une gamme d'agonistes pour les récepteurs de l'adénosine a été testée. Il s'agit du NECA (agoniste des récepteurs A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub>; Bruns *et al.*, 1986), du CPA (sélectif pour A<sub>1</sub>; Londos *et al.*, 1980), du CGS 21680 (sélectif pour A<sub>2A</sub>; Jarvis *et al.*, 1989; Wan *et al.*, 1990) et du 2-Cl-IB-MECA (sélectif pour A<sub>3</sub>; Kim *et al.*, 1994). En plus, à ce niveau du projet, nous avons testé trois antagonistes qui sont actifs mais pas sélectifs pour le récepteur A<sub>2B</sub>. Il s'agit du 8-SPT (Evoniuk *et al.*, 1987), CGS 15943 (Jarvis *et al.*, 1991) et MRS 1754 (Kim *et al.*, 2000). Mes expériences ont été effectuées en parallèle des expériences *in vivo* réalisé par J.P. Hannon et B. Tigani. La plupart des résultats ont été publiés dans le *British Journal of Pharmacology* 135, 685-696 (2002) (Publication 2). Des expériences complémentaires à celles présentées dans cette publication seront décrites plus en détail dans ce résumé.

NECA imite l'adénosine en induisant une contraction des bandes de parenchyme, prélevées d'animaux provoqués avec l'OA, supérieure à celle observée sur les bandes d'animaux provoqués avec le véhicule (Publication 2, Fig. 8). Au contraire, ni CPA, CGS 21680 ou 2-Cl-IB-MECA, seuls ou en combinaison, n'induisent de contraction, malgré l'utilisation de concentrations 100 fois supérieures à la valeur du K<sub>i</sub> pour leur récepteur respectif (Jacobson *et al.*, 1995) (Publication 2, Fig. 8; Fig. 4.8).

---



**Fig. 4.8** Effet de l'adénosine, du CPA, du CGS 21680 et du 2-Cl-IB-MECA ou de combinaisons de ces derniers sur les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.t.) 3 h avant d'être sacrifiés. Les réponses sont exprimées en fonction de la réponse à la 5-HT (0.1 mM). Les valeurs moyennes ( $\pm$  s.e.m) représentées sont celles de 3 à 6 expériences individuelles. Les valeurs de CPA, CGS 21680 et 2-Cl-IB-MECA données individuellement sont tirées comme celles de l'adénosine de la Publication 2, Fig. 8.

Le spectre de l'activité des agonistes obtenu pour la bande de parenchyme isolée était remarquablement similaire à celui obtenu pour les réponses bronchoconstrictives *in vivo* avec les mêmes agonistes (Publication 2, Fig. 1 et 8). Cette similarité se reflète même au niveau de la puissance relative de l'adénosine et du NECA. On observe un décalage de la courbe concentration-réponse au NECA d'environ une unité logarithmique vers la gauche par rapport à celle de l'adénosine dans les deux cas, sur la bande de parenchyme (Publication 2, Fig. 8) et l'animal entier (Publication 2, Fig. 1). Ces valeurs suggèrent que la bronchoconstriction à l'adénosine *in vivo* et que la contraction de la bande de parenchyme *in vitro* impliquent les mêmes mécanismes.

Le fait que les deux agonistes, le NECA et l'adénosine, qui ont une forte affinité pour les récepteurs  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  et  $A_3$ , sont capables de contracter la bande de parenchyme, alors que les agonistes sélectifs pour les récepteurs  $A_1$ ,  $A_{2A}$ , et  $A_3$  ne sont pas actifs laisse fortement penser que le récepteur  $A_{2B}$  est le médiateur de la réponse. Toutefois, les expériences préliminaires effectuées *in vivo* ou *in vitro* et utilisant divers antagonistes n'étaient pas compatibles avec cette conclusion (Publication 2).

Par exemple, dans les études *in vivo*, le MRS 1754, qui a une activité similaire pour les récepteurs du rat  $A_{2B}$  et  $A_1$  (Publication 2, Table 2), ne parvient pas à bloquer la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine malgré le blocage de la bradycardie par le NECA qui est induit par le récepteur  $A_1$  (Publication 2, Fig. 6). De plus, le 8-SPT et le CGS 15943, des antagonistes des récepteurs  $A_1$ ,  $A_{2A}$ , et  $A_{2B}$  mais pas  $A_3$ , inhibent la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine *in vivo*. Toutefois, le degré du blocage (de l'ordre de 3 fois comparé avec la courbe dose-réponse à l'adénosine) ne reflète pas les concentrations plasmatiques, qui sont respectivement 139 et 121 fois plus grandes que la valeur du  $K_B$  pour le récepteur  $A_{2B}$  de rat.

Dans mes études *in vitro* effectuées en parallèle, les réponses à l'adénosine n'ont pas pu être antagonisées par le 8-SPT ou le MRS 1754 à des concentrations 50 fois supérieures à leur affinités pour le récepteurs  $A_{2B}$  de rat (Publication 2, Fig. 9). Toutefois, bien que le CGS 15943 soit capable d'antagoniser la réponse à l'adénosine, son affinité estimée à partir de l'effet d'une concentration unique d'antagoniste ( $K_B$ , 506 nM) est nettement inférieure à son affinité pour le récepteur  $A_{2B}$  sur le muscle longitudinal du colon de rat ( $K_B$ , 70 nM) qui fut déterminée dans des conditions similaires (voir section 4.2.4).

Sur les bases de ces observations, il a fallu conclure que le récepteur induisant la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine après une provocation allergique sur des rats BN AS ne peut être catégorisé comme l'un des quatre sous types de récepteurs connus pour l'adénosine.

---

A la vue de ces résultats, une série d'expériences complémentaires pour déterminer le(s) récepteur(s) impliqué(s) dans la réponse à l'adénosine sur les bandes de parenchyme prélevées de rats AS et provoqués avec l'OA, a été effectuée. Premièrement, nous avons étendu l'analyse des agonistes en incluant des concentrations élevées de CPA, de 2-Cl-IB-MECA et un second agoniste sélectif du récepteur A<sub>3</sub>, l'inosine. Deuxièmement, nous avons étendu l'analyse des antagonistes en étudiant une plus large gamme.

---

**4.2.3.3 Publication 3**

**The receptor mechanism mediating the contractile response to adenosine on lung parenchymal strips from actively sensitized, allergen-challenged Brown Norway rats**

**C. Wolber J.R. Fozard**

*Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, published on  
line: 27 january 2005

## Résumé

Les bandes de parenchyme de poumon prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA présentent une hyperréactivité à l'adénosine. La réponse est induite par les mastocytes et des études préliminaires suggèrent l'implication d'un récepteur (ou de plusieurs) qui ne peut être classé parmi les récepteurs connus de l'adénosine. Nous présentons une analyse plus approfondie de la réponse. Des rats males BN, AS avec l'OA, ont été provoqués avec l'OA et sacrifiés trois heures après afin d'en prélever les bandes de parenchyme. La réponse contractile augmentée à l'adénosine a été partiellement bloquée par l'antagoniste du récepteur à la 5-HT, le méthysergide, ou par l'antagoniste du récepteur A<sub>1</sub>, le DPCPX. En présence des deux antagonistes précédents, la réponse a été totalement éliminée. Les réponses à de fortes concentrations de l'agoniste du récepteur A<sub>1</sub>, CPA sont, comme avec l'adénosine, augmentées sur les tissus des animaux provoqués avec l'OA, et inhibées par la combinaison entre le DPCPX et le méthysergide. L'agoniste du récepteur A<sub>3</sub>, le 2-Cl-IB-MECA, ne contracte pas les tissus, mais il bloque partiellement la réponse à l'adénosine. Une combinaison de 2-Cl-IB-MECA et de méthysergide produit un blocage similaire à celui observé avec les composés donnés seuls. Une combinaison entre le 2-Cl-IB-MECA et/ou le méthysergide avec le DPCPX élimine totalement la réponse à l'adénosine. Les effets de l'agoniste du récepteur A<sub>3</sub>, l'inosine, sont augmentés sur les tissus des animaux provoqués avec l'OA et inhibés significativement par le disodium cromoglycate, le méthysergide et le 2-Cl-IB-MECA. Les réponses à l'adénosine sont éliminées quand les bandes de parenchyme sont prélevées sur des rats prétraités pendant 48 h avec de la toxine pertussique. 8-SPT, CGS 15943, XAC, MRS 1754, DPCPX et la théophylline, à des concentrations qui inhibent les récepteurs A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> et A<sub>2B</sub> mais ayant une affinité négligeable pour le récepteur A<sub>3</sub>, inhibent la réponse à l'adénosine, mais on a besoin de fortes concentrations et le blocage est incomplet. MRS 1523 et MRS 1191, qui sont des antagonistes du récepteur A<sub>3</sub>, n'ont aucun effet sur la réponse à l'adénosine. Ces résultats supportent et clarifient notre conclusion précédente: un mécanisme atypique induit la contraction des bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN, AS et provoqués avec l'OA. Les réponses sont produites par un effet combiné entre le récepteur A<sub>1</sub> et un récepteur qui a beaucoup de similitudes avec A<sub>3</sub>, mais sur lequel 2-Cl-IB-MECA agit comme un antagoniste et MRS 1523 et MRS 1191 sont inactifs à des concentrations qui excèdent substantiellement leurs affinités pour le récepteur A<sub>3</sub> de rat.

---

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Cédric Wolber, John R. Frozard**

**The receptor mechanism mediating the contractile response to adenosine on lung parenchymal strips from actively sensitised, allergen-challenged Brown Norway rats.**

Naunyn-Schiedeberg's Arch. Pharmacol. 371, 158-168 (2005)

Pages 158-168 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://www.springerlink.com/media/46WA6AEYVJCVWN768X2M/Contributions/1/W/G/5/1WG5574LJ81EJ1A5.pdf>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

#### **4.2.3.4 Les effets de CPA et 2-Cl-IB-MECA à des concentrations élevées et de l'inosine, un agoniste sélectif du récepteur A<sub>3</sub>**

Un facteur clé qui a permis d'éliminer trois des quatre récepteurs connus pour l'adénosine a été l'utilisation d'agonistes sélectifs comme le CPA (A<sub>1</sub>), le CGS 21680 (A<sub>2A</sub>) et le 2-Cl-IB-MECA (A<sub>3</sub>). Contrairement aux agonistes non sélectifs que sont l'adénosine et le NECA, ces agonistes n'induisent aucune contraction des bandes de parenchyme des animaux sensibilisés et provoqués avec l'allergène, malgré l'utilisation de concentrations 100 fois supérieures à la valeur du K<sub>i</sub> pour les récepteurs (section 4.2.3.2) même lorsqu'ils sont utilisés en combinaison. Il était toutefois important de noter que les concentrations d'adénosine et de NECA requises pour contracter la bande étaient très élevées. Ainsi, la concentration d'adénosine (1 mM) normalement utilisée pour contracter les bandes de parenchyme, dépasse de 14000 fois la valeur du K<sub>i</sub> pour le récepteur A<sub>1</sub> de rat et de 150 fois la valeur du K<sub>i</sub> pour le récepteur A<sub>3</sub> de rat (Mueller, 2003). Dans le cas du NECA, l'intervalle des concentrations s'étend entre 3 et 100 µM, ce qui est respectivement 10 à 300 fois supérieur à la valeur du K<sub>i</sub> pour le récepteur A<sub>3</sub> de rat et 400 à 14000 fois supérieur à la valeur du K<sub>i</sub> pour le récepteur A<sub>1</sub> (Fredholm *et al.*, 2001a). Sur ces bases, nous avons décidé de re-évaluer les effets du CPA et du 2-Cl-IB-MECA à des concentrations plus élevées que celles utilisées dans nos études précédentes. Nous n'avons pas examiné l'agoniste du récepteur A<sub>2A</sub>, CGS 21680, car le récepteur est couplé exclusivement à une protéine G<sub>s</sub> dont l'activation induit une augmentation de l'AMP<sub>C</sub> qui serait inhibitrice des fonctions cellulaires (section 1.1.3.2). La plupart des résultats ont été publiés dans *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (2005) (Publication 3). Des expériences complémentaires à celles présentées dans cette publication seront décrites plus en détail dans ce résumé, en particulier les valeurs contrôles obtenues avec la 5-HT pour chaque expérience.

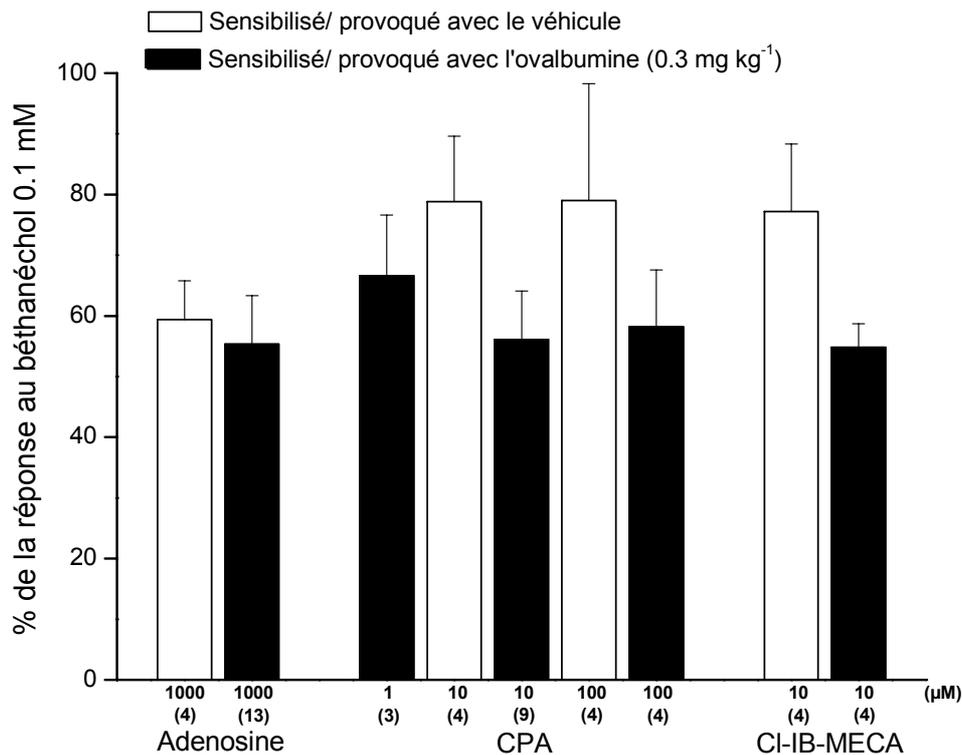
---

La réponse contractile à l'adénosine (1 mM) a été fortement potentialisée sur les bandes de parenchyme prélevées sur des poumons d'animaux sensibilisés et provoqués 3 h auparavant avec l'OA, comparativement à celles prélevées sur des animaux qui ont été provoqués avec le véhicule (solution saline); cela confirme les études déjà réalisées (Hannon *et al.*, 2001) (Publication 3, Fig. 1). De fortes concentrations de CPA (10 et 100  $\mu$ M soit 2000 à 20000 fois la valeur du  $K_i$  pour le récepteur  $A_1$ ) contractent faiblement les tissus des animaux AS et provoqués avec une solution saline (Publication 3, Fig. 1). Toutefois, comme avec l'adénosine, les réponses au CPA sont augmentées (significativement à 100  $\mu$ M) sur les tissus prélevés d'animaux provoqués avec l'allergène (Publication 3, Fig. 1). Les changements de sensibilités à l'adénosine et au CPA sont sélectifs car les réponses à la 5-HT ne sont pas modifiées (Fig. 4.9). De plus, comme c'était le cas dans nos études précédentes (Hannon *et al.*, 2001), le méthysergide inhibe de façon très marquée mais n'élimine pas la réponse augmentée à l'adénosine (Publication 3, Fig. 2). Les réponses augmentées au CPA sont aussi inhibées par la méthysergide (Publication 3, Fig. 3). Cependant, comme avec l'adénosine il reste une composante insensible au méthysergide dans la réponse. Les valeurs contrôle de la 5-HT déterminent l'efficacité du méthysergide, aux concentrations utilisées, à bloquer les réponses à la 5-HT (Fig. 4.10 et 4.11).

Connaissant la sélectivité du CPA pour le récepteur  $A_1$ , nous avons étudié les effets du DPCPX, un antagoniste sélectif puissant du récepteur  $A_1$ , pour définir le rôle de ce site dans la réponse à l'adénosine et au CPA. Le DPCPX induit une inhibition de la réponse à l'adénosine mais uniquement à de fortes concentrations (1, 3 et 10  $\mu$ M) (Publication 3, Fig. 2 et 8). Le degré d'inhibition est faible (1  $\mu$ M bloque la réponse à l'adénosine d'environ 20 %) et ne varie pas de manière significative entre les trois concentrations de DPCPX. Le méthysergide (30 nM) bloque environ 80 % de la réponse à l'adénosine. Une combinaison entre le DPCPX et le méthysergide élimine totalement la réponse à l'adénosine (Publication 3, Fig. 2). Le

---

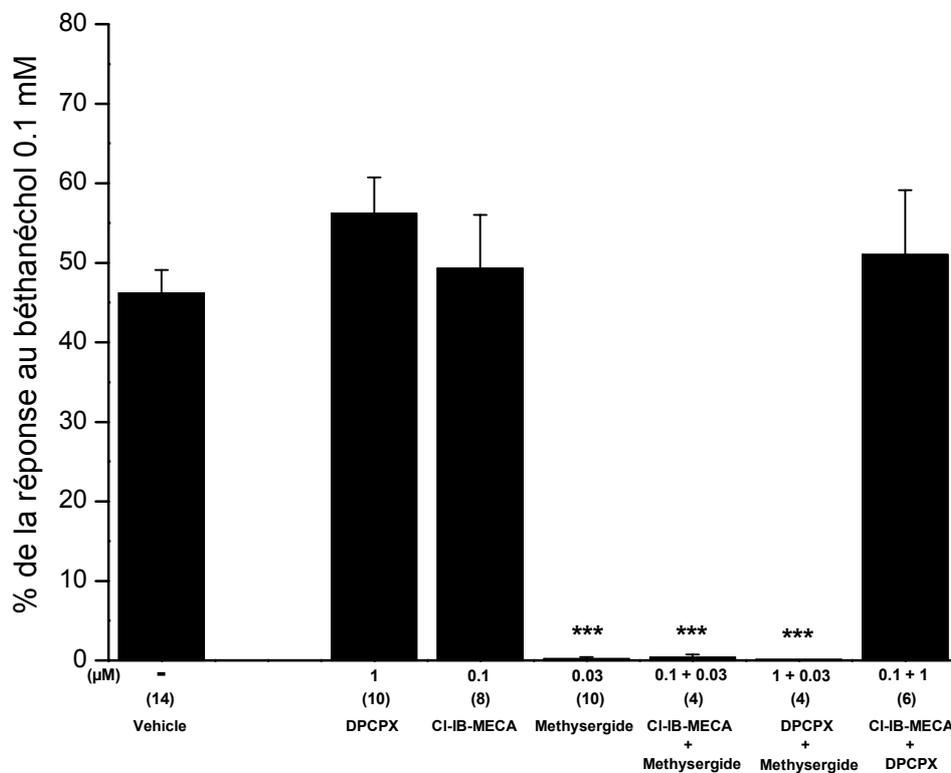
DPCPX (1  $\mu\text{M}$ ) inhibe la réponse augmentée au CPA (100  $\mu\text{M}$ ) d'environ 20 %. Le méthysergide (30 nM) réduit la réponse au CPA d'environ 65 % (Publication 3, Fig. 3). Une combinaison entre le méthysergide et le DPCPX élimine la réponse au CPA (Publication 3, Fig. 3).



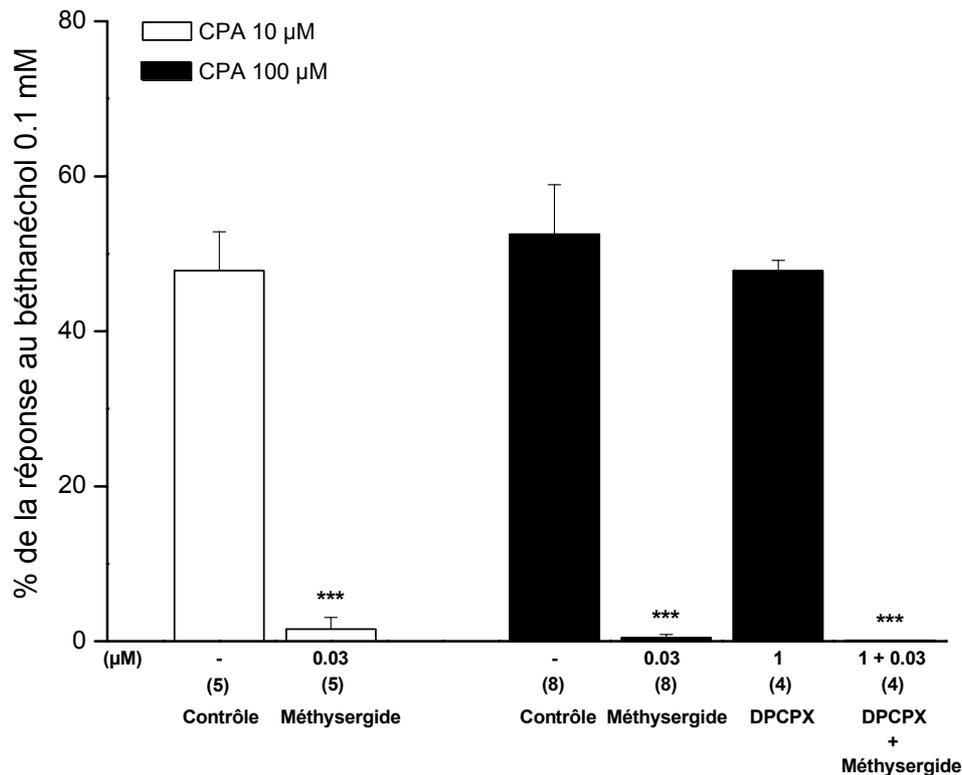
**Fig. 4.9** Ces résultats représentent les changements de la sensibilité de la 5-HT dans les expériences présentées dans la Publication 3, Fig. 1, qui montrent les effets de l'adénosine, du CPA et du 2-Cl-IB-MECA, sur les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA (0.3 mg kg<sup>-1</sup>; i.t.) ou le véhicule 3 h avant d'être sacrifiés. La réponse à la 5-HT (0.01 mM) provient de la courbe concentration-réponse à la 5-HT et est submaximale. Les réponses sont exprimées en fonction de la réponse au béthanéchol (0.1 mM). Les valeurs moyennes ( $\pm$  s.e.m) représentées sont celles de 3 à 13 expériences individuelles.

La réponse augmentée à l'adénosine après la provocation allergique implique pour une large part la 5-HT libérée des mastocytes des voies respiratoires (Hannon *et al.*, 2001; section 4.1.2). Le blocage par le méthysergide peut être utilisé pour définir ce mécanisme (Hannon *et al.*, 2001). Ainsi, la réponse au CPA potentialisée après une provocation allergique semble

impliquer un mécanisme du type du récepteur  $A_1$  et un autre mécanisme non- $A_1$ , qui est sensible au méthysergide et est dépendant des mastocytes. Les réponses contrôles à la 5-HT (Fig. 4.10 et 4.11) supportent cette interprétation. L'analyse des réponses à l'adénosine donne des réponses qualitativement similaires à celle obtenues avec le CPA. La différence entre les réponses au CPA et l'adénosine se situe au niveau de leur contribution relative aux deux mécanismes responsables des réponses contractiles.



**Fig. 4.10** Ces résultats représentent les changements de la sensibilité de la 5-HT dans les expériences présentées dans la Publication 3, Fig. 2, qui montrent les effets du DPCPX, du 2-Cl-IB-MECA et du méthysergide sur la réponse à l'adénosine, dans les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.t.) 3 h avant d'être sacrifiés. La réponse à la 5-HT (0.01 mM) provient de la courbe concentration-réponse à la 5-HT et est submaximale. Les réponses sont exprimées en fonction de la réponse au béthanéchol (0.1 mM). Les valeurs moyennes ( $\pm$  s.e.m) représentées sont celles de 4 à 14 expériences individuelles. \*\*\* $P < 0.001$  montre que la valeur est significativement différente à celle équivalente au groupe provoqué avec le véhicule.



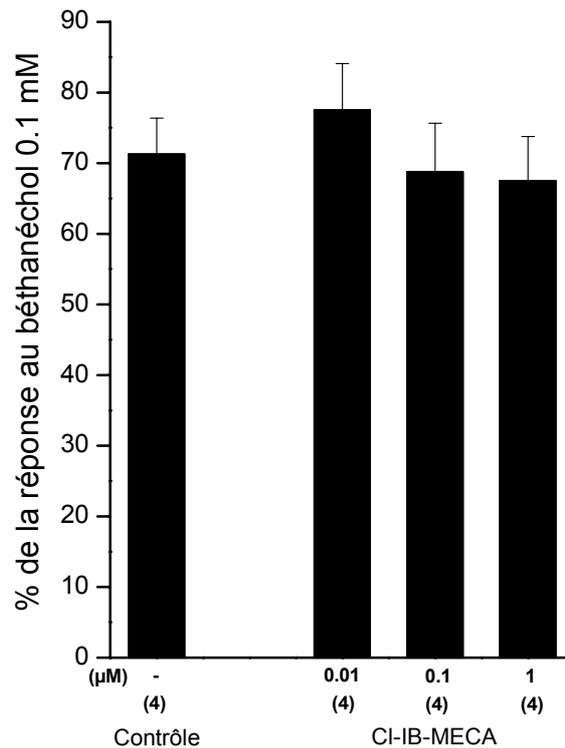
**Fig. 4.11** Ces résultats représentent les changements de la sensibilité de la 5-HT dans les expériences présentées dans la Publication 3, Fig. 3, qui montrent les effets du DPCPX et du méthysergide sur la réponse au CPA sur les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.t.) 3 h avant d'être sacrifiés. La réponse à la 5-HT (0.01 mM) provient de la courbe concentration-réponse à la 5-HT et est submaximale. Les réponses sont exprimées en fonction de la réponse au béthanéchol (0.1 mM). Les valeurs moyennes ( $\pm$  s.e.m) représentées sont celles de 4 à 8 expériences individuelles. \*\*\* $P < 0.001$  montre que la valeur est significativement différente à celle équivalente au groupe provoqué avec le véhicule.

D'après la littérature, le récepteur  $A_3$  induit l'activation des mastocytes chez le rat (Fozard et Hannon, 2000) et de ce fait nous avons testé à cette concentration l'agoniste sélectif du récepteur  $A_3$ , 2-Cl-IB-MECA (Fredholm *et al.*, 2001a), sur la bande de parenchyme de poumons prélevée sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA. Contrairement au CPA, de fortes concentrations de 2-Cl-IB-MECA (10 nM à 10  $\mu\text{M}$ ; soit jusqu'à 333 fois plus que la valeur du  $K_i$  pour le récepteur  $A_3$  de rat; la concentration était limitée par la solubilité), n'ont pas induit de contraction ni sur les animaux provoqués avec le véhicule, ni sur les animaux

provoqués à l'OA (Publication 3, Fig. 1). J'ai donc considéré la possibilité que le 2-Cl-IB-MECA pouvait être soit un agoniste peu efficace, soit un antagoniste, au niveau du site d'action induisant la réponse à l'adénosine. Nous avons donc testé l'activité antagoniste du 2-Cl-IB-MECA sur la réponse à l'adénosine. Pour des concentrations de 100 nM et 1µM, la réponse à l'adénosine était réduite significativement et à un niveau similaire (environ 60 %) pour les deux concentrations (Publication 3, Fig. 4). L'effet est sélectif car les réponses à la 5-HT ne sont pas affectées (Fig. 4.12). Une combinaison entre le méthysergide (30 nM) et le 2-Cl-IB-MECA (100 nM) n'inhibe pas de façon significative la réponse à l'adénosine comparé à l'inhibition obtenue en utilisant un seul de ces deux composés (Publication 3, Fig. 2). Toutefois, l'incubation avec du DPCPX (1 µM) combiné au 2-Cl-IB-MECA (100 nM) élimine la réponse à l'adénosine. Ainsi, le 2-Cl-IB-MECA démontre un effet antagoniste assez puissant sur la réponse contractile à l'adénosine, même si le blocage est incomplet. Comme la combinaison entre le 2-Cl-IB-MECA et le méthysergide n'induit pas un blocage supplémentaire à celui observé avec les substances utilisées séparément et que la combinaison entre le 2-Cl-IB-MECA et le DPCPX élimine la réponse à l'adénosine (Publication 3, Fig. 2), on en conclut que le 2-Cl-IB-MECA et le méthysergide agissent sur la même composante de la réponse à l'adénosine. Les valeurs contrôles obtenues avec la 5-HT (Fig. 4.10) supportent cette interprétation des résultats.

Le blocage sélectif de la composante sensible à la méthysergide dans la réponse à l'adénosine par le 2-Cl-IB-MECA soutient l'hypothèse de l'implication d'un récepteur  $A_3$ . Le fait que le 2-Cl-IB-MECA se comporte comme un antagoniste plutôt que comme un agoniste au niveau du récepteur  $A_3$  est surprenant, car dans la littérature 2-Cl-IB-MECA se comporte toujours comme un agoniste; en fait, l'efficacité intrinsèque du 2-Cl-IB-MECA sur le récepteur  $A_3$  de l'homme est de 99 % (Gao *et al.*, 2004).

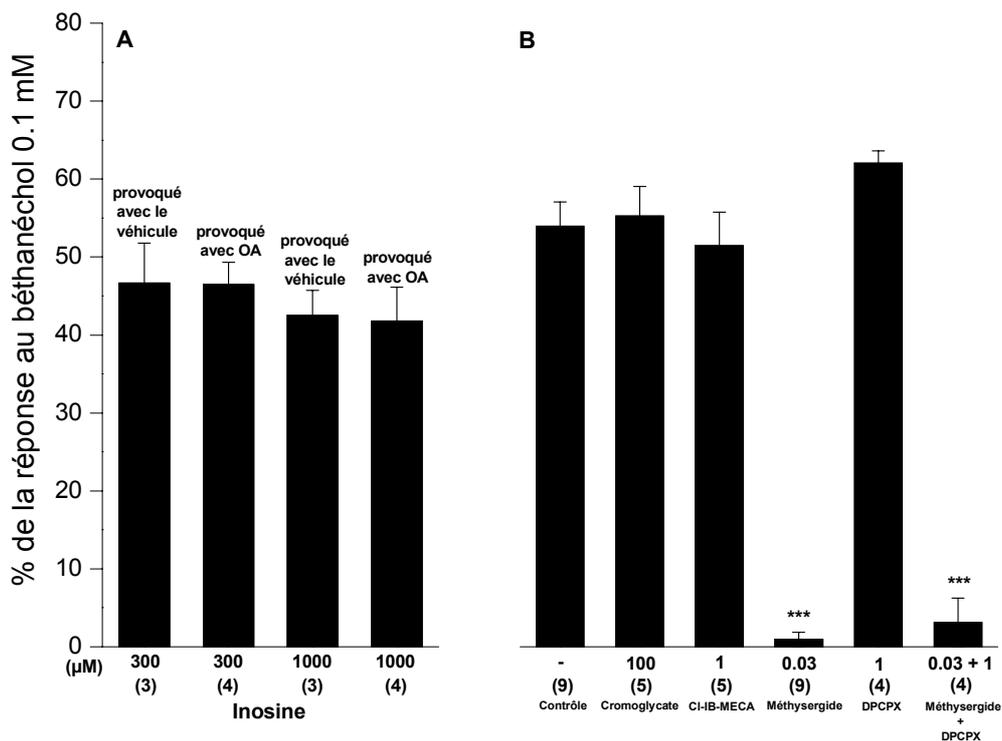
---



**Fig. 4.12** Ces résultats représentent les changements de la sensibilité de la 5-HT dans les expériences présentées dans la Publication 3, Fig. 4, qui montrent les effets du 2-Cl-IB-MECA sur la réponse à l'adénosine, dans les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.t.) 3 h avant d'être sacrifiés. La réponse à la 5-HT (0.01 mM) provient de la courbe concentration-réponse à la 5-HT et est submaximale. Les réponses sont exprimées en fonction de la réponse au béthanéchol (0.1 mM). Les valeurs moyennes ( $\pm$  s.e.m) représentées sont celles de 4 expériences individuelles.

De nouvelles évidences démontrant un rôle du récepteur  $A_3$  ont été obtenues en utilisant l'inosine, un agoniste faible mais sélectif du récepteur  $A_3$  (Jin *et al.*, 1997; Fredholm *et al.*, 2001b; Gao *et al.*, 2001). L'inosine n'a aucun effet sur les tissus prélevés d'animaux provoqués avec une solution saline mais induit une contraction concentration-dépendante sur les bandes de parenchyme prélevées de poumons de rats AS et provoqués avec l'allergène (Publication 3, Fig. 5). La réponse contractile à l'inosine a été significativement inhibée par le disodium cromoglycate (un agent stabilisateur des mastocytes), le méthysergide ou le 2-Cl-IB-MECA (Publication 3, Fig. 5). Ceci soutient la théorie d'une médiation de la réponse par

la 5-HT libérée des mastocytes après l'activation du récepteur  $A_3$  présent sur ces derniers. La réponse résiduelle qui apparaît en présence du méthysergide peut être éliminée par le DPCPX, indiquant qu'il existe une composante induite par le récepteur  $A_1$  dans la réponse à l'inosine, comme à l'adénosine. Les valeurs contrôles obtenues avec la 5-HT supporte cette interprétation (Fig. 4.13).



**Fig. 4.13** Ces résultats représentent les changements de la sensibilité de la 5-HT dans les expériences présentées dans la Publication 3, Fig. 5, qui montrent premièrement (A) les effets de l'inosine sur les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.t.) ou le véhicule 3 h avant d'être sacrifiés, et deuxièmement (B) les effets du DPCPX, du 2-Cl-IB-MECA, du disodium cromoglycate et du méthysergide sur la réponse à l'inosine, dans les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats BN AS et provoqués avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.t.) 3 h avant d'être sacrifiés. La réponse à la 5-HT ( $0.01 \text{ mM}$ ) provient de la courbe concentration-réponse à la 5-HT et est submaximale. Les réponses sont exprimées en fonction de la réponse au béthanéchol ( $0.1 \text{ mM}$ ). Les valeurs moyennes ( $\pm$  s.e.m) représentées sont celles de 3 à 9 expériences individuelles. \*\*\* $P < 0.001$  montre que la valeur est significativement différente à celle équivalente au groupe provoqué avec le véhicule.

La conclusion de ces études avec de hautes concentrations de CPA et de 2-Cl-IB-MECA, utilisé comme un antagoniste, est que la réponse contractile augmentée à l'adénosine, sur les bandes de parenchyme de poumons prélevées d'animaux AS et provoqués avec l'OA, est produite par l'activation d'un récepteur  $A_1$  et d'un autre récepteur partageant beaucoup de similitudes avec  $A_3$  mais pour lequel l'agoniste du récepteur  $A_3$ , le 2-Cl-IB-MECA, se comporte comme un antagoniste.

## **4.2.4 Effets des antagonistes des récepteurs de l'adénosine**

### **4.2.4.1 Publication 4**

# **Antagonist pharmacology of adenosine A<sub>2B</sub> receptors from rat guinea pig and dog**

**J.R. Fozard, F. Baur, C. Wolber**

***European Journal of pharmacology* 475, 79-84 (2003)**

---

## Résumé

Nous avons cherché des preuves des différences au niveau des récepteurs  $A_{2B}$  entre différentes espèces en comparant la puissance de huit antagonistes des récepteurs de l'adénosine, provenant de quatre classes chimiques différentes, sur le récepteur  $A_{2B}$  qui induit la relaxation du muscle lisse dans le colon de rat, dans l'aorte de cochon d'Inde et dans la veine saphène de chien. Dans les trois essais, les antagonistes ont déplacé vers la droite les courbes de concentration-réponse au NECA; de plus on n'a observé aucune diminution de l'effet maximum de ces réponses. Il existe des corrélations très significatives entre les valeurs du  $pK_B$  de chacun des trois récepteurs. Toutefois, les valeurs du  $pK_B$  de 8-SPT, XAC, CGS 15943 et de CGH 2473 pour le récepteur du chien excèdent d'au moins 0.5 unité logarithmique les valeurs du  $pK_B$  pour le rat et le chien au même site. Nos valeurs indiquent une différence entre les récepteurs  $A_{2B}$  du rat et du cochon d'Inde et ceux du récepteur  $A_{2B}$  du chien, respectivement aux analyses pharmacologiques.

---

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

John R. Frozard, François Baur and **Cedric Wolber**

**Antagonist pharmacology of adenosine A<sub>2B</sub> receptors from rat, guinea pig and dog.**

European Journal of pharmacology 475, 79-84 (2003)

Pages 79-84 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)02078-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(03)02078-8)

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

#### **4.2.4.2 Existe t'il des différences pharmacologiques entre les récepteurs A<sub>2B</sub> suivant les espèces ?**

Au commencement du travail décrit dans cette section, le récepteur A<sub>2B</sub> était connu pour induire la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine dépendante des mastocytes chez les asthmatiques (Fozard et Hannon, 2000). Tout cela était basé sur la présence du récepteur A<sub>2B</sub> sur les mastocytes de l'homme et le blocage sélectif de la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine chez les asthmatiques par la théophylline à des doses correspondantes aux concentrations plasmatiques adéquates pour bloquer le récepteur A<sub>2B</sub>. Les analyses pharmacologiques de la réponse à l'adénosine ou aux agonistes des récepteurs à l'adénosine *in vitro* sur les mastocytes de l'homme révèlent également un rôle pour le récepteur A<sub>2B</sub> dans l'activation de ces cellules (Hughes *et al.*, 1984; Peachell *et al.*, 1991; Feoktistov et Biaggioni, 1997; Feoktistov *et al.*, 1998; Feoktistov *et al.*, 2001) (voir section 4.2.3.2).

Au début de mon projet, il est apparu que l'analyse effectuée avec les agonistes sur la réponse à l'adénosine sur les bandes de parenchyme de poumons, montre l'implication des récepteurs A<sub>2B</sub>, mais que les résultats préliminaires obtenus avec les antagonistes ne soutiennent pas cette conclusion (voir section 4.2.4.3; Publication 2). De ce fait, il était nécessaire de connaître l'affinité des antagonistes utilisés pour le récepteur A<sub>2B</sub> du rat. Comme il n'existait pas d'informations sur l'affinité des antagonistes pour le récepteur A<sub>2B</sub> de rat (Fredholm *et al.*, 2001a), il a été nécessaire de mesurer ces valeurs nous même. Ainsi, nous avons utilisé le muscle longitudinal du colon de rat, dont la contraction induite par le béthanéchol est relaxée via l'activation du récepteur A<sub>2B</sub> (Peachey *et al.*, 1999). On a aussi considéré que les différences pharmacologiques entre les récepteurs A<sub>2B</sub> de diverses espèces pourraient être un facteur qui peut compliquer l'interprétation des résultats précédents. Comme il existe peu d'informations sur la différence des divers récepteurs A<sub>2B</sub> entre les espèces dans la littérature, on a étendu les analyses en comparant la puissance de huit antagonistes provenant de quatre

---

classes chimiques différentes sur les récepteurs  $A_{2B}$  de l'adénosine, qui induisent une relaxation sur le colon de rat (Peachey *et al.*, 1999), dans l'aorte de cochon d'Inde (Martin, 1992) et dans la veine saphène de chien (Hargreaves *et al.*, 1991). Le chien est considéré comme très important car il est la seule espèce chez qui, comme chez l'homme, les mastocytes portent le récepteur  $A_{2B}$  (Auchampach *et al.*, 1997). Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus dans la littérature pour le récepteur  $A_{2B}$  de l'homme.

La plupart des résultats ont été publiés dans *European Journal of Pharmacology* 475, 79-84 (2003) (Publication 4). Ma contribution à ces résultats comprend les expériences sur le muscle longitudinal du colon de rat et une partie des expériences sur la veine saphène de chien. Les autres résultats ont été obtenus grâce à Mr. François Baur.

Toutes les substances se comportent comme des antagonistes, dont l'effet est surmontable, dans les trois tissus (Fig. 1-3), et la gamme des affinités s'étend sur trois unités logarithmiques (Table 1). Ces conditions sont appropriées pour décrire pharmacologiquement le site d'action d'un récepteur et les différences avec les autres récepteurs devraient être détectées s'il y en a (Furchgott, 1972; Fredholm *et al.*, 2001a). En pratique, les valeurs de  $pK_B$  des antagonistes sont assez similaires entre les différents essais et on obtient des coefficients de corrélation hautement significatifs entre les trois tissus. L'explication logique de ces valeurs indique que la pharmacologie des antagonistes du récepteur  $A_{2B}$  de l'adénosine est similaire entre les trois espèces.

Une étude plus approfondie des valeurs révèle toutefois que la corrélation entre les affinités pour le récepteur  $A_{2B}$  du rat et du cochon d'Inde est clairement supérieure à celle entre le récepteur du chien et celui du rat ou du cochon d'Inde. Le fait qu'il n'y ait pas de différence significative entre les valeurs de  $pK_B$  des récepteurs  $A_{2B}$  pour les différents antagonistes entre le rat et le cochon d'Inde (Publication 4, Table 1) indique que les récepteurs sont quasi-similaires, si pas identiques, si l'on s'en tient à l'analyse pharmacologique. Au contraire, les

---

valeurs de  $pK_B$  du récepteur du chien pour 8-SPT, XAC, CGS 15943 et CGH 2473 dépassent d'au-moins 0.5 unité logarithmique (à une exception près) les valeurs de  $pK_B$  aux autres sites d'action (Publication 4, Table 1). Furchgott (1972) a suggéré qu'une différence de 0.5 unité logarithmique de la valeur du  $pK_B$  obtenue avec un antagoniste compétitif dans différents essais peut être considérée comme une première évidence de l'implication d'un récepteur ou d'un sous-type de récepteur dans les réponses. Le fait que dans notre étude quatre substances qui représentent trois classes chimiques différentes produisent une valeur de  $pK_B$  pour le récepteur  $A_{2B}$  de chien plus grande de 0.5 unité logarithmique que celle pour le récepteur du rat et du cochon d'Inde, indique que le sous-type du récepteur  $A_{2B}$  de l'adénosine pour le chien doit être différent pharmacologiquement de celui des deux rongeurs.

Il était toutefois important de comparer les valeurs du  $pA_2$  ou du  $pK_B$  des antagonistes que nous avons utilisés avec celles tirées de la littérature pour le récepteur  $A_{2B}$  humain. Les valeurs de six d'entre eux étaient disponibles (Publication 4, Table 2). Il y a de grandes similarités entre les valeurs du  $pK_B$  pour les six substances sur l'humain, le rat et le cochon d'Inde. Cependant comme c'était le cas pour les récepteurs du rat et du cochon d'Inde, les valeurs du  $pK_B$  du 8-SPT, XAC et CGS 15943 pour le récepteur humain sont inférieures d'au moins 0.5 unité logarithmique comparées à celle du chien. Ainsi, le récepteur  $A_{2B}$  humain présente les mêmes analyses pharmacologiques aux antagonistes que celui des récepteurs du rat et du cochon d'Inde. Nos valeurs suggèrent également que le récepteur du chien est quant à lui différent d'un point de vue pharmacologique.

En conclusion, les valeurs présentées suggèrent que les différences pharmacologiques entre le récepteur  $A_{2B}$  de l'homme et du rat sont minimales et ne peuvent expliquer la différence pharmacologique qui émerge entre les mécanismes de la réponse à l'adénosine (dépendante des mastocytes) dans les voies respiratoires du rat et de l'homme.

---

#### 4.2.4.3 Effets des antagonistes sélectifs et non sélectifs aux récepteurs à l'adénosine

Nous avons utilisé une gamme d'antagonistes avec différentes sélectivités pour les récepteurs de l'adénosine afin de définir le(s) récepteur(s) induisant la réponse contractile à l'adénosine sur les bandes de parenchyme. Voici les antagonistes non-sélectifs pour les récepteurs à l'adénosine  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ , le 8-SPT (Jacobson *et al.*, 1999), la théophylline (Fredholm *et al.*, 2001a) et le CGS 15943 (Kim *et al.*, 1998), les antagonistes sélectifs du récepteur  $A_1$ , le XAC (Jacobson *et al.*, 1986) et le DPCPX (Bruns *et al.*, 1986; Jacobson *et al.*, 1999), l'antagoniste sélectif des récepteurs  $A_1/A_{2B}$ , le MRS 1754 (Kim *et al.*, 2000) et les antagonistes sélectifs du récepteur  $A_3$ , le MRS 1523 et le MRS 1191 (Mueller, 2003). Les résultats préliminaires ont été publiés dans *British Journal of Pharmacology* 135, 685-696 (2002) (Publication 2) et dans *Drug Development Research* (2003) (Publication 5, en annexe dans la section 7). L'analyse complète a été publiée dans *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (2005) (Publication 3). Bien que les valeurs clés sont présentées dans la Publication 3, Fig. 8 et Table 1, je les ai incluses dans ce résumé pour faciliter la discussion. Des expériences complémentaires à celles publiées seront décrites plus en détail dans ce résumé.

Toutes les analyses ont été effectuées à partir de bandes de parenchyme de poumons de rats BN AS et provoqués avec l'OA *in vivo*. Le fait que de hautes concentrations d'adénosine sont nécessaires pour induire la contraction des bandes de parenchyme et qu'on observe une rapide tachyphylaxie (voir section 4.2.2), s'apparente à une approche classique, basée sur un déplacement des courbes concentration-réponse permettant de définir la puissance de l'antagoniste. Cependant, l'activité des antagonistes peut aussi être mesurée en utilisant différentes concentrations d'antagonistes contre une seule concentration submaximale d'adénosine.

Les tissus ont été incubés pendant trente minutes, avant d'ajouter l'adénosine, avec le 8-SPT, le CGS 15943, le XAC, le MRS 1754, le DPCPX et la théophylline, qui aux concentrations utilisées inhibent les récepteurs  $A_1$   $A_{2A}$  et/ou  $A_{2B}$  du rat et ont une affinité négligeable avec le récepteur  $A_3$  de rat. Tous ces antagonistes induisent un blocage significatif de la réponse contractile à l'adénosine. Toutefois, le blocage n'était évident que pour de concentrations relativement élevées et limité dans son effet (sauf dans le cas de la théophylline, 100  $\mu$ M). Le degré d'antagonisme ne dépasse approximativement pas les 30 % avec aucun des composés (Publication 3, Fig. 8; Fig. 4.14). Bien qu'une tendance à l'inhibition ait été observée avec le MRS 1754, il n'y a aucune différence statistique significative. MRS 1523 et MRS 1191 ne montrent aucun effet antagoniste sur l'adénosine à des concentrations allant jusqu'à 10  $\mu$ M (Fig. 4.14).

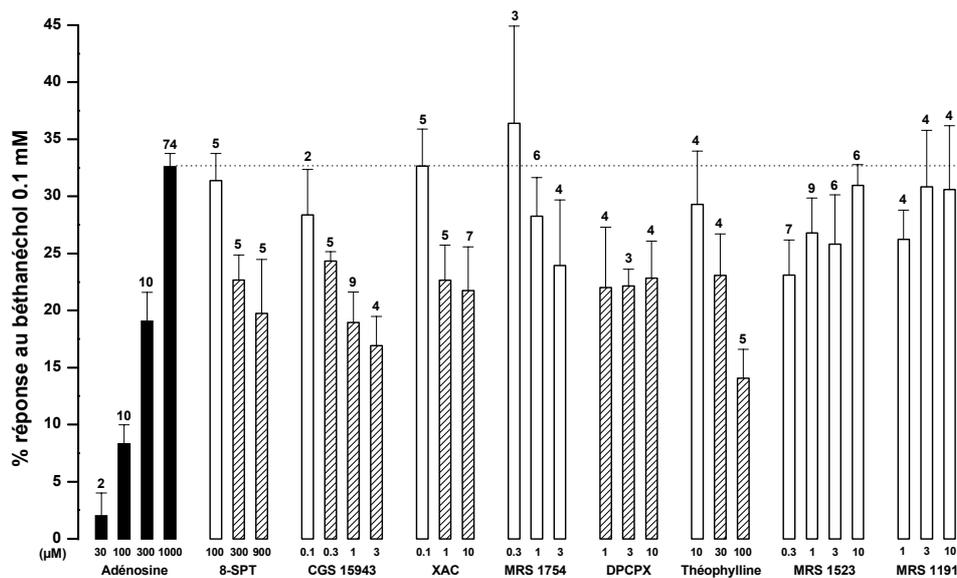
Parce que la réponse à l'adénosine est induite par la 5-HT (Hannon *et al.*, 2001), il est important qu'il n'y ait pas de changement de sensibilité au niveau des préparations à la 5-HT avec les antagonistes. La Fig. 4.15 montre qu'aucun des composés n'affecte significativement la réponse à la 5-HT, à l'exception de la théophylline à une concentration de 100  $\mu$ M. Ainsi et à part dans le cas de la théophylline, les effets des antagonistes ne peuvent pas être attribués à un blocage des effets de la 5-HT.

Les caractéristiques de la majorité des antagonistes sur la réponse à l'adénosine, sont qu'ils induisent tous un blocage partiel et forment un plateau utilisé à de hautes concentrations. Il existe diverses explications possibles pour ce phénomène.

Premièrement un blocage partiel peut être dû à un temps d'incubation trop court avec les antagonistes pour atteindre un blocage maximum. Pour tester cette hypothèse, j'ai doublé le temps d'incubation avec l'un des antagonistes, le 8-SPT, sur la réponse à l'adénosine. Les résultats présentés dans la Fig. 4.16 montrent que le blocage n'était pas plus grand après soixante minutes d'incubation. Dans une des expériences, la concentration de 8-SPT dans le

---

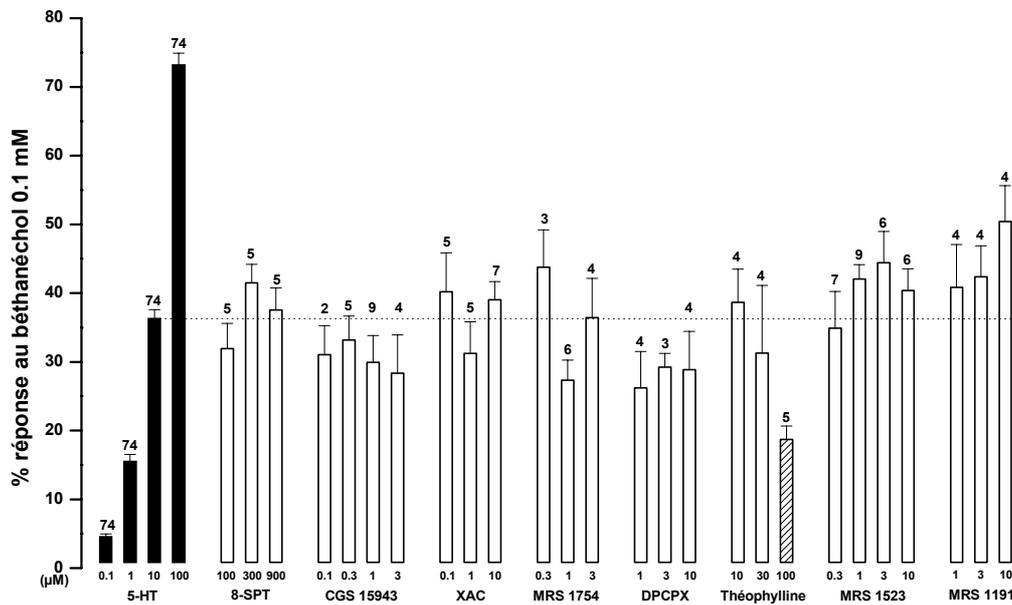
bain a été mesurée par chromatographie (LC/MS) au début de l'incubation et immédiatement avant que la réponse à l'adénosine ne soit établie (grâce à l'aide du Dr. Thomas Buhl, Novartis). Le 8-SPT était stable dans les conditions de l'expérience; les concentrations à 30 et 60 minutes prélevées dans les bains étaient respectivement de 100 et 116 % de la concentration préparée initialement.



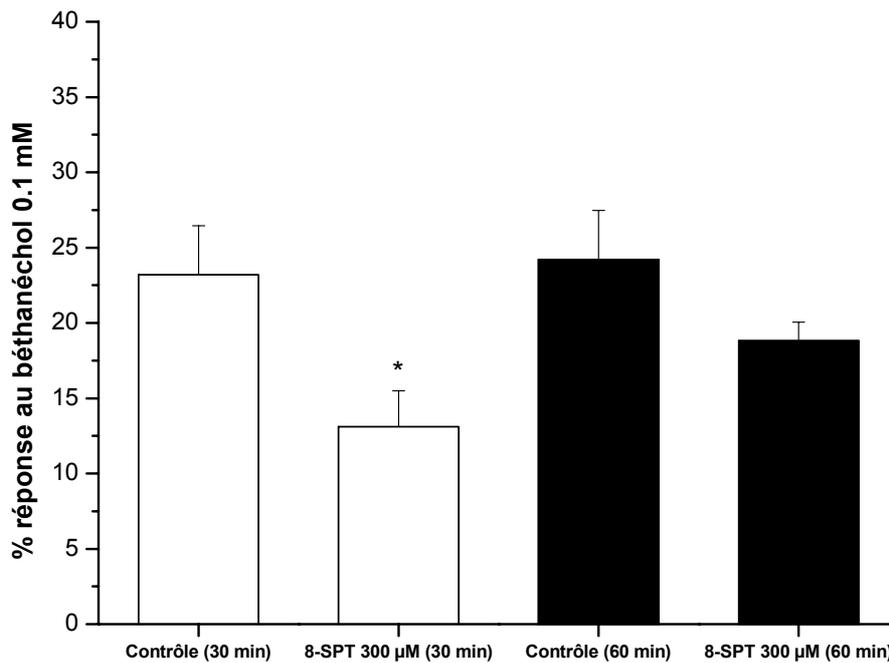
**Fig. 4.14** Les effets des antagonistes des récepteurs à l'adénosine, 8-SPT, CGS 15943, XAC, MRS 1754, DPCPX, théophylline, MRS 1523 ou MRS 1191 en réponse à l'adénosine (1 mM) sur les bandes de parenchyme de poumon prélevées de rats BN AS et provoqués 3 h avant leur mort avec l'OA (0.3 mg kg<sup>-1</sup> i.t.). Les réponses sont exprimées relativement à la réponse maximale au béthanéchol (100 µM). Seule une concentration d'antagoniste a été testée par tissu. La courbe concentration réponse à l'adénosine est représentée sur la gauche. Les résultats représentent les moyennes (± s.e.m) du nombre d'expériences individuelles apparaissant sur le haut des histogrammes. Les comparaisons ont été effectuées avec des valeurs contrôles sur des tissus provenant du même animal et de façon simultanée. Les valeurs des contrôles représentés sur la figure ont été cumulées afin d'en faciliter la lecture. Les colonnes hachurées indiquent une différence significative ( $P < 0.05$ ) par rapport à la réponse à l'adénosine (1 mM) mesurée en absence d'antagoniste dans la même expérience.

Nous avons ensuite considéré la possibilité que certains des composés n'ont pu être totalement dissous dans le cas des concentrations élevées. Une nouvelle fois, en collaboration avec le Dr. Thomas Buhl, nous avons pu tester cette hypothèse en mesurant la concentration des

antagonistes incubés dans les bains, avec le GGS 15943, qui présente un plateau très net lorsqu'il est utilisé à de fortes concentrations. Les résultats ont montré que les concentrations de CGS 15943 mesurées dans les bains censés contenir 0.1, 1 et 10  $\mu\text{M}$  du composé étaient identiques. Ainsi, une limite de la solubilité ne peut pas être une explication valable pour définir l'existence d'un plateau dans le cas du CGS 15943.

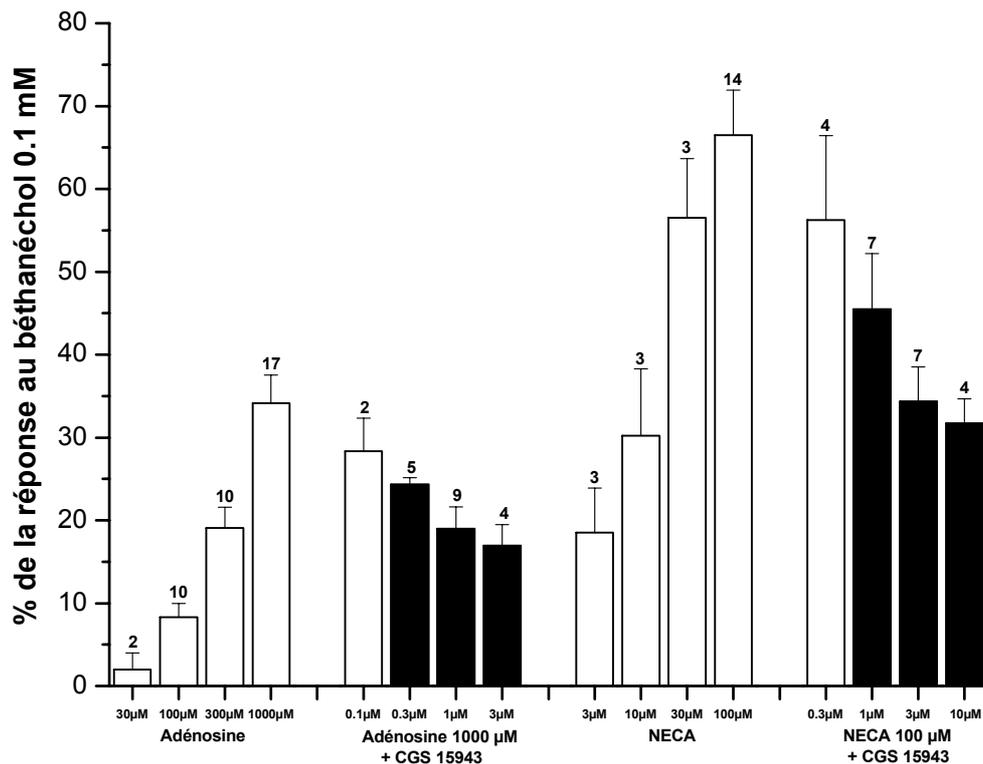


**Fig. 4.15** Les effets des antagonistes des récepteurs à l'adénosine, 8-SPT, CGS 15943, XAC, MRS 1754, DPCPX, théophylline, MRS 1523 ou MRS 1191 en réponse à la 5-HT (0.01 mM) sur les bandes de parenchyme de poumon prélevées de rats BN AS et provoqués 3 h avant leur mort avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ i.t.}$ ). Les réponses sont exprimées par rapport à la réponse maximale au bétanéchol (100  $\mu\text{M}$ ). Seule une concentration d'antagoniste a été testée par tissu. La courbe concentration réponse à la 5-HT est représentée sur la gauche. Les résultats avec la 5-HT (0.01 mM) sont présentés car cette concentration donne une réponse qualitativement similaire à l'adénosine (1 mM). Les résultats représentent les moyennes ( $\pm$  s.e.m) du nombre d'expériences individuelles apparaissant sur le haut des histogrammes. Les comparaisons ont été effectuées avec des valeurs contrôles sur des tissus provenant du même animal et de façon simultanée. Les valeurs des contrôles représentés sur la figure ont été cumulées afin d'en faciliter la lecture. La colonne hachurée indique une différence significative ( $P < 0.05$ ) par rapport à la réponse à la 5-HT (0.01 mM) mesurée en absence d'antagoniste dans la même expérience.



**Fig. 4.16** Les effets de la durée d'incubation avec le 8-SPT sur la réponse à l'adénosine sur les bandes de parenchyme de poumon prélevées de rats BN AS et provoqués 3 h avant leur mort avec l'OA ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$  i.t.). Le 8-SPT était mis à incuber durant 30 ou 60 minutes. Les réponses sont exprimées relativement à la réponse maximale au béthanéchol ( $100 \text{ µM}$ ). Les résultats représentent les moyennes ( $\pm$  s.e.m) de 5 expériences individuelles. \* $P < 0.05$  indique que la valeur diffère significativement de la valeur contrôle équivalente.

Nous avons alors voulu savoir si le plateau était dû à l'utilisation exclusive de l'adénosine ou s'il était également présent avec un autre agoniste. Une fois de plus nous avons utilisé le CGS 15943, et mesuré les effets de son blocage sur une gamme de concentrations du NECA, qui comme l'adénosine a une forte activité sur tous les sous-types de récepteurs à l'adénosine. Ces valeurs ont ensuite été comparées à celles obtenues contre l'adénosine. Ces résultats présentés sur la Fig. 4.17 montrent que le blocage partiel et l'apparition d'un plateau ont lieu sur l'adénosine et le NECA.



**Fig. 4.17** Les effets du CGS 15943 sur la réponse à l'adénosine (1 mM) ou celle au NECA (100 µM) sur les bandes de parenchyme de poumon prélevées de rats BN AS et provoqués 3 h avant leur mort avec l'OA (0.3 mg kg<sup>-1</sup> i.t.). Les réponses sont exprimées relativement à la réponse maximale au béthanéchol (100 µM). Seule une concentration de CGS 15943 a été testée sur chaque tissu. Les courbes concentration réponse à l'adénosine et au NECA sont également représentées. Les résultats représentent les moyennes ( $\pm$  s.e.m) du nombre d'expériences individuelles apparaissant sur le haut des histogrammes. Les comparaisons ont été effectuées avec des valeurs contrôles sur des tissus provenant du même animal et de façon simultanée. Les colonnes pleines indiquent une différence significative ( $P < 0.05$ ) par rapport à la réponse à l'adénosine (1000 µM) ou au NECA (100 µM) mesurée en absence d'antagoniste.

Le fait d'avoir démontré que le temps d'incubation et que la solubilité n'étaient pas une explication pour le blocage incomplet de la réponse à l'adénosine et que des effets qualitativement similaires au CGS 15943 ont été observés sur un large spectre de concentrations à l'adénosine et au NECA, étaient très importants, car cela nous a permis de nous pencher sur le rôle des différents sous types de récepteurs sur la réponse à l'adénosine. Ceci a conduit à l'analyse des effets de hautes concentrations de CPA et de 2-Cl-IB-MECA

(voir section 4.2.3.4) qui fournissent des preuves de l'implication du récepteur A<sub>1</sub> et d'un second récepteur ayant des similitudes avec A<sub>3</sub>. La question a été alors de savoir comment concilier les valeurs des analyses effectuées avec les antagonistes avec celles effectuées avec les agonistes.

De manière à faciliter la discussion sur la significativité des valeurs obtenues avec les antagonistes, j'ai volontairement assumé le fait que ces analyses effectuées sur la réponse contractile à l'adénosine impliquent le récepteur A<sub>1</sub> et un récepteur ayant des similitudes avec A<sub>3</sub> qui contribuent, respectivement à hauteur de 20 et 80 %, à la réponse à l'adénosine 1 mM. Dans la Table 4.1 nous avons comparé la gamme de concentrations des antagonistes suffisantes pour induire un blocage significatif de la réponse à l'adénosine avec les affinités des antagonistes pour les divers sous-types de récepteurs trouvées dans la littérature.

	A <sub>1</sub> K <sub>i</sub> (nM)	A <sub>2A</sub> K <sub>i</sub> (nM)	A <sub>2B</sub> K <sub>B</sub> (nM) <sup>c</sup>	A <sub>3</sub> K <sub>i</sub> (nM)	Bande de poumon (nM) <sup>d</sup>
8-SPT	4200 <sup>a</sup>	n.d.	1680	>100000	100000-300000
Théophylline	11000	32000	7874	>100000	10000-30000
CGS 15943	16	2.5	70	>100000	100-300
XAC	3	37	74	>100000	100-1000
DPCPX	0.3	340	247	>100000	<1000
MRS 1754	17	610	19	n.d.	>1000
MRS 1523 <sup>b</sup>	15600	2050	n.d.	316	>10000
MRS 1191 <sup>b</sup>	40100	>100000	n.d.	1420	>10000

**Table 4.1** Affinités des antagonistes pour les sous-types de récepteurs à l'adénosine du rat et leur efficacité comme antagonistes sur la réponse à l'adénosine sur les bandes de parenchyme de poumons prélevées chez des rats BN AS et provoqués 3 h avant d'être sacrifié avec l'OA. Les valeurs de K<sub>i</sub> proviennent des résultats d'études de liaison provenant de Fredholm *et al.* (2001a) à l'exception de <sup>a</sup> Jacobson *et al.* (1999), <sup>b</sup> Mueller (2003). <sup>c</sup>Valeurs obtenues à partir du muscle longitudinal du colon de rat (Section 4.2.4.2). <sup>d</sup> Gamme de concentration dans laquelle on observe le premier blocage significatif de la réponse à l'adénosine sur les bandes de parenchyme. n.d. = valeur non définie.

La première chose à observer est qu'à l'exception de MRS 1523 et de MRS 1191, aucun des antagonistes n'a d'activité sur le récepteur A<sub>3</sub> de rat aux concentrations utilisées. On s'attend alors à ce que 80 % de la réponse soit résistante au blocage par ces agents. Ceci est le cas dans les limites des variations expérimentales (l'activité relativement forte de la théophylline et le blocage concomitant de la réponse à la 5-HT peuvent refléter l'effet relaxant sur le tissu dû à l'inhibition non sélective des phosphodiesterases aux concentrations utilisées) (Fozard, 2003). D'un autre côté, si un blocage est observé, il doit avoir lieu à des concentrations adéquates pour bloquer le récepteur A<sub>1</sub>. À partir des informations de la Table 4.1, tous les composés doivent bloquer le récepteur A<sub>1</sub> à des concentrations qui inhibent l'adénosine. La raison pour laquelle on a besoin de fortes concentrations d'antagonistes pour bloquer est peut-être due au fait que la concentration d'adénosine, 1 mM, est supramaximale pour induire l'activation du récepteur A<sub>1</sub>. Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour vérifier cela.

Nous avons utilisé des antagonistes sélectifs, mais relativement faibles, du récepteur A<sub>3</sub> de rat, MRS 1523 et MRS 1191, dans le but d'obtenir de nouvelles évidences de l'implication de ce récepteur dans la réponse contractile à l'adénosine. Les résultats ont été surprenants car aucun des composés n'a été en mesure de bloquer la réponse à l'adénosine malgré l'utilisation d'une concentration de 10 µM qui excède respectivement de 30 et 7 fois le K<sub>i</sub> pour le récepteur A<sub>3</sub>. À cause des contraintes dues à la solubilité, aucun des composés n'a pu être utilisé à des concentrations supérieures à 10 µM. Le manque d'effet ne peut pas être expliqué par le fait que la réponse à l'adénosine était supramaximale car il a déjà été démontré lors de courbes concentration-réponse à l'adénosine (Fig. 4.2.8), qu'un blocage d'au-moins de 3 fois peut être observé. De plus dans la littérature des concentrations similaires ou inférieures de MRS 1523 et de MRS 1191 à celles utilisées dans mes expériences se sont montrées capable de bloquer une variété de réponses impliquant le récepteur A<sub>3</sub> de rat (Schneyvays *et al.*, 2000; Jacobson, 2001; Hentschel *et al.*, 2003). Ainsi, les valeurs des analyses antagonistes sont en accord avec

---

le fait que le récepteur A<sub>1</sub> contribue à la réponse contractile à l'adénosine. Toutefois, ces analyses ne soutiennent pas l'implication du récepteur A<sub>3</sub> comme cela a été sous-entendu après les analyses effectuées avec les agonistes.

### 4.2.5 Les effets de la toxine pertussique

Les analyses antérieures des effets des agonistes et des antagonistes des récepteurs de l'adénosine nous ont amené à conclure que la réponse contractile augmentée à l'adénosine sur les bandes de parenchyme de poumons de rats BN AS et provoqués avec l'OA, implique l'activation du récepteur A<sub>1</sub> et d'un site ayant des similitudes pharmacologiques avec le récepteur A<sub>3</sub>. Le récepteur A<sub>1</sub> et le récepteur A<sub>3</sub> sont tous les deux couplés à des protéines de la famille des G<sub>i/o</sub> (Ralevic et Burnstock, 1998; Fredholm *et al.*, 2001a; Table 1.1). Les protéines G<sub>i</sub> et G<sub>o</sub> sont des cibles de la toxine pertussique qui induit une ADP-ribosylation de la sous-unité  $\alpha$  de G<sub>i/o</sub> et la découple des récepteurs (Nurnberg, 2000). En conséquence, les effets biologiques induits par les récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>3</sub> sont généralement bloqués par la toxine pertussique (Ralevic et Burnstock, 1998). De ce fait nous avons effectué des expériences pour définir si la réponse augmentée à l'adénosine pouvait être bloquée par la toxine pertussique.

De manière générale, afin de définir l'effet de la toxine pertussique dans les expériences *in vitro*, la substance est ajoutée dans le milieu d'incubation (Marquardt *et al.*, 1988; White *et al.*, 1993) à une concentration couramment utilisée de 100 ng ml<sup>-1</sup> et l'effet qui en résulte est observé 24 h après. Une période d'incubation aussi longue n'est pas évidente avec des organes isolés comme les bandes de parenchyme car on a besoin d'effectuer de nombreux rinçages et rajout de toxine pertussique. Cependant, nous avons incubé les tissus avec de la toxine pertussique 100 ng ml<sup>-1</sup> durant 1 h (n = 1), 4 h (n = 1) ou 8 h (n = 1). Aucun signe de blocage de la réponse à l'adénosine sous de telles conditions expérimentales n'a pu être obtenu. Sur les bases de cette expérience, nous avons décidé de traiter les animaux avec la

---

toxine pertussique de façon *in vivo* en utilisant la méthode qui a été établie et validée dans le laboratoire auparavant (Carruthers et Fozard, 1993). Dans cette approche, les animaux reçoivent une injection intraveineuse de toxine pertussique ( $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) et le résultat du traitement est évalué environ 48 h plus tard.

Les résultats ont été publiés dans *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (2005) (Publication 3, section 4.2.3.3). Deux expériences ont été réalisées. Dans la première, des animaux AS ont été prétraités avec la toxine pertussique ( $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ , i.v.) ou le véhicule 45 h avant la provocation avec l'OA. Les réponses à l'adénosine (0.1 et 1 mM) ont été totalement éliminées chez les animaux prétraités avec la toxine pertussique. Les réponses à la 5-HT ont été légèrement réduites (environ 30 %) mais de manière significative (Publication 3; Fig. 6). Ces résultats sont consistants avec le fait que la réponse à l'adénosine est induite par des récepteurs couplés à des protéines G sensibles à la toxine pertussique. Toutefois, il reste une autre alternative, même s'il s'agit d'une explication peu probable. Ainsi, bien que l'activation des mastocytes au travers du récepteur de haute affinité aux IgE, Fc $\epsilon$ RI, est censée ne pas être affectée par la toxine (Saito *et al.*, 1987; Bronner *et al.*, 1990; Apgar, 1994), il est possible que l'effet inhibiteur observé sur la réponse à l'adénosine reflète un blocage par la toxine pertussique de l'étape de sensibilisation due à la provocation allergique 3 h avant de prélever les tissus des animaux.

Pour éliminer cette possibilité, nous avons effectué une seconde série d'expériences dans lesquelles les bandes de parenchyme de poumons ont été prélevées chez des rats AS et traités depuis 48 h avec la toxine pertussique. La provocation allergique a alors été effectuée entièrement *in vitro* (voir section 4.1.2). Sous ces conditions, la réponse biphasique à l'OA (qui reflète la libération de 5-HT et des leucotriènes suite à l'activation des mastocytes – voir section 4.1.2) n'a pas été affectée alors que la réponse à l'adénosine (1 mM), augmentée après la provocation à l'allergène, a été éliminée (Publication 3; Fig. 7). La réponse à la 5-HT n'a

---

pas été affectée par le prétraitement avec la toxine pertussique. Ces résultats démontrent que la réponse contractile des bandes de parenchyme *in vitro* est transmise par un récepteur (ou des récepteurs) couplé à une protéine G sensible à la toxine pertussique.

Etant donné le rôle établi de  $G_i/G_o$  dans la voie de signalisation lors de l'activation du récepteur  $A_1$  (voir ci-dessus) les résultats avec la toxine pertussique supportent le rôle de ce site dans la réponse de la bande de parenchyme à l'adénosine. Ils démontrent aussi un autre point commun entre le récepteur qui induit la composante mastocytaire dans la réponse à l'adénosine et le récepteur  $A_3$ . Ils sont tous deux sensibles à la toxine pertussique. Dans ce contexte, la dégranulation des mastocytes pulmonaires du rat et de la souris induite par le récepteur  $A_3$  de l'adénosine est éliminée par la toxine pertussique (Beaven et Ozawa, 1996; Zhong *et al.*, 2003).

---

## **SECTION 5.**



### **5. Discussion générale**

Les résultats présentés dans cette thèse apportent de nouveaux éléments concernant le mécanisme de l'augmentation de la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine suite à une provocation allergique chez les rats BN AS. Les aspects fondamentaux des résultats et leurs apports significatifs sont discutés ci-dessous.

## **5.1 Chez le rat BN, est-ce que la réponse contractile à l'adénosine sur la bande de parenchyme *in vitro* reflète la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine *in vivo* ?**

Pour le type d'étude envisagé, il a été décidé d'utiliser une préparation *in vitro* du poumon et nous avons alors considéré la possibilité d'utiliser la trachée ou la bande de parenchyme. Selon la littérature, la réponse de la trachée de rat à la 5-HT aurait une composante cholinergique prononcée (Joos *et al.*, 1997) qui serait non représentative de la réponse bronchoconstrictive à la 5-HT (et à l'adénosine) dans le rat *in vivo* qui n'en a pas (Hannon *et al.*, 2001). Au contraire, les réponses à la 5-HT dans les bandes de parenchyme sont affectées de manière minimale par l'atropine à une concentration qui abolit la réponse au bétanéchol (J. Fozard, observations non publiées). De plus, dans des expériences préliminaires, la préparation de bandes de parenchyme des poumons prélevées de rats BN AS et provoqués avec l'allergène imite les résultats obtenus *in vivo* en montrant des réponses contractiles robustes et accentuées à l'adénosine comparées au contrôles (Hannon *et al.*, 2001). De ce fait, la bande de parenchyme a été adoptée comme la préparation *in vitro* pour mes études.

Une augmentation de la résistance des voies respiratoires à l'adénosine ou à d'autres bronchospasmogènes chez le rat BN anesthésié, reflète la contraction des muscles lisses du tractus respiratoire. Le site d'action majeur semble se situer au niveau des voies respiratoires supérieures mais il y a également une contribution de la partie distale des voies respiratoires (Dreshaj *et al.*, 1994). La bande de parenchyme représente, par définition, exclusivement la

---

partie distale des voies respiratoires. Elle contient plusieurs éléments qui pourraient contribuer à la réponse contractile aux spasmogènes et inclut de petites voies respiratoires, de petits vaisseaux et des murs alvéolaires (Goldie *et al.*, 1982). La contribution relative de ces éléments à la réponse contractile à l'adénosine (ou à la 5-HT) dans les expériences n'est pas connue. Toutefois, la 5-HT est un constricteur puissant des bronchioles terminales des poumons de rat si elle est libérée par les mastocytes suite à une activation par l'allergène, ou si elle est ajoutée directement sur le tissu (Wohlsen *et al.*, 2001). Il est cependant vraisemblable que les petites voies respiratoires de la bande de parenchyme apportent une contribution significative à la composante induite par les récepteurs à la 5-HT sur la réponse à l'adénosine.

Toutefois, il est important d'insister que dans la plupart de mes études, il n'est pas crucial de connaître précisément tous les éléments qui contribuent à la contraction induite par la 5-HT ou l'adénosine. Ainsi, la réponse contractile peut être considérée comme un «essai biologique» de la libération de 5-HT des mastocytes, par l'activation des récepteurs à l'adénosine. Toutefois, le récepteur A<sub>1</sub> joue un rôle sur les éléments vasculaires qui contribuent à la réponse contractile à l'adénosine sur la bande de parenchyme (voir ci-dessous). Il y a cependant, une remarquable similitude entre les observations basiques effectuées *in vivo* et celles faites sur la bande de parenchyme. Dans les deux cas, l'adénosine est potentialisée par une provocation allergique, la réponse augmentée présente une tachyphylaxie et est bloquée par le méthysergide et le disodium cromoglycate (Fozard et Hannon, 2000; Hannon *et al.*, 2001). Ainsi, au commencement de ces études, la réponse de la bande de parenchyme *in vitro* reflétait la réponse bronchoconstrictive *in vivo*. Les similitudes et les différences sont devenues plus évidentes au fur et à mesure de la progression de mon travail (voir section 5.7 qui suit).

---

## 5.2 Est-ce que les mastocytes des poumons induisent la réponse augmentée à l'adénosine ?

Le rôle des mastocytes dans la réponse bronchoconstrictive augmentée à l'adénosine suite à une provocation allergique a été établi par Hannon *et al.* (2001). Des évidences histologiques ont montré que l'adénosine donnée en intraveineuse à l'animal entier induit une dégranulation limitée mais significative des mastocytes des poumons associés à la réponse bronchoconstrictive. En plus les réponses à l'adénosine ont été potentialisées dans des études *ex vivo* sur les bandes de parenchyme découpées dans des poumons prélevés d'animaux AS et provoqués avec l'OA (Hannon *et al.*, 2001). Ces résultats indiquent que les mastocytes des poumons sont impliqués dans l'augmentation de la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine. Toutefois, il est possible que d'autres cellules inflammatoires, qui pénètrent rapidement dans les tissus suite à une provocation allergique identique à celle utilisée dans mes expériences (Ellis *et al.*, 2004), contribuent aussi à la réponse en étant la source de libération de la 5-HT par l'allergène (Csaba *et al.*, 2003) et/ou créant les conditions qui sensibilisent les mastocytes à l'adénosine. Pour tester cela expérimentalement, j'ai évalué l'interaction entre l'allergène et l'adénosine sous conditions entièrement *in vitro*.

L'OA induit une réponse biphasique entièrement dépendante des mastocytes sur les bandes de parenchyme prélevées sur des animaux sensibilisés et augmente fortement la réponse à l'adénosine. Comme dans les études *in vivo* et *ex vivo*, le méthysergide bloque la plupart de la réponse à l'adénosine impliquant la 5-HT. Comme les poumons sont perfusés avant de découper les bandes, les cellules présentes dans le sang comme les plaquettes ou les basophiles ne peuvent pas être les sources de la 5-HT. De plus, depuis que la provocation est effectuée *in vitro*, il n'y a plus la possibilité pour les cellules inflammatoires, attirées dans les poumons par la provocation allergique, d'être la source de la 5-HT ou simplement de jouer un

---

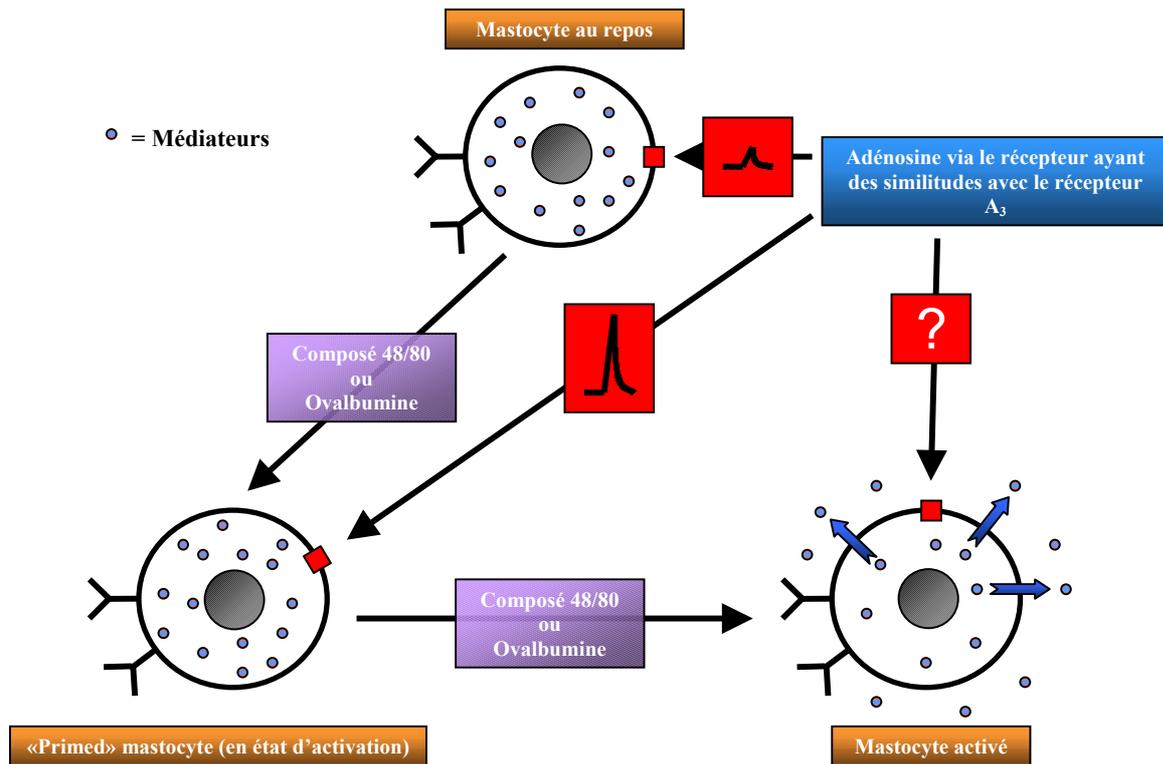
rôle dans la potentialisation de la réponse à l'adénosine. Les expériences établissent la preuve que les mastocytes des poumons sont les cellules ciblées par l'adénosine.

### **5.3 Est-ce que l'activation (ou «priming») des mastocytes est le mécanisme de la potentialisation de l'adénosine par l'allergène ?**

Le concept de «priming» des mastocytes n'est pas bien défini et le terme est utilisé de manière interchangeable avec «activation». Dans l'intérêt de cette discussion, le terme de «priming» sera utilisé pour indiquer un état de réactivité intensifié du mastocyte avec une dégranulation et une libération minimale de ses médiateurs. Cette définition est bien illustrée par l'action du facteur de croissance neuronal qui a de modestes capacités d'activation mais induit un «priming» de la réponse des mastocytes aux autres sécrétagogues (voir Shimizu et Schwartz, 1997). Le terme d'«activation» sera utilisé pour indiquer une dégranulation avec la libération de médiateurs. Ce qui est important dans cette discussion c'est le concept que des stimuli comme l'allergène, qui active le récepteur FcεRI, ou le composé 48/80 qui active G<sub>i</sub>, peuvent, selon la puissance du stimulus, induire le «priming» et/ou l'activation des mastocytes (voir Fig. 5.1).

Une autre considération importante est le fait que la dégranulation des mastocytes en réponse à l'activation par l'OA ou le composé 48/80 n'est pas du type «tout ou rien». Suite à l'activation, la majorité des mastocytes libère uniquement une partie de leur médiateurs, alors qu'une minorité de mastocytes libère tous leurs médiateurs (Galli *et al.*, 1984; Fozard *et al.*, 1996; Peters, 1997). Ainsi, même un mastocyte déjà activé a la capacité de libérer des médiateurs granulaires en réponse à un autre stimulus et une potentialisation peut alors avoir lieu.

---



**Fig. 5.1** Schéma illustrant la différence entre le «priming» et l'activation des mastocytes représentant une explication possible pour l'augmentation de la réponse à l'adénosine suite à une provocation avec l'OA ou le composé 48/80 sur les bandes de parenchyme de poumons de rats BN AS. Pour plus de détails voir le texte.

Hannon *et al.* (2001) ont suggéré qu'une activation directe des mastocytes des poumons était la base de la potentialisation de la réponse à l'adénosine induite par l'allergène. Pour vérifier ce mécanisme, j'ai étudié dans le paradigme *in vitro* l'interaction entre l'adénosine et le composé 48/80, un activateur des mastocytes très sélectif mais non-immunologique qui active directement la protéine  $G_i$  couplée au GTP (Aridor *et al.*, 1990). Les résultats ont montré que le composé 48/80 contracte la bande de parenchyme, par le biais d'un mécanisme sensible au méthysergide, et potentialise la réponse à l'adénosine qui est aussi sensible au méthysergide. Le blocage par le méthysergide indique l'implication de la 5-HT (Hannon *et al.*, 2001). Toutefois, la potentialisation de la réponse à l'adénosine ne se produit pas à cause de la libération de 5-HT induite par le composé 48/80 (ou l'OA), car si l'on applique de la 5-HT de manière exogène on n'observe aucune potentialisation de la réponse à l'adénosine. En accord

avec la sélectivité du composé 48/80 pour les mastocytes, ces résultats supportent le fait que l'activation et/ou le «priming» des mastocytes constitue le mécanisme qui induit la potentialisation de la réponse à l'adénosine.

Tandis que le dénominateur commun de la potentialisation de la réponse à l'adénosine par l'allergène et le composé 48/80 semble être l'activation ou le «priming» du mastocyte, le mécanisme qui induit tout ceci reste inconnu. La réponse augmentée à l'adénosine est sensible à la toxine pertussique (voir section 4.2.5) et de ce fait les récepteurs impliqués sont liés à une protéine  $G_i$  couplée au GTP. L'activation de la voie de signalisation de  $G_i$  résulte en une inhibition de l'adénylate cyclase et en une activation de la PLC conduisant à une augmentation du DAG et de l' $IP_3$ . Le DAG stimule la PKC et l' $IP_3$  augmente la concentration de calcium dans la cellule (Fig. 5.2). Les récepteurs couplés à  $G_i$  stimulent l'activation des MAP (mitogen activated protein) kinases par l'intermédiaire de Ras. Le composé 48/80, qui active  $G_i$  directement, recouvre la même voie de signalisation (Shefler et Sagi-Eisenberg, 2001). La voie de signalisation qui débute après l'activation du récepteur à haute affinité aux IgE, le  $Fc\epsilon RI$ , par l'OA est différente (Fig. 5.2). La stimulation de  $Fc\epsilon RI$  active les MAP kinases (MEK1/MEK2) via l'activation des tyrosines kinases, Lyn et Syk qui activent aussi la PLC, résultant en une formation de DAG et d' $IP_3$ . L'activation de la PLC active également les MAP kinases via Ras/Raf. De plus, on observe une augmentation du  $Ca^{2+}$  cytosoliques dont la majeure partie provient d'un influx de calcium extracellulaire (voir Fig. 5.2).

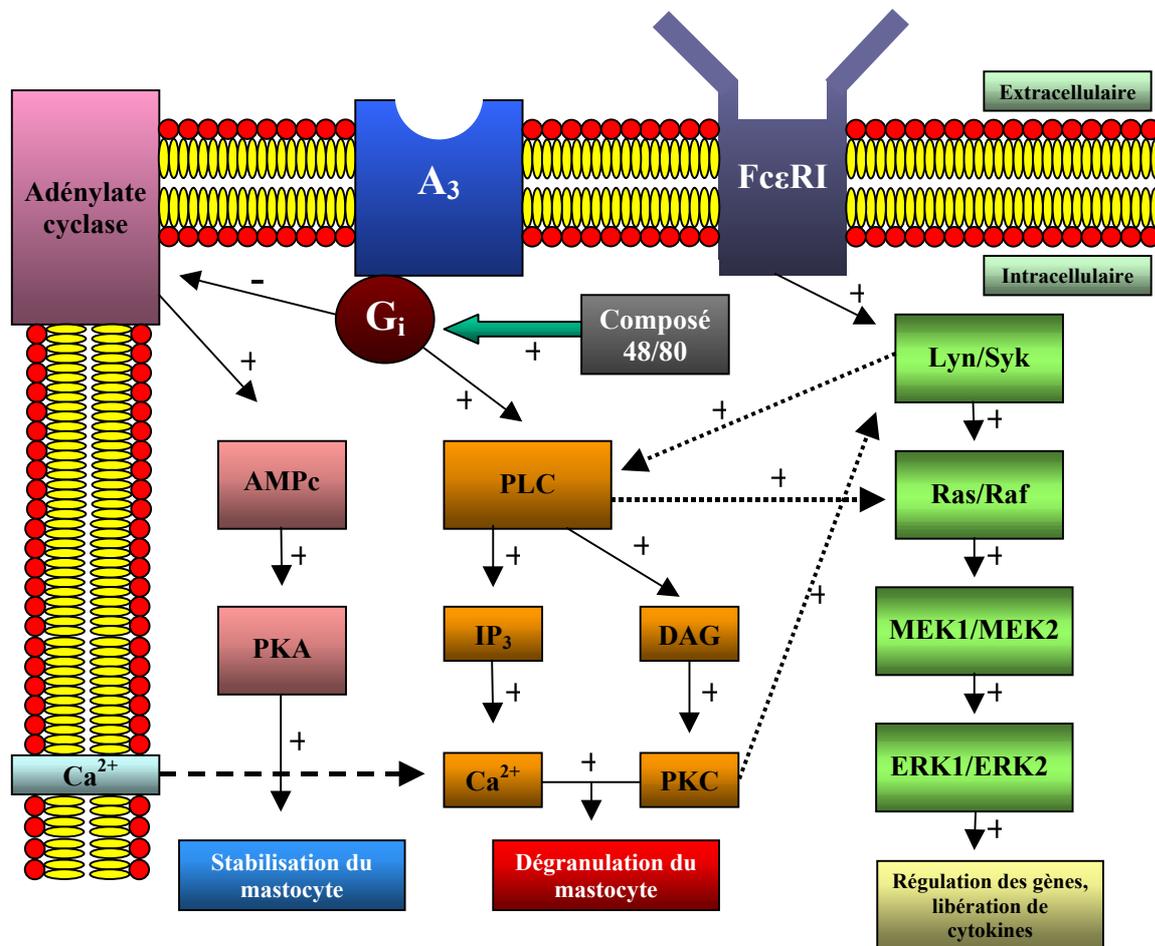
Il y a plusieurs exemples dans la littérature où l'activation par les récepteurs d'une voie de signalisation particulière résulte en une amplification dans la même cellule d'une réponse produite par un signal séparé convergeant (voir Selbie et Hill, 1998). Les différentes voies de signalisation activées par l'adénosine et l'antigène offrent la possibilité à de telles interactions synergétiques d'induire une augmentation de la réponse à l'adénosine. Avec le composé 48/80, qui agit au même niveau que l'adénosine sur la protéine  $G_i$  sensible à la toxine

---

pertussique, les voies de signalisation sont similaires (Selbie et Hill, 1998; Senyshyn *et al.*, 1998; Shefler et Sagi-Eisenberg, 2001) et la possibilité que la potentialisation reflète les interactions entre des voies de signalisation parallèles mais séparées est moins évidente. Dans ce cas, une explication possible est que le synergisme se manifeste au niveau de la sous-unité de la protéine G impliquée dans la réponse à l'adénosine et celle au composé 48/80.

Toutefois, les explications pour la potentialisation de la réponse à l'adénosine par l'allergène ou le composé 48/80 doivent prendre en compte une observation surprenante: le composé 48/80 n'est lui pas potentialisé par la provocation avec l'OA dans des expériences réalisées sous les mêmes conditions que celles où l'on observe une réponse augmentée à l'adénosine. Les résultats rappellent les observations de Hannon *et al.* (2001), qui montraient que la réponse bronchoconstrictive au composé 48/80 chez le rat AS suite à une provocation allergique était beaucoup plus faible que celle à l'adénosine. Comme nous en avons déjà discuté, après l'activation de  $G_i$ , les voies de signalisation pour l'adénosine et le composé 48/80 sont similaires. Donc, la conclusion logique est que l'effet de l'activation de FcεRI ne se manifeste pas au delà de  $G_i$  ce qui contredit la conclusion qui a été apportée respectivement après la potentialisation de l'adénosine par l'allergène. En effet, cette observation suggère que l'interaction se produit au niveau du récepteur et/ou de son couplage à  $G_i$ . Une explication toute simple serait d'imaginer une augmentation du nombre de récepteurs après une provocation allergique. Toutefois, ceci semble assez improbable car la potentialisation à l'adénosine se produit 30 min après l'administration de l'allergène sous des conditions *in vitro*. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour clarifier ces résultats inattendus.

---



**Fig. 5.2** Représentation schématique des voies de signalisations intracellulaires couplées aux récepteurs A<sub>3</sub> ou FcεRI et activées par le composé 48/80. Le récepteur A<sub>3</sub> représente le récepteur ayant des similitudes avec A<sub>3</sub> défini dans mes études et qui est aussi couplé à une protéine G<sub>i</sub>. Pour plus de détails voir le texte. (Basé sur Beaven et Ozawa, 1996; Fredholm *et al.*, 2001a; Shefler et Sagi-Eisenberg, 2001; Siraganian, 2003).

Un dernier élément intéressant de ces expériences est que contrairement à la réponse à l'OA, les réponses de la bande de parenchyme au composé 48/80 et à l'adénosine sont monophasiques. Ainsi, l'activation des mastocytes via le couplage avec G<sub>i</sub> imite la première phase de la réponse à l'OA qui est induite par la 5-HT. Toutefois, le stimulus couplé à G<sub>i</sub> ne peut apparemment pas générer de synthèse *de novo* de leucotriènes qui induisent la seconde réponse à l'OA dans cette préparation. Il y a des exemples dans la littérature de libération préférentielle de médiateurs préformés avec le composé 48/80 dans les mastocytes de rat (Hagmann *et al.*, 1992), de chien (Goetzl *et al.*, 1983) et d'homme (Benyon *et al.*, 1989). De

plus, comme expliqué dans la section 4.1.2, la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine chez les asthmatiques possède une petite composante due aux leucotriènes qui est toujours présente. D'autres études effectuées avec de plus fortes concentrations d'adénosine et de composé 48/80 seraient nécessaires pour établir si la différence entre le rat et l'asthmatique est plutôt qualitative que quantitative.

## **5.4 Est-ce que le(s) récepteur(s) induisant la réponse à l'adénosine est(sont) intracellulaire(s) ?**

Dans une première étape visant à définir le mécanisme du(es) récepteur(s) responsable(s) de la réponse contractile à l'adénosine sur la bande de parenchyme, j'ai étudié si le site d'action de l'adénosine était intracellulaire. L'approche usuelle à cette question dans la littérature se fait en utilisant un bloqueur du transport facilité de l'adénosine, comme le NBTI, afin d'empêcher l'adénosine de pénétrer à l'intérieur de la cellule (Hertz, 1991). Le NBTI potentialise la réponse à l'adénosine sans altérer la sensibilité de la 5-HT. Ceci apporte une preuve que le site d'action de l'adénosine n'est pas intracellulaire. Cette conclusion est appuyée par le fait que la réponse au NECA, un analogue de l'adénosine qui ne pénètre pas dans la cellule (Balvierzack *et al.*, 1989; Mun *et al.*, 1998) et qui imite la réponse à l'adénosine, n'est pas potentialisé par le NBTI. La conclusion basée sur ces études est que l'adénosine active un(des) récepteur(s) situé(s) dans la membrane et accessible(s) de l'extérieur de la cellule.

## **5.5 Est-ce qu'un récepteur atypique induit la réponse à l'adénosine ?**

Les récepteurs peuvent être définis pharmacologiquement en établissant l'ordre de puissance des agonistes ou des antagonistes. Les résultats d'une première série d'expériences réalisées

---

*in vivo* (études de J.P. Hannon et B. Tigani) et *in vitro* (mes résultats) ont été publiés (Publication 2) avec pour conclusion:

*“Le récepteur induisant la réponse bronchoconstrictive à l’adénosine suite à la provocation avec un allergène chez le rat BN AS ne peut être catégorisé comme l’un des quatre sous-types de récepteurs connus de l’adénosine”.*

Les bases de cette conclusion étaient que sur les séries des agonistes, uniquement l’adénosine et le NECA, qui activent les récepteurs A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub>, mais pas CPA, CGS 21680 ou 2-Cl-IB-MECA, des agonistes sélectifs pour respectivement les récepteurs A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> ou A<sub>3</sub>, ont été capables d’induire une bronchoconstriction *in vivo* et une contraction de la bande de parenchyme *in vitro*. La conclusion logique de ces résultats serait de dire que le récepteur impliqué dans la réponse à l’adénosine est le récepteur A<sub>2B</sub>. Toutefois, les études préliminaires *in vivo* et *in vitro* effectuées avec les antagonistes ne supportent pas cette conclusion. Par exemple dans mes analyses *in vitro*, la réponse à l’adénosine n’as pas pu être antagonisée par le 8-SPT ou le MRS 1754 malgré l’utilisation de concentrations supérieures à 50 fois leurs affinités pour le récepteur A<sub>2B</sub> de rat. D’autres études seraient clairement nécessaires pour clarifier la situation comme cela était suggéré dans la dernière phrase de la publication 2 :

*“Il reste un challenge pour l’avenir, définir ce récepteur (atypique) et établir si le récepteur qui induit la réponse à l’adénosine chez les asthmatiques est le même.”*

## **5.6 Démêler le mystère du récepteur atypique de l’adénosine**

En révisant les résultats apportés par cette dernière conclusion, il était frappant de constater que les concentrations de NECA et d’adénosine nécessaires pour contracter les tissus, étaient

---

très élevées en comparaison de leurs affinités pour les différents sous-types de récepteur à l'adénosine. Par exemple, nous utilisons couramment une concentration d'adénosine de 1 mM qui excède de 14000 fois la valeur du  $K_i$  pour le récepteur  $A_1$  de rat et de 150 fois la valeur du  $K_i$  pour le récepteur  $A_3$  de rat (Mueller, 2003). Dans le cas du NECA, les gammes de concentrations comprises entre 3 et 100  $\mu$ M sont respectivement supérieures de 10 à 300 fois la valeur du  $K_i$  pour le récepteur  $A_3$  et de 400 à 14000 fois la valeur du  $K_i$  pour le récepteur  $A_1$  (Fredholm *et al.*, 2001a). Sur ces bases, nous avons décidé de re-évaluer les effets du CPA et du 2-Cl-IB-MECA à de plus fortes concentrations que celles employées précédemment. Cette stratégie conduit à une étape majeure dans la compréhension des mécanismes du(es) récepteur(s) qui contribue(nt) à potentialiser la réponse à l'adénosine.

Lorsqu'il est utilisé en plus fortes concentrations, le CPA se comporte qualitativement comme l'adénosine en induisant de petites contractions de la bande de parenchyme de poumons prélevée de rats BN AS et provoqués avec le véhicule. Ces contractions sont potentialisées chez les rats provoqués avec l'OA. A cause de la sélectivité du CPA pour les récepteurs  $A_1$ , nous avons étudié les effets du DPCPX, un antagoniste sélectif du récepteur  $A_1$ , sur le CPA et l'adénosine. Les réponses des deux agonistes ont été partiellement supprimées par le DPCPX seul et totalement éliminées par une combinaison entre le DPCPX et le méthysergide, un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>2</sub>. Ceci suggère une contribution du récepteur  $A_1$  et d'un second site qui résulte de la libération de la 5-HT des mastocytes.

D'après la littérature le récepteur  $A_3$  induit la libération des médiateurs mastocytaires chez les rongeurs (Fozard *et al.*, 1996; van Schaick *et al.*, 1996; Reeves *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 2003). De ce fait on est en droit de se demander pourquoi dans ce cas l'agoniste prototype du récepteur  $A_3$ , le 2-Cl-IB-MECA n'imité pas l'adénosine et ne produit pas de contraction de la bande de parenchyme même utilisé à de fortes concentrations. L'explication est devenue évidente lorsque le 2-Cl-IB-MECA a été testé en tant qu'antagoniste de l'adénosine; le

---

composé a bloqué la composante sensible au méthysergide de la réponse à l'adénosine et la réponse résiduelle a été éliminée par le DPCPX. Les concentrations de 2-Cl-IB-MECA qui produisent un blocage soutiennent une interaction avec un récepteur  $A_3$ . Bien que la valeur rapportée du  $K_i$  est de 0.33 nM (Gao *et al.*, 2004), les concentrations requises pour activer les récepteurs  $A_3$  de rat dans des expériences fonctionnelles sont supérieures à celles-ci (Laudadio et Psarropoulou, 2004; Schneyvays *et al.*, 2004) et du même ordre que celles utilisées pour bloquer l'adénosine sur la bande de parenchyme (10-100 nM). Ainsi, le blocage par le 2-Cl-IB-MECA implique le récepteur  $A_3$  dans la composante sensible au méthysergide de la réponse à l'adénosine. Ceci est supporté par l'observation de l'inosine, un agoniste du récepteur  $A_3$  de l'adénosine, dont la réponse contractile qu'il produit sur les bandes de parenchyme des animaux AS a été substantiellement réduite par le méthysergide, 2-Cl-IB-MECA et le DSCG, un agent stabilisateur des mastocytes. La raison pour laquelle l'inosine se comporte comme un agoniste mais le 2-Cl-IB-MECA comme un antagoniste reste à définir.

A cette étape de mon projet, les résultats supportaient l'hypothèse que la réponse à l'adénosine, 1 mM, sur la bande de parenchyme des animaux AS et provoqués avec l'OA implique deux mécanismes : une composante mineure ( $\approx 20\%$ ) qui implique le récepteur  $A_1$  et une composante majeure ( $\approx 80\%$ ) qui implique un récepteur avec des similitudes pour le récepteur  $A_3$ . Les effets des antagonistes ont été évalués en accord avec ce scénario.

Six des huit antagonistes ont été utilisés à des concentrations qui sont actives pour le récepteur  $A_1$ ,  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$  mais qui n'ont pas d'effet sur le récepteur  $A_3$  (Publication 3, Table 1). Comme nous en avons déjà discuté, le blocage des récepteurs  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$  ne semble pas pouvoir affecter la réponse. Compte tenu de ces hypothèses de travail, ces composés devaient bloquer la réponse à l'adénosine mais le blocage devait se limiter à approximativement 20%. Dans les limites des erreurs expérimentales cela fut à peu près le cas. La seule exception fut la théophylline qui a produit une inhibition supérieure à 50% de la réponse à l'adénosine à une

---

concentration de 100  $\mu\text{M}$ . Comme dans ce cas, la réponse à la 5-HT a également été réduite, l'effet peut être attribué à un antagonisme physiologique résultant de l'inhibition des phosphodiésterases qui se manifeste à cette concentration (Fozard, 2003).

Deux composés qui ont une activité antagoniste pour le récepteur  $A_3$  de rat, le MRS 1523 et le MRS 1191, ont été utilisés à des concentrations respectivement 30 et 7 fois supérieures à leurs affinités pour ce récepteur (Mueller, 2003). De manière surprenante, aucun composé n'a produit de blocage de la réponse à l'adénosine. Aux concentrations utilisées, MRS 1523 et MRS 1191 ne sont pas capables de bloquer le récepteur  $A_1$  (Mueller, 2003); en conséquence un effet sur la composante  $A_1$  ne peut être attendu. L'absence de blocage ne peut être attribué au fait que la réponse à l'adénosine était supramaximale car d'après la courbe concentration-réponse un blocage d'au moins 3 fois aurait été facilement détecté. Toutefois, d'après la littérature, des concentrations similaires ou inférieures de MRS 1523 et de MRS 1191 à celles utilisées dans mes expériences ont montré une efficacité à bloquer une variété de réponses induites par le récepteur  $A_3$  de rat (Schneyvays *et al.*, 2000; Jacobson, 2001; Hentschel *et al.*, 2003).

Les résultats de cette analyse pharmacologique étendue ont apporté un nouvel aperçu du récepteur atypique qui induirait la contraction de la bande de parenchyme à l'adénosine. La réponse résulte d'une combinaison des effets de l'adénosine sur le récepteur  $A_1$  et un récepteur avec des similitudes pour le récepteur  $A_3$  mais sur lequel 2-CI-IB-MECA se comporte comme un antagoniste et MRS 1523 et MRS 1191 sont inactifs à des concentrations qui excèdent leur affinités pour le récepteur  $A_3$  de rat.

---

## 5.7 La localisation cellulaire du récepteur A<sub>1</sub> qui induit une partie de la réponse augmentée à l'adénosine sur la bande de parenchyme

Il est intéressant de spéculer sur la localisation du récepteur A<sub>1</sub> qui contribuent à la réponse contractile à l'adénosine. Comme le méthysergide ne bloque pas la composante du récepteur A<sub>1</sub> dans la réponse, il n'y a pas de doute que le récepteur A<sub>1</sub> n'est pas localisé sur le mastocyte. Dans le cochon d'Inde et le lapin, les récepteurs A<sub>1</sub> sont présent sur les muscles lisses des voies respiratoires, ce qui conduit à une bronchoconstriction quand ils sont activés (Farmer *et al.*, 1988; Ali *et al.*, 1994b; El-Hashim *et al.*, 1996; Nyce et Metzger, 1997). Ainsi, les cellules du muscle lisse bronchique sont des candidates pour la localisation du récepteur A<sub>1</sub>, bien que cela n'ait pas été établi pour le rat. Les récepteurs A<sub>1</sub> sont également localisés sur les fibres pulmonaires de type C des poumons de rats et peuvent contribuer à la réponse bronchoconstrictive. Meade *et al.* (1996) ont suggéré que l'activation du récepteur A<sub>1</sub> était capable d'induire une bronchoconstriction dans la lignée de rats de l'espèce BDE par un mécanisme qui est indépendant de l'activation des mastocytes mais peut être bloqué par une bivatogomie et par l'atropine. Ceci semble peut probable car les réponses à l'adénosine sur la bande de parenchyme n'ont pas été affectées par l'atropine utilisée à une concentration qui élimine la réponse au béthanéchol (J. Fozard, observations non publiées). Finalement dans ce contexte, le récepteur A<sub>1</sub> pourrait être présent dans les éléments vasculaires de la bande de parenchyme. L'activation des récepteurs A<sub>1</sub> induit la vasoconstriction dans le système vasculaire pulmonaire d'une variété d'espèces (Lippton *et al.*, 1992; McIntyre *et al.*, 1994; Broadley et Maddock, 1996). Il est intéressant de noter, que la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine *in vivo*, qui ne peut pas être une conséquence de la vasoconstriction pulmonaire, n'a pas de composante induite par le récepteur A<sub>1</sub> malgré une indication claire due à la

bradycardie que les récepteurs  $A_1$  sont activés par l'adénosine dans ces animaux (Hannon *et al.*, 2001; voir ci-dessous).

## **5.8 Les similarités et les différences entre la réponse contractile à l'adénosine sur la bande de parenchyme *in vitro* et la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine *in vivo***

A ce niveau je reviens sur les similarités et les différences entre les analyses *in vitro* actuelles et les résultats des analyses *in vivo* de la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine potentialisée suite à une provocation allergique chez des rats AS (Hannon *et al.*, 2001; Publication 2, voir section 5.1). Comme mentionné précédemment et contrairement à la bande de parenchyme, il n'y a pas de composante résistante au méthysergide dans la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine dans l'animal entier (Hannon *et al.*, 2001). De plus, la réponse bronchoconstrictive n'est pas affectée par le DPCPX ce qui suggère que pour la dose d'adénosine utilisée la réponse doit être entièrement induite par le récepteur qui possède des similitudes avec le récepteur  $A_3$ . Le 2-Cl-IB-MECA a une activité bronchoconstrictive minimale malgré le fait que les effets cardiovasculaires qui se manifestent aux concentrations utilisées indiquent une activité agoniste via le récepteur  $A_3$  sur les autres tissus (Hannon *et al.*, 2001). Toutefois, une différence importante est que la réponse à l'adénosine *in vivo*, qui est complètement sensible au méthysergide, est sélectivement bloquée par le 8-SPT et le CGS 15943 malgré des concentrations plasmatiques de ces antagonistes insuffisantes pour bloquer le récepteur  $A_3$  (Publication 2). Beaucoup de facteurs, incluant le métabolisme, la distribution tissulaire et la liaison aux protéines du plasma, peuvent compliquer l'interprétation des analyses pharmacodynamiques *in vivo*. C'est principalement pour cette raison que j'ai utilisé une préparation *in vitro* de bande de parenchyme pour mes études. Cependant, il y a une différence importante entre les résultats *in vivo* et *in vitro* si l'on regarde le blocage par le 8-

---

SPT et le CGS 15943 de la composante mastocytaire qui induit la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine; d'autres études seraient nécessaires pour clarifier la situation.

## **5.9 Est-ce que l'hyperréactivité bronchique à l'adénosine induite par une provocation allergique chez le rat est un bon modèle pour la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine dans l'asthme ?**

J'ai résumé dans la Table 5.1 les principales caractéristiques de la réponse à l'adénosine (ou à l'AMP) chez les asthmatiques et celles qui sont semblables dans la bronchoconstriction à l'adénosine (*in vivo*) chez le rat BN et dans la réponse contractile (*in vitro*) à l'adénosine sur la bande de parenchyme. Le lien vers l'état allergique, la dépendance mastocytaire et la manifestation d'une tachyphylaxie sont de remarquables similitudes entre la réponse clinique et celle chez le rat. Toutefois, bien que ce soient les produits dérivés de l'activation des mastocytes qui induisent la réponse bronchoconstrictive chez l'homme et chez le rat, les médiateurs ne sont pas les mêmes; l'histamine et les leucotriènes induisent la réponse chez l'homme et la 5-HT chez le rat. Mais la différence la plus importante se situe sans doute au niveau des récepteurs qui induisent la réponse. Chez l'homme c'est le récepteur  $A_{2B}$  qui est connu pour induire la réponse clinique à l'adénosine ou à l'AMP inhalé. Dans le cas de la réponse bronchoconstrictive ou contractile à l'adénosine chez le rat, le récepteur  $A_{2B}$  a été définitivement éliminé. Sur la bande de parenchyme la composante mastocytaire est induite par un récepteur ayant des caractéristiques semblables à  $A_3$ . Le récepteur qui induit la réponse bronchoconstrictive à la 5-HT *in vivo* peut être différent de celui-ci. Ces différences ne doivent pas empêcher d'utiliser le rat BN pour modéliser certains aspects de la réponse à l'adénosine dans les voies respiratoires de l'homme. Elles suggèrent toutefois, d'être prudent avec le choix des hypothèses expérimentales que l'on formule.

---

	Le rat BN <i>in vivo</i> <sup>a</sup>	Les bandes de parenchyme <i>in vitro</i> <sup>b</sup>
Un modèle de bronchoconstriction à l'adénosine dans l'asthme présente :		
• Une augmentation de la réponse associée avec une inflammation pulmonaire allergique	✓	✓
• Une dépendance mastocytaire	✓	✓
• Une médiation par l'histamine et les leucotriènes	✗	✗
• Une tachyphylaxie	✓	✓
• Un blocage sélectif par la théophylline	✓	✗
• Un blocage aigu par les glucocorticoïdes	✓	n.t.
• Une implication des récepteurs A <sub>2B</sub>	✗	✗

<sup>a</sup>Les valeurs sont tirées de Hannon *et al.*, 2001; 2002 (Publication 2); Tigani *et al.*, 2003. <sup>b</sup>Les valeurs sont tirées de Hannon *et al.*, 2001 et de cette thèse. n.t. = non testé. ✓ = présent; ✗ = absent.

**Table 5.1** Comparaison des principales caractéristiques de la bronchoconstriction induite par l'adénosine dans l'asthme avec les réponses bronchoconstrictives à l'adénosine chez le rat BN (*in vivo*) et les réponses contractiles à l'adénosine sur les bandes de parenchyme de poumons (*in vitro*).

## 5.10 Quelles études pour l'avenir ?

Comme cela a été indiqué dans la discussion précédente, il y a un grand nombre d'observations qui se sont produites durant mes expériences qui nécessiteraient des études complémentaires. Les plus importantes sont:

- Définir pharmacologiquement le récepteur ayant des similitudes avec A<sub>3</sub> et qui induit la réponse contractile à l'adénosine, dépendante des mastocytes, sur la bande de parenchyme. L'utilisation d'autres agonistes sélectifs pour le récepteur A<sub>3</sub>, surtout les dérivés du 2-Cl-IB-MECA (Klotz, 2000), pourrait clarifier pourquoi le 2-Cl-IB-MECA se comporte exclusivement comme un antagoniste. La gamme des antagonistes

du récepteur  $A_3$  pourrait être élargie pour inclure et MRS 1220 et MRS 1334 (Klotz, 2000).

- Etudier la possible différence entre l'animal entier et la bande de parenchyme, en étudiant le récepteur qui induit la composante, de la réponse bronchoconstrictive/contractile à l'adénosine, dépendante du mastocyte. Dans les études *in vivo*, le 2-CI-IB-MECA pourrait être étudié comme un antagoniste et l'inosine comme un agoniste. Les relations concentration-réponse au 8-SPT et au CGS 15943 doivent être redéfinies afin de confirmer la puissance et la sélectivité de leur blocage.
  - Identifier la localisation cellulaire du récepteur  $A_1$  qui induit une partie de la réponse sur les bandes de parenchyme. En particulier, l'hypothèse selon laquelle le récepteur est sur les éléments vasculaires devrait être vérifiée. Une approche serait d'observer la réponse à l'adénosine de la composante  $A_1$  sur la trachée où les éléments contractiles vasculaires ne peuvent contribuer à la réponse contractile.
  - Définir les messagers secondaires des voies de signalisation impliquées dans l'augmentation de la réponse de la bande de parenchyme à l'adénosine suite à une provocation allergique. En particulier, il faudrait explorer le rôle des PKC, des  $PI_3$  kinases et des protéines tyrosines kinases de la famille des src en utilisant respectivement des inhibiteurs sélectifs comme le GF109203X, la wortmannine et PP1.
  - Etudier les différences entre la potentialisation de l'adénosine et du composé 48/80 sur des tissus sensibilisés avec l'OA. En effectuant une comparaison avec d'autres activateurs directs de  $G_i$ , comme la substance P et les polyamines présentes naturellement, ce qui devrait indiquer s'il s'agit d'un phénomène spécifique au composé 48/80.
-

## SECTION 6.



## 6. Références

1. ABBRACCHIO, M.P., BURNSTOCK, G., BOEYNAEMS, J.M., BARNARD, E.A., BOYER, J.L., KENNEDY, C., MIRAS-PORTUGAL, M.T., KING, B.F., GACHET, C., JACOBSON, K.A., WEISMAN, G.A. (2005). The recently deorphanized GPR80 (GPR99) proposed to be the P2Y<sub>15</sub> receptor is not a genuine P2Y receptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, **26**, 8-9.
  2. ADAMKO, D., ODEMUYIWA, S.O.; MOQBEL, R. (2003). The eosinophil as a therapeutic target in asthma: beginning of the end, or end of the beginning ? *Curr. Opin. Pharmacol.*, **3**, 227-232.
  3. ALI, H., CUNHA-MELO, J.R., SAUL, W.F., BEAVEN, M.A. (1990). Activation of phospholipase C via adenosine receptors provides synergistic signals for secretion in antigen-stimulated RBL-2H3 cells. Evidence for a novel adenosine receptor. *J. Biol. Chem.*, **265**, 745-753.
  4. ALI, S., MUSTAFA, S.J., METZGER, W.J. (1994a). Adenosine-receptor mediated bronchoconstriction and bronchial hyperresponsiveness in an allergic rabbit model. *Am. J. Physiol.*, **266**, 271-277.
  5. ALI, S., MUSTAFA, S.J., METZGER, W.J. (1994b). Adenosine-induced bronchoconstriction and contraction of airway smooth muscle from allergic rabbits with late phase airway obstruction: evidence for an inducible A<sub>1</sub> receptor. *J. Pharm. exp. Ther.*, **268**, 1328-1334.
  6. APGAR, J.R. (1994). Polymerisation of actin in RBL-2H3 cells can be triggered through either the IgE receptor or the adenosine receptor but different signalling pathways are used. *Mol. Biol. Cell*, **5**, 312-322.
  7. ARIDOR, M., TRAUB, L.M., SAGI-EISENBERG, R. (1990). Exocytosis in mast cells by basic secretagogues: evidence for direct activation of GTP-binding proteins. *J. Cell Biol.*, **111**, 909-917.
  8. AUCHAMPACH, J.A., JIN, X., WAN, T.C., CAUGHEY, G.H., LINDEN, J. (1997). Canine mast cell adenosine receptors: cloning and expression of the A<sub>3</sub> receptor and
-

---

evidence that degranulation is mediated by the A<sub>2B</sub> receptor. *Mol. Pharmacol.*, **52**, 846-860.

9. BALWIERCZAK, J.L., KRULAN, C.M., WANG, Z.C., CHEN, J., JENG, A.Y. (1989). Effects of adenosine A<sub>2</sub> receptor agonists on nucleoside transport. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **251**, 279-287.
  10. BARALDI, P.G., CACCIARI, B., ROMAGNOLI, R., MERIGHI, S., VARANI, K., BOREA, P.A., SPALLUTO, G. (2000). A<sub>3</sub> adenosine receptor ligands: history and perspectives. *Med. Res. Rev.*, **20**, 103-128.
  11. BARNES, P.J. (2002). The role of inflammation and anti-inflammatory medication in asthma. *Resp. Med.*, **96**, 9-15.
  12. BARNES, P.J., PAUWELS, R.A. (1994). Theophylline in the management of asthma: time for reappraisal? *Eur. Resp. J.*, **7**, 579-591.
  13. BEAVEN, M.A., OZAWA, K. (1996). Role of calcium, protein kinase C and MAP kinase in the activation of mast cells. *Allergol. Intern.*, **45**, 73-84.
  14. BELVISI, M.G. (2003). Airway sensory innervation as a target for novel therapies: an outdated concept?. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **3**, 239-243.
  15. BENYON, R.C., ROBINSON, C., CHURCH, M.K. (1989). Differential release of histamine and eicosanoids from human skin mast cells activated by IgE-dependent and non-immunological stimuli. *Br.J. Pharmacol.*, **97**, 898-904.
  16. BJÖRCK, T., GUSTAFSSON, L.E., DAHLEN, S. (1992). Isolated bronchi from asthmatics are hyperresponsive to adenosine, which apparently acts indirectly by liberation of leukotrienes and histamine. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **145**, 1087-1091.
  17. BLACKBURN, M.R. (2003). Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. *Trends Pharmacol. Sci.*, **24**, 66-70.
-

- 
18. BLACKBURN, M.R., LEE, C.G., YOUNG, H.W.J., ZHU, Z., CHUNN, J.L., KANG, M.J., BANERJEE, S.K., ELIAS, J.A. (2003). Adenosine mediates IL-13-induced inflammation and remodeling in the lung and interacts in an IL-13-adenosine amplification pathway. *J. Clin. Inv.*, **112**, 332-344.
  19. BOULET, L.P., CHAKIR, J., DUBE, J., LAPRISE, C., BOUTET, M., LAVIOLETTE, M. (1998). Airway inflammation and structural changes in airway hyper-responsiveness and asthma: an overview. *Can. Resp. J.*, **5**, 16-21.
  20. BOUMA, M.G., JEUNHOMME, T.M.M. A., BOYLE, D.L., DENTENER, M.A., VOITENOK, N.N., VAN DEN WILDENBERG, F.A.J.M., BUURMAN, W.A. (1997). Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood. Involvement of adenosine A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub> receptors. *J. Immunol.*, **158**, 5400-5408.
  21. BRADLEY, M.E., KUENZLI, K.A., BUXTON, I.L. (1993). Adenosine-stimulated contraction in nonpregnant guinea pig myometrium does not involve cyclooxygenase. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **264**, 1033-1039.
  22. BROADLEY, K.J., MADDOCK, H.L. (1996). P1-purinoceptor-mediated vasodilatation and vasoconstriction in hypoxia. *J. Autonomic Pharmacol.*, **16**, 363-366.
  23. BRONNER, C., COTHENET, V., MONTE, D., JOSEPH, M., LANDRY, Y., CAPRON, A. (1990). Role of phospholipase A<sub>2</sub> and G-proteins in the IgE-dependent activation of mast cells and macrophages. *Agents Actions*, **30**, 95-97.
  24. BRUNS, R.F., LU, G.H., PUGSLEY, G.H. (1986). Characterisation of the A<sub>2</sub> adenosine receptor labelled by [<sup>3</sup>H]NECA in rat striatal membranes. *Mol. Pharmacol.*, **29**, 331-346.
  25. BUCCHIONI, E., CSOMA, Z., ALLEGRA, L., CHUNG, K.F., BARNES, P.J., KHARITONOV, S.A. (2004). Adenosine 5'-monophosphate increases levels of leukotrienes in breath condensate in asthma. *Resp. Med.*, **98**, 651-655.
-

26. BURNSTOCK, G. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell membrane receptors for drugs and hormones*. Ed(s) BOLIS, L., STRAUB, R.W., Raven Press, New York, pp. 107-118.
  27. CALHOUN, W.J., JARJOUR, N.N. (1997). Macrophages and macrophage diversity in asthma (Part 9). In: *Asthma and Rhinitis*. BUSSE, W.W. et HOLGATE, S.T., Blackwell Scientific Publications, London, UK. pp 467-473.
  28. CARRUTHERS, A.M., FOZARD, J.R. (1993). Effect of pertussis toxin treatment on the putative adenosine A<sub>3</sub> receptor-mediated hypotensive response in the rat. *Eur. J. pharmacol.*, **250**, 185-188.
  29. CHAUDARY, N., SHURALYOVA, I., LIRON, T., SWEENEY, G., COE, I.R. (2002). Transport characteristics of HL-1 cells: a new model for the study of adenosine physiology in cardiomyocytes. *Biochem. Cell Biol.*, **80**, 655-665.
  30. CHEUNG, D., SONT, J.K., STERK, P.J. (1999). Clinical Features of Bronchial Hyperresponsiveness. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **12**, 91-96.
  31. CHUNG, K.F. (1997). Other mediator receptor antagonists. *Asthma*, **2**, 1737-1754.
  32. CHURCH, M.K., HOLGATE, S.T., HUGHES, P.J. (1983). Adenosine inhibits and potentiates IgE-dependent histamine release from human basophils by an A<sub>2</sub>-receptor mediated mechanism. *Br. J. Pharmacol.*, **80**, 719-726.
  33. CLANACHAN, A.S., PARKINSON, F.E. (1990). Transport systems for adenosine in mammalian cell membranes. *Purines Cell. Signaling: Targets New Drugs*, 26-32.
  34. CLARKE, H., CUSHLEY, M.J., PERSSON, C.G., HOLGATE, S.T. (1989). The protective effects of intravenous theophylline and enprofylline against histamine- and adenosine 5'-monophosphate-provoked bronchoconstriction: implications for the mechanisms of action of xanthine derivatives in asthma. *Pulm. Pharmacol.*, **2**, 147-154.
-

- 
35. COCKCROFT, D.W. (1997). Airway responsiveness. In: *Asthma*. Ed(s) BARNES, P.J., GRUNSTEIN, M.M., LEFF, A.R., WOOLCOCK, A.J., Lippencourt-Raven, pp. 1253-1266.
  36. COLASURDO, G.N., LARSEN, G.L. (1995). Airway hyperresponsiveness. In: *Asthma and rhinitis*. Ed(s) BUSSE, W.W., HOLGATE, S.T., Blackwell Scientific Publications, London, UK., pp. 1044-1056.
  37. COLLIS, M.G., HOURANI, S.M. (1993). Adenosine receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.*, **14**, 360-366.
  38. CORRIGAN C.J., KAY, A.B. (1997). T-lymphocytes in asthma pathogenesis. In: *Asthma*. Ed(s) BARNES, P.J., GRUNSTEIN, M.M., LEFF, A.R., WOOLCOCK, A.J., Lippencourt-Raven, pp. 433-451.
  39. COULSON, F.R., FRYER, A.D. (2003). Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol. Ther.*, **98**, 59-69.
  40. CRIMI, N., PALERMO, F., OLIVERI, R., MACCARRONE, C., PALERMO, B., VANCHERI, C., POLOSA, R., MISTRETTA, A. (1988). Enhancing effect of dipyridamole inhalation on adenosine-induced bronchospasm in asthmatic patients. *Allergy*, **43**, 179-183.
  41. CRIMI, N., PALERMO, F., POLOSA, R., OLIVERI, R., MACCARRONE, C., PALERMO, B., MISTRETTA, A. (1989). Effect of indomethacin on adenosine-induced bronchoconstriction. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **83**, 921-925.
  42. CRONSTEIN, B.N. (1994). Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J. appl. Physiol.*, **76**, 5-13.
  43. CRONSTEIN, B.N., DAGUMA, L., NICHOLS, D., HUTCHISON, A.J., WILLIAMS, M. (1990). The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> receptors that promote chemotaxis and inhibit O<sub>2</sub> generation, respectively. *J. Clin. Invest.*, **85**, 1150-1157.
-

- 
44. CRONSTEIN, B.N., LEVIN, R.I., PHILLIPS, M., HIRSCHHORN, R., ABRAMSON, S.B., WEISSMAN, G. (1992). Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A<sub>1</sub> receptors and inhibited via adenosine A<sub>2</sub> receptors. *J. Immunol.*, **148**, 2201-2206.
  45. CSABA, G., KOVACS, P., PALLINGER, E. (2003). Gender differences in the histamine and serotonin content of blood, peritoneal and thymic cells: A comparison with mast cells. *Cell Biol. Intern.*, **27**, 387-389.
  46. CUSHLEY M.J., WEE L.H., HOLGATE S.T. (1986). The effect of inhaled 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) on airway calibre in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **22**, 487-490.
  47. CUSHLEY, M.J., TATTERSFIELD, A.E., HOLGATE, S.T. (1983). Inhaled adenosine and guanosine on airway resistance in normal and asthmatic subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **15**, 161-165.
  48. CUSHLEY, M.J., TATTERSFIELD, A.E., HOLGATE, S.T. (1984). Adenosine-induced bronchoconstriction in asthma. Antagonism by inhaled theophylline. *Am. Rev. Res. Dis.*, **129**, 380-384.
  49. DALY, J. W., BUTTS-LAMB, P., PADGETT, W. (1983). Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cell Mol. Neurobiol.*, **3**, 69-80.
  50. DE MEER, G., HEEDERIK, D., POSTMA, D. (2002). Bronchial responsiveness to adenosine-50-monophosphate (AMP) and methacholine differ in their relationship with airway allergy and baseline FEV<sub>1</sub>. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **165**, 327-331.
  51. DIXON, A.K., GUBITZ, A.K., SIRINATHSINGHJI, D.J.S., RICHARDSON, P.J. FREEMAN, T.C. (1996). Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **118**, 1461-1468.
-

- 
52. DRESHAJ, I.A., MARTIN, R.J., MILLER, M.J., HAXHIU, M.A. (1994). Responses of lung parenchyma and airways to tachykinin peptides in piglets. *J. appl Physiol.*, **77**, 147-151.
  53. DURHAM, S. R. (1990). Late asthmatic responses. *Resp. Med.*, **84**, 263-268.
  54. EL-HASHIM, A., D'AGOSTINO, B., MATERA, M.G., PAGE, C. (1996). Characterisation of adenosine receptors involved in adenosine-induced bronchoconstriction in allergic rabbits. *Br. J. Pharmacol.*, **119**, 1262-1268.
  55. ELLIS K.M., CANNET C., MAZZONI L., FOZARD J.R. (2004). Airway hyperresponsiveness to bradykinin induced by allergen challenge in actively sensitised Brown Norway rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **369**, 166-178.
  56. ELLIS, K.M., FOZARD, J.R. (2002). Species differences in bradykinin receptor-mediated responses of the airways. *Autonomic Autacoid Pharmacol.*, **22**, 3-16.
  57. ELWOOD, W., LÖTVAL, J.O., BARNES, P.J., FAN CHUNG, K. (1992). Effect of dexamethasone and cyclosporin A on allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammatory cell responses in sensitised Brown Norway rats. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **145**, 1289-1294.
  58. ELWOOD, W., SAKAMOTO, T., BARNES, P.J., FAN CHUNG, K. (1993). Allergen-induced airway hyperresponsiveness in Brown Norway rat: role of parasympathetic mechanisms. *J. appl. Physiol.*, **75**, 279-284.
  59. EVONIUK, G., VON BORSTEL, R.W., WURTMAN, R.J. (1987). Antagonism of the cardiovascular effects of adenosine by caffeine or 8-(p-sulfophenyl)theophylline. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **240**, 428-432.
  60. EZEAMUZIE, C.I. PHILIPS, E. (2003). Positive coupling of atypical adenosine A<sub>3</sub> receptors on human eosinophils to adenylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **300**, 712-718.
-

61. EZEAMUZIE, C.I., PHILIPS, E. (1999). Adenosine A<sub>3</sub> receptors on human eosinophils mediate inhibition of degranulation and superoxide anion release. *Br. J. Pharmacol.*, **127**, 188-194.
  62. FALLENI, A., TRINCAVELLI, M.L., MACCHIA, M., SALVETTI, F., HAMDAN, M., CALVANI, F., GREMIGNI, V., LUCACCHINI, A., MARTINI, C. (1999). A<sub>(1)</sub> adenosine receptors in human neutrophils: direct binding and electron microscope visualization. *J. Cell. Biochem.*, **75**, 235-244.
  63. FARMER, S.G., CANNING, B.J., WILKINS, D.E. (1988). Adenosine receptor-mediated contraction and relaxation of guinea-pig isolated tracheal smooth muscle: effects of adenosine antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, **95**, 371-378.
  64. FEOKTISTOV, I., BIAGGIONI, I. (1996). Role of adenosine in asthma. *Drug Dev. Res.*, **39**, 333-336.
  65. FEOKTISTOV, I., BIAGGIONI, I. (1997). Adenosine A<sub>2B</sub> receptors. *Pharmacol. Rev.*, **49**, 381-402.
  66. FEOKTISTOV, I., BIAGGIONI, I. (1998) Pharmacological characterization of adenosine A<sub>2B</sub> receptors. Studies in human mast cells co-expressing A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> adenosine receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 627-633.
  67. FEOKTISTOV, I., GARLAND, E.M., GOLDSTEIN, A.E., ZENG, D., BELARDINELLI, L., WELLS, J.N., BIAGGIONI, I. (2001). Inhibition of human mast cell activation with the novel selective adenosine A<sub>(2B)</sub> receptor antagonist 3-isobutyl-8-pyrrolidinoxanthine (IPDX)(2). *Biochem. Pharmacol.*, **62**, 1163-1173.
  68. FEOKTISTOV, I., GOLDSTEIN, A.E., BIAGGIONI, I. (1999). Role of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase kinase in adenosine A<sub>2B</sub> receptor-mediated interleukin-8 production in human mast cells. *Mol. Pharmacol.*, **55**, 726-734.
-

- 
69. FEOKTISTOV, I., POLOSA, R., HOLGATE, S.T., BIAGGIONI, I. (1998). Adenosine A<sub>2B</sub> receptors: a novel therapeutic target in asthma? *Trends Pharmacol. Sci.*, **19**, 148–153.
  70. FERJAN, I., CARMAN-KRZAN, M., ERJAVEC, F. (1997). Comparison of histamine and serotonin release from rat peritoneal mast cells induced by nerve growth factor and compound 48/80. *Inflamm. Res.*, **46**, 23–24.
  71. FINNERTY, J.P., HOLGATE, S.T. (1990). Evidence for the roles of histamine and prostaglandins as mediators in exercise-induced asthma: the inhibitory effect of terfenadine and flurbiprofen alone and in combination. *Eur. Resp. J.*, **3**, 540-547.
  72. FITZGERALD, G.A. (1987). Dipyridamole. *N. Engl. J. Med.*, **316**, 1247-1257.
  73. FORSYTHE, P., ENNIS, M. (1999). Adenosine, mast cells and asthma. *Inflamm. Res.*, **48**, 301-307.
  74. FOZARD, J.R. (2003). The case for a role for adenosine in asthma: almost convincing? *Curr. Opin. Pharmacol.*, **3**, 264-269.
  75. FOZARD, J.R., HANNON, J.P. (1999). Adenosine receptor ligands: potential as therapeutic agents in asthma and COPD. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **12**, 111-114.
  76. FOZARD, J.R., HANNON, J.P. (2000). Species differences in adenosine receptor-mediated bronchoconstriction responses. *Clin. exp. Allergy*, **30**, 1213-1220.
  77. FOZARD, J.R., McCARTHY, C. (2002). Adenosine receptor ligands as potential therapeutics in asthma. *Curr. Opin. Inv. Drugs*, **3**, 69-77.
  78. FOZARD, J.R., PFANNKUCHE, H.J., SCHUURMANN, H.J. (1996). Mast cell degranulation following adenosine A<sub>3</sub> receptor activation in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **298**, 293-297.
-

- 
79. FOZARD, J.R., TIGANI, B., WOLBER, C., WILLIAMS, I., MAZZONI, L., HANNON, J.P. (2003). Modeling the response of the asthmatic airways to adenosine: Mechanisms and receptors. *Drug Dev. Res.*, **59**, 23-29.
  80. FREDHOLM, B.B., HALLDNER, L., JOHANSSON, C., SCHULTE, G., LOEVDAHL, C., THOREN, P., DUNWIDDIE, T.V., MASINO, S.A., POELCHEN, W., DIAO, L., ILLES, P., ZAHNISER, N.R., VALEN, G., TOKUNO, S., SOMMERSCHILD, H., GIMENEZ-LLORT, L., FERNANDEZ-TERUEL, A., ESCORIHUELA, R.M., WIESENFELD-HALLIN, Z., XU, X.J., HARDEMARK, A., HERLENIUS, E., PEKKNY, M., GEBRE-MEDHIN, S., BROWN, R., OLLERSTAM, A., PERSSON, A., ERIK G., SKOTT, O., JOHANSSON, B. (2003). Consequences of eliminating adenosine A<sub>1</sub> receptors in mice. *Drug Dev. Res.*, **58**, 350-353.
  81. FREDHOLM, B.B., IJZERMAN, A.P., JACOBSON, K.A., KLOTZ, K.N., LINDEN, J. (2001a). International Union of Pharmacology XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.*, **53**, 527-552.
  82. FREDHOLM, B.B., IRENIUS, E., KULL, B., SCHULTE, J. (2001b). Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol.*, **6**, 443-448.
  83. FREDHOLM, B.B., ZHANG, Y., VAN DER PLOEG, I. (1996). Adenosine A<sub>2A</sub> receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **354**, 262-267.
  84. FURCHGOTT, R.F. (1972). The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). *An evaluation from the stand point of receptor theory*. In: Blaschko, H., Muscholl, E. (Eds.), Catecholamines. Springer, Heidelberg, pp. 283– 335.
  85. GALLI S.J., DVORAK, A.M., DVORAK, H.F. (1984). Basophils and mast cells: morphologic insights into their biology, secretory patterns, and function. *Prog. Allergy*, **34**, 1-141.
-

- 
86. GAO, Z., LI, B.S., DAY, Y.J., LINDEN, J. (2001). A<sub>3</sub> adenosine receptor activation triggers phosphorylation of protein kinase B and protects rat basophilic leukemia 2H3 mast cells from apoptosis. *Mol. Pharmacol.*, **59**, 76-82.
  87. GAO, Z.G., JEONG, L.S., MOON, H.R., KIM, H.O., CHOI, W.J., SHIN, D.H., ELHALEM, E., COMIN, M.J., MELMAN, N., MAMEDOVA, L., GROSS, A.S., RODRIGUEZ, J.B., JACOBSON, K.A. (2004). Structural determinants of efficacy at A<sub>3</sub> adenosine receptors: modification of the ribose moiety. *Biochem. Pharmacol.*, **67**, 893-901.
  88. GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. (2002) Global Strategy for Asthma Management and Prevention. *NIH Publication* No 02-3659.
  89. GOETZL, E.J., PHILLIPS, M.J., GOLD, W.M. (1983). Stimulus specificity of the generation of leukotrienes by dog mastocytoma cells. *J. exp. Med.*, **158**, 731-737.
  90. GOLDIE, R.G., PATERSON, J.W., WALE, J.L. (1982). Pharmacological responses of human and porcine lung parenchyma, bronchus and pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.*, **76**, 515-521.
  91. GRISHAM, M.B., HERNANDEZ, L.A., GRANGER, D.N. (1989). Adenosine inhibits ischaemia-reperfusion-induced leukocyte adherence and extravasation. *Am. J. Physiol.*, **257**, 1334-1339.
  92. HACZKU, A., MACARY, P., HADDAD, E.B., HUANG, T.J., KEMENY, D.M., MOQBEL, R., FAN CHUNG, K. (1996). Expression of Th-2 cytokines interleukin-4 and -5 and of Th-1 cytokine interferon-gamma in ovalbumin-exposed sensitised Brown-Norway rats. *Immunology*, **88**, 247-251.
  93. HACZKU, A., MACARY, P., HUANG, T.J., TSUKAGOSHI, H., BARNES, P.J., KAY, A.B., KEMENY, M., FAN CHUNG, K., MOQBEL, R. (1997). Adoptive transfer of allergen-specific CD4<sup>+</sup> T-cells induces airway inflammation and hyperresponsiveness in Brown Norway rats. *Immunology*, **91**, 176-185.
-

94. HAGMANN, W., HACKER, H.J., BUCHHOLZ, U. (1992). Resident mast cells are the main initiators of anaphylactic leukotriene production in the liver. *Hepatology*, **16**, 1477-1484.
  95. HANNON, J.P., TIGANI, B., WOLBER, C., WILLIAMS, I., MAZZONI, L., HOWES, C., FOZARD, J.R. (2002). Evidence of an atypical receptor mediating the augmented bronchoconstrictor response to adenosine induced by allergen challenge in actively sensitised Brown Norway rats. *Br. J. Pharmacol.*, **135**, 685-696.
  96. HANNON, J.P., BRAY-FRENCH, K.M., PHILLIPS, R.M., FOZARD, J.R. (1998). Further pharmacological characterisation of the adenosine receptor subtype mediating inhibition of oxidative burst in isolated human neutrophils. *Drug Dev. Res.*, **43**, 214-224.
  97. HANNON, J.P., PFANNKUCHE, H.J., FOZARD, J.R. (1995). A role for mast cells in adenosine A<sub>3</sub> receptor-mediated hypotension in the anaesthetised rat. *Br. J. Pharmacol.*, **115**, 945-952.
  98. HANNON, J.P., TIGANI, B., WILLIAMS, I., MAZZONI, L., FOZARD, J.R. (2001). Mechanism of airway hyperresponsiveness to adenosine induced by allergen challenge in actively sensitised Brown Norway rats. *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 1509-1523.
  99. HARGREAVES, M.B., STOGGALL, S.M., COLLIS, M.G. (1991). Evidence that the adenosine receptor mediating relaxation in dog lateral saphenous vein and guinea pig aorta is of the A<sub>2B</sub> subtype. *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 198.
  100. HENTSCHEL, S., LEWERENZ, A., NIEBER, K. (2003). Activation of A<sub>3</sub> receptors by endogenous adenosine inhibits synaptic transmission during hypoxia in rat cortical neurones. *Res. Neurol. Neurosci.*, **21**, 55-63.
  101. HERTZ, L. (1991). Active transport of adenosine into primary cultures of brain cells and its methodological consequences. *Adv. exp. Med. Biol.*, **309**, 399-402.
-

- 
102. HOLGATE, S.T. (2002). Airway inflammation and remodeling in asthma: current concepts. *Mol. Biotech.*, **22**, 179-189.
  103. HUGHES, P.J., HOLGATE, S.T., CHURCH, M.K. (1984). Adenosine inhibits and potentiates IgE-dependent histamine release from human lung mast cells by an A<sub>2</sub>-purinoceptor mediated mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 3847-3852.
  104. IKAWATI, Z., HAYASHI, M., NOSE, M., MAEYAMA, K. (2000). The lack of compound 48/80-induced contraction in isolated trachea of mast cell deficient Ws/Ws rats *in vitro*: the role of connective tissue mast cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **402**, 297-306.
  105. INBE, H., WATANABE, S., MIYAWAKI, M., TANABE, E., ENCINAS, J.A. (2004). Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y<sub>15</sub>, for AMP and adenosine. *J. Biol. Chem.*, **279**, 19790-19799.
  106. JACOBSON, K.A. (2001). Probing adenosine and P2 receptors: Design of novel purines and nonpurines as selective ligands. *Drug. Dev. Res.*, **52**, 178-186.
  107. JACOBSON, K.A., IJZERMAN, A.P., LINDEN, J. (1999). 1,3-Dialkylxanthine derivative having high potency as antagonists at human A<sub>2B</sub> adenosine receptors. *Drug. Dev. Res.*, **47**, 45-53.
  108. JACOBSON, K.A., KIM, H.O., SIDDIQI, S.M., OLAH, M.E., STILES, G.L., VON LUBITZ, D.K.G.E. (1995). A<sub>3</sub>-Adenosine receptors: design of selective ligands and therapeutic prospects. *Drugs of the Future*, **20**, 689-699.
  109. JACOBSON, K.A., UKUENA, D., KIRK, K.L., DALEY, J.W. (1986). [<sup>3</sup>H]xanthine amine congener of 1,3-dipropyl-8-phnylxanthine: an antagonist radioligand for adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4089-4093.
  110. JAMES, A.L., PARE, P.D., HOGG, J.C. (1989). The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **139**, 242-246.
-

111. JARVIS, M.F., SCHULTZ, R., HUTCHISON, A.J., HOI-DU, U., SILLS, M.A., WILLIAMS, M. (1989). [<sup>3</sup>H]CGS 21680, a selective A<sub>2</sub> adenosine receptor agonist directly labels A<sub>2</sub> receptors in rat brain. *J. Pharm. exp. Ther.*, **251**, 888-893.
112. JARVIS, M.F., WILLIAMS, M. (1989). Direct autoradiographic localization of adenosine A<sub>2</sub> receptors in the rat brain using the A<sub>2</sub>-selective agonist, [<sup>3</sup>H]CGS 21680. *Eur. J. Pharmacol.*, **168**, 243-6.
113. JARVIS, M.F., WILLIAMS, M., DO, U.H., SILLS, M.A. (1991). Characterization of the binding of a novel nonxanthine adenosine antagonist radioligand, [<sup>3</sup>H]CGS 15943, to multiple affinity states of the adenosine A<sub>1</sub> receptor in the rat cortex. *Mol. Pharmacol.*, **39**, 49-54.
114. JI, X.D., VON LUBITZ, D., OLAH, M.E., STILES, G.L., JACOBSON, K.A. (1994). Species differences in ligand affinity at central A<sub>3</sub>-adenosine receptors. *Drug Dev. Res.*, **33**, 51– 59.
115. JIN, X., SHEPHERD, R.K., DULING, B.R., LINDEN, J. (1997). Inosine binds to A<sub>3</sub> adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J. Clin. Invest.*, **100**, 2849-2857.
116. JOOS, G.F., LEFEBVRE, R.A., BULLOCK, G.R., PAUWELS, R.A. (1997). Role of 5-hydroxytryptamine and mast cells in the tachykinin-induced contraction of rat trachea *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.*, **338**, 259-268.
117. JOOS, G.F., O'CONNOR, B., ANDERSON, S.D., CHUNG, F., COCKCROFT, D.W., DAHLEN, B., DIMARIA, G., FORESI, A., HARGREAVE, F.E., HOLGATE, S.T., INMAN, M., LOTVALL, J., MAGNUSSEN, H., POLOSA, R., POSTMA, D.S., RIEDLER, J. (2003). Indirect airway challenges. *Eur. Res. J.*, **21**, 1050-68.
-

118. KANBE, N., KUROSAWA, M., NAGATA, H., YAMASHITA, T., KURIMOTO, F., MIYACHI, Y. (2000). Production of fibrogenic cytokines by cord blood-derived cultured human mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 85-90.
119. KAY, A.B. (2003). Immunomodulation in asthma: mechanisms and possible pitfalls. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **3**, 220-226.
120. KIM, H.O., JI, X.-D., SIDDIQI, S.M., OLAH, M.E., STILES, G.L., JACOBSON, K.A. (1994). 2-Substitution of N6-benzyladenosine-5'-uronamides enhances selectivity for A<sub>3</sub> adenosine receptors. *J. Med. Chem.*, **37**, 3614-3621.
121. KIM, Y.C., DE ZWART, M., CHANG, L., MORO, S., VON FRIJTAG DRABBE KUENZEL, J.K., MELMAN, N., IJZERMAN, A.P., JACOBSON K.A. (1998). Derivatives of the triazoloquinazoline adenosine antagonist having high potency at the human A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub> receptor subtypes. *J. Med. Chem.*, **41**, 2835-2845.
122. KIM, Y.C., JI, X.D., MELMAN, N., LINDEN, J. JACOBSON, K.A. (2000). Anilide derivatives of an 8-phenylxanthine carboxylic congener are highly potent and selective antagonists at human A<sub>2B</sub> adenosine receptors. *J. Med. Chem.*, **43**, 1165-1172.
123. KIM, Y.H., KIM, C.H., KIM, M.S. (2001). Differential modulation of exogenous and endogenous adenosine-induced coronary vasodilation by dipyridamole. *Kor. J. Physiol. Pharmacol.*, **5**, 423-431.
124. KIERSCHENBAUM, A.S., HETTINGER, B., DAY, Y.J., GIFILIAN, A.M., METCALFE, D.D., KIM, Y.C., LINDEN, J, JACOBSON, K.A. (2001). MRS 1754, a selective A<sub>2B</sub> adenosine receptor antagonist, inhibits degranulation of cultured human but not murine mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **107**, 281.
125. KLOTZ, K.N. (2000). Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **362**, 382-391.
-

- 
126. KOHNO, Y., JI, X.D., MAWHORTER, S.D., KOSHIBA, M., JACOBSON, K.A. (1996). Activation of A<sub>3</sub> adenosine receptors on human eosinophils elevates intracellular calcium. *Blood*, **9**, 3569-3574.
127. KONNARIS, K., LLOYD, H.E., TEMPLE, D.M. (1996). Release of adenosine from human sensitized lung fragments and its effect on antigen-induced mediator release. *Pulm. Pharmacol.*, **9**, 141-148.
128. KOSHIBA, M., ROSIN D.L., HAYASHI N., LINDEN J., SITKOVSKY M.V. (1999). Patterns of A<sub>2A</sub> extracellular adenosine receptor expression in different functional subsets of human peripheral T cells. Flow cytometry studies with anti-A<sub>2A</sub> receptor monoclonal antibodies. *Mol. Pharmacol.*, **55**, 614-624.
129. KULL, B., ARSLAN, G., NILSSON, C, OWMAN, C, LORENZEN, A, SCHWABE, U., FREDHOLM, B.B. (1999). Differences in the order of potency for agonists but not antagonists at human and rat adenosine A<sub>2A</sub> receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 65-75.
130. LAFFARGUE, M., CALVEZ, R., FINAN, P., TRIFILIEFF, A., BARBIER, M., ALTRUDA, F., HIRSCH, E., WYMANN, M.P. (2002). Phosphoinositide-3-kinase is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity*, **16**, 441- 451.
131. LAUDADIO, M.A., PSARROPOULOU, C. (2004) The A<sub>3</sub> adenosine receptor agonist 2-Cl-IB-MECA facilitates epileptiform discharges in the CA3 area of immature rat hippocampal slices. *Epilepsy Res.*, **59**, 83-94.
132. LECKIE, M.J., KHAN, J., O'CONNOR, B.J., HANSEL, T.T., CHUNG, K.F., BARNES, P.J., TEN BRINKE, A., DIAMANT, Z., STERK, P.J., WALLS, C.M., MATHUR, A.K., COWLEY, H.C., DJUKANOVIC, R., HOLGATE, S.T. (2000). Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*, **356**, 2144-2148.
133. LECKIE, M.J., WALKER, C. (2001). Interleukin-5 antagonism. *Prog. Resp. Res.*, **31**, 265-268.
-

- 
134. LEDENT, C., VAUGEOIS, J.M., SCHIFFMANN, S.N., PEDRAZZINI, T., EL-YACOUBI, M., VANDERHAEGHEN, J.J., COSTENTIN, J., HEATH, J.K., VASSART, G., PARMENTIER, M. (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A<sub>2A</sub> receptor. *Nature*, **388**, 674-678.
135. LIM, K.G., WELLER, P.F. (1997). Lymphokines. *Asthma*, **1**, 663-672.
136. LINDEN, J. (1994). Cloned adenosine A<sub>3</sub> receptors: pharmacological properties, species differences and receptor function. *Trends Pharmacol. Sci.*, **15**, 298-306.
137. LIPPTON, H.L., HAO, Q., HAUTH, T., HYMAN, A. (1992). Mechanisms of signal transduction for adenosine and ATP in pulmonary vascular bed. *Am. J. Physiol.*, **262**, 926-929.
138. LONDOS, C., COOPER, D.M., WOLFF, J. (1980). Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 2551-2554.
139. LORENZEN, A., SCHWABE, U. (2001). P1 receptors. In: *Handbok of Experimental Pharmacology* vol. 151. ABBRACCHIO, M.P., WILLIAMS, M. (eds). Springer, Heidelberg, pp. 19-44.
140. MACCHIA, M., SALVETTI, F., BERTINI, S., DI BUSSOLO, V., GATTUSO, L., GESI, M., HAMDAN, M., KLOTZ, K.N., LARAGIONE, T., LUCACCHINI, A., MINUTOLO, F., NENCETTI, S., PAPI, C., TUSCANO, D., MARTINI, C. (2001). 7-Nitrobenzofurazan (NBD) derivatives of 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) as new fluorescent probes for human A<sub>(3)</sub> adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 3023-3026.
141. MANN, J.S., CUSHLEY, M.J., HOLGATE, S.T. (1985). Adenosine-induced bronchoconstriction in asthma: role of parasympathetic stimulation and adrenergic inhibition. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **132**, 1-6.
-

142. MANN, J.S., HOLGATE S.T. (1985). Specific antagonism of adenosine-induced bronchoconstriction in asthma by oral theophylline. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **19**, 685-692.
  
  143. MARQUARDT, D.L., PARKER, C.W., SULLIVAN, T.J. (1978). Potentiation of mast cell mediator release by adenosine. *J. Immunol.*, **12**, 872-878.
  
  144. MARQUARDT, D.L., WALKER, L.L. (1988). Alteration of mast cell responsiveness to adenosine by pertussis toxin. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 4019-4025.
  
  145. MARQUARDT, D.L., WALKER, L.L. (1990). Modulation of mast cell responses to adenosine by agents that alter protein kinase C activity. *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 1929-1934.
  
  146. MARQUARDT, D.L., WALKER, L.L., HEINEMANN, S. (1994). Cloning of two adenosine receptor subtypes from mouse bone marrow derived mast cells. *J. Immunol.*, **152**, 4508-4515.
  
  147. MARTIN, P.L. (1992). Relative agonist potencies of C2-substituted analogues of adenosine: evidence of adenosine A<sub>2B</sub> receptors in guinea pig aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, **216**, 235-242.
  
  148. MAZINGUE, C., DESSAINT, J.P., CAPRON, A. (1978). [<sup>3</sup>H]-serotonin release: an improved method to measure mast cell degranulation. *J. Immunol. Meth.*, **21**, 65-77.
  
  149. McINTYRE, R.C., BANERJEE, A., BENSARD, D.D., BREW, E.C., HAHN, A.R., FULLERTON, D.A. (1994). Adenosine A<sub>1</sub>-receptor mechanisms antagonize beta-adrenergic pulmonary vasodilation in hypoxia. *Am. J. Physiol.*, **267**, 2179-2185.
  
  150. MEADE, C.J., DUMONT, I., WORRALL, L. (2001). Why do asthmatic subjects respond so strongly to inhaled adenosine? *Life Sci.*, **69**, 1225-1240.
-

- 
151. MEADE, C.J., MIERAU, J., INDEPENDENCIA, L., ENSINGER, H. A. (1996). *In vivo* role of the adenosine A<sub>3</sub> receptor: N<sup>6</sup>-2-(4-aminophenyl)ethyladenosine induces bronchospasm in BDE rats by a neurally mediated mechanism involving cells resembling mast cells. *J. Pharm. exp. Ther.*, **297**, 1148-1156.
  152. MOUSLI, M., BUEB, J.L., BRONNER, C., ROUOT, B., LANDRY, Y. (1990). G proteinactivation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 358– 362.
  153. MUELLER C. (2003) Medicinal chemistry of adenosine A<sub>3</sub> receptor ligands. *Curr. Topics Med. Chem.*, **3**, 445-462.
  154. MUN, E.C., TALLY, K.J., MATTHEWS, J.B. (1998). Characterisation and regulation of adenosine transport in T84 intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **274**, 261-269.
  155. MUNDELL, S.J., KELLY, E. (1998). Evidence for co-expression and desensitization of A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> adenosine receptors in NG108-15 cells. *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 595-603.
  156. MUNRO, R., RESSNER, R., STONE, M., GESSNER, G., JARVIS, M.F., SALTZMAN, A. (1998). Differential expression of adenosine A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> receptor subtypes on myeloid U937 and THP-1 cells: adenosine A<sub>2B</sub> receptor activation selectively stimulates cAMP formation and inhibition of TNF- $\alpha$  release in THP-1 cells. *Drug Dev. Res.*, **44**, 41-47.
  157. NURNBERG, B. (2000). Pertussis toxin as a pharmacological tool. *Handbook exp. Pharmacol.*, **145**, 187-206.
  158. NYCE, J.W., METZGER, W.J. (1997). DNA antisense therapy for asthma in an animal model. *Nature*, **385**, 721-725.
  159. O'CONNOR, B.J., CROWTHER, S.D., COSTELLO, J.F., MORLEY, J. (1999). Selective airway responsiveness in asthma. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**, 9-11.
-

160. OHTA, A., SITKOVSKY, M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, **414**, 916-920.
  161. OKAYAMA, Y., CHURCH, M.K. (1992). Comparison of the modulatory effect of ketotifen, sodium cromoglycate, procaterol and salbutamol in human skin, lung and tonsil mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **97**, 216-25.
  162. OLSSON, R.A., PEARSON, J.D. (1990). Cardiovascular purinoceptors. *Physiol. Rev.*, **70**, 761-845.
  163. OOSTERHOFF, Y., DE JONG, J.W., JANSEN, A.M., KOETER, G.H., POSTMA, D.S. (1993). Airway responsiveness to adenosine 5'-monophosphate in chronic obstructive pulmonary disease is determined by smoking. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **147**, 553-558.
  164. PALMER, T.M., STILES, G.L. (1997). Identification of an A<sub>2A</sub> adenosine receptor domain specifically responsible for mediating short-term desensitization. *Biochem.*, **36**, 832-838.
  165. PAUWELS, R., (1997). Bronchial hyperresponsiveness. In: *Allergy and Allergic Diseases*. Ed. KAY, A. B., Blackwell Scientific, Oxford, UK., pp. 682-691.
  166. PAUWELS, R., BAZIN, H., PLATTEAU, B., VAN DER STRAETEN, M. (1979). The influence of antigen dose on IgE production in different rat strains. *Immunol.*, **36**, 151-157.
  167. PAUWELS, R., JOOS, G., KIPS, J., VAN DER STRAETEN, M. (1989). Interactions between neurotransmitters and inflammatory cells in the airways. *Int. Arch. Allergy appl Immunol.*, **88**, 68-69.
  168. PEACHELL, P.T., COLUMBO, M., KAGEY-SOBOTKA, A., LICHTENSTEIN, L. M., MARONE, G. (1988). Adenosine potentiates mediator release from human lung mast cells. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **138**, 1143-1151.
-

169. PEACHELL, P.T., LICHTENSTEIN, L.M., SCHEIMER, R.P. (1991). Regulation of human basophil and lung mast cell function by adenosine. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **256**, 717-726.
170. PEACHEY, J.A., HOURANI, S.M.O., KITCHEN, I. (1999). Ontogeny of adenosine receptors in the longitudinal muscle and muscularis mucosae of the rat distal colon. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **359**, 140-146.
171. PENN, R.B., PASCUAL, R.M., KIM, Y.M., MUNDELL, S.J., KRYMSKAYA, V.P., PANETTIERI, R.A., BENOVIC, J.L. (2001). Arrestin specificity for G protein-coupled receptors in human airway smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, **276**, 32648-32656.
172. PERSSON, C.G.A. (1997). Vascular permeability and plasma exudation. *Allergy Allerg. Dis.*, **1**, 439-446.
173. PETERS, S.P. (1995). Mechanism of mast-cell activation. In: *Asthma and Rhinitis* (BUSSE, W.W., HOLGATE, S.T.), pp 221-230.
174. PETERS, S.P., SCHULMAN, E.S., SCHLEIMER, R.P., MACGLASHAN, D.W., NEWBALL, H.H., LICHTENSTEIN, L.M. (1982). Dispersed human lung mast cells. Pharmacologic aspects and comparison with human lung tissue fragments. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **126**, 1034-9.
175. PHILLIPS, G.D., BAGGA, P.K., DJUKANOVIC, R., HOLGATE, S.T. (1989). The influence of refractoriness to adenosine 5'-monophosphate provoked bronchoconstriction in asthma. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **140**, 321-326.
176. PHILLIPS, G.D., HOLGATE, S.T. (1988). Absence of a late-phase response or increase in histamine responsiveness after bronchial provocation with adenosine 5'-monophosphate in atopic and non-atopic asthma. *Clin. Sci.*, **75**, 429-436.
-

- 
177. PHILLIPS, G.D., HOLGATE, S.T. (1989). The effect of oral terfenadine alone and in combination with flurbiprofen on the bronchoconstrictor response to inhaled adenosine 5'-monophosphate in non-atopic asthma. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **139**, 463-469.
178. PHILLIPS, G.D., NG, W.H., CHURCH, M.K., HOLGATE, S.T. (1990). The response of plasma histamine to bronchoprovocation with methacholine, adenosine 5'-monophosphate, and allergen in atopic non-asthmatic subjects. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **141**, 9-13.
179. PHILLIPS, G.D., RAFFERTY, P., BEASLEY, R., HOLGATE, S.T. (1987). The effect of oral terfenadine on the bronchoconstrictor response to inhaled histamine and adenosine 5'-monophosphate in non-atopic asthma. *Thorax*, **42**, 939-945.
180. PHILLIPS, G.D., RAFFERTY, P., ROBINSON, C., HOLGATE, S.T. (1988). Dose-related antagonism of leukotriene D4-induced bronchoconstriction by p.o. administration of LY-171883 in nonasthmatic subjects. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **246**, 732-738.
181. POLOSA, R. (2002). Adenosine receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Resp. J.*, **20**, 488-496.
182. POLOSA, R., HOLGATE, S.T. (1997). Adenosine bronchoprovocation: a promising marker of allergic inflammation in asthma? *Thorax*, **52**, 919-923.
183. POLOSA, R., PHILLIPS, G.D., RAJAKULASINGAM, K., HOLGATE, S.T. (1991). The effect of inhaled ipratropium bromide alone and in combination with oral terfenadine on bronchoconstriction provoked by adenosine 5'-monophosphate and histamine in asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, **87**, 939-947.
184. POLOSA, R., RAJAKULASINGAM, K., PROSPERINI, G., CHURCH, M.K., HOLGATE, S.T. (1993). Relative potencies and time course of changes in adenosine 5'-monophosphate airway responsiveness with inhaled furosemide and bumetanide in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **92**, 288-297.
-

185. POLOSA, R., SANTONOCITO, G., MAGRI, S., PAOLINO, G., ARMATO, F., PAGANO, C. CRIMI, N. (1997). Neutral endopeptidase inhibition with inhaled phosphoramidon: no effect on bronchial responsiveness to adenosine 5'-monophosphate (AMP) in asthma. *Eur. Resp. J.*, **10**, 2460-2464.
186. RAFFERTY, P., BEASLEY, R., SOUTHGATE, P., HOLGATE, S.T. (1987). The role of histamine in allergen and adenosine-induced bronchoconstriction. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, **82**, 292-294.
187. RALEVIC, V., BURNSTOCK, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.*, **50**, 413-492.
188. RAMKUMAR, V., STILES, G.L., BEAVEN, M.A., ALI, H. (1993). The A<sub>3</sub> adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 16887-16890.
189. REEVES, J.J., HARRIS, C.A., HAYES, B.P., BUTCHERS, P.R., SHEEHAN, M.J. (2000). Studies on the effects of adenosine A<sub>3</sub> receptor stimulation on human eosinophils isolated from non-asthmatic or asthmatic donors. *Inflammation Res.*, **49**, 666-672.
190. REEVES, J.J., JONES, C.A., SHEEHAN, M.J., VARDEY, C.J., WHELAN, C.J. (1997). Adenosine A<sub>3</sub> receptors promote degranulation of rat mast cells both *in vitro* and *in vivo*. *Inflammation Res.*, **46**, 180-184.
191. RICHARDS, R., PHILLIPS, G.D., HOLGATE, S.T. (1989). Nedocromil sodium is more potent than sodium cromoglycate against AMP-induced bronchoconstriction in atopic asthmatic subjects. *Clin. exp. Allergy*, **19**, 285-291.
192. RORKE, S., HOLGATE, S.T. (2002). Targeting adenosine receptors: novel therapeutic targets in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Resp. Med.*, **1**, 99-105.
-

- 
193. RORKE, S., JENNISON, S., JEFFS, J.A., SAMPSON, A.P., ARSHAD, H., HOLGATE, S.T. (2002). Role of cysteinyl leukotrienes in adenosine 5'-monophosphate induced bronchoconstriction in asthma. *Thorax*, **57**, 323–327.
194. SAITO, H., OKAJIMA, F., MOLSKI, T.F.P., SHA'AFI, R.I., UI, M., ISHIZAKA, T. (1987). Effects of ADP-ribosylation of GTP-binding protein by pertussis toxin on immunoglobulin E-dependent and -independent histamine release from mast cells and basophils. *J. Immunol.*, **138**, 3927-3934.
195. SALVATORE, C.A., TILLEY, S.L., FLETCHER, D.S., KOLLER, B.H., JACOBSON, M.A. (2000). Disruption of the A<sub>3</sub> adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J. Biol. Chem.*, **275**, 4429–4434.
196. SAPIENZA, S., RENZI, P.M., MARTIN, J.G. (1992). Effects of ketotifen on airway responses to allergen challenge in the actively sensitized Brown Norway rat. *Agents Actions*, **37**, 238-244.
197. SATTIN, A., RALL, T.W. (1970). Effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3',5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. *Mol. Pharmacol.*, **6**, 13-23.
198. SAURA, C.A., MALLOL, J., CANELA, E.I., LLUIS, C., FRANCO, R. (1998). Adenosine deaminase and A<sub>1</sub> adenosine receptors internalize together following agonist-induced receptor desensitization. *J. Biol. Chem.*, **273**, 17610-17617.
199. SCHNEYVAYS, V., JACOBSON, K.A., LI, A.H., NAWRATH, H., ZINMAN, T., ISAAC, A., SCHAINBERG, A. (2000). Induction of apoptosis in rat cardiocytes by A<sub>3</sub> adenosine receptor activation and its suppression by isoproterenol. *Exp. Cell. Res.*, **257**, 111-126.
200. SELBIE, L.A., HILL, S.J. (1998). G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signaling pathways. *Trends Pharmacol. Sci.*, **19**, 87-93.
-

201. SENYSHYN, J., BAUMGARTNER, R.A., BEAVEN, M.A. (1998). Quercetin sensitizes RBL-2H3 cells to polybasic mast cell secretagogues through increased expression of G<sub>i</sub> GTP-binding proteins linked to a phospholipase C signaling pathway. *J. Immunol.*, **160**, 5136-5144.
  
  202. SHEFLER, I., SAGI-EISENBERG, R. (2001). Gi-mediated activation of the Syk kinase by the receptor mimetic basic secretagogues of mast cells: role in mediating arachidonic acid/metabolites release. *J. Immunol.*, **167**, 475-481.
  
  203. SHIMIZU, Y., SCHWARTZ, L.B. (1997). Mast cell involvement in asthma. *Asthma*, **1**, 353-365.
  
  204. SHNEYVAYS, V., ZINMAN, T., SHAINBERG, A. (2004). Analysis of calcium responses mediated by the A<sub>3</sub> adenosine receptor in cultured newborn rat cardiac myocytes. *Cell Calcium*, **36**, 387-396.
  
  205. SIRAGANIAN, R.P. (2003). Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Curr. Opin. Immunol.*, **15**, 639-646.
  
  206. STEHLE, J.H., RIVKEES S.A., LEE J.J., WEAVER D.R., DEEDS J.D., REPPERT S.M. (1992). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A<sub>2</sub>-adenosine receptor subtype. *Mol. Endocrinology*, **6**, 384-393.
  
  207. STREK, M.E., LEFF, A.R. (1997). Eosinophils. *Asthma.*, **1**, 399-417.
  
  208. SUZUKI, H., TAKEI, M., NAKAHATA, T., FUKAMACHI, H. (1998). Inhibitory effect of adenosine on degranulation of human cultured mast cells upon cross-linking of FcεRI. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **242**, 697-702.
  
  209. TARAYRE, J. P., ALIAGA, M., BARBARA, M., TISSEYRE, N., VIEU, S., TISNE-VERSAILLES, J. (1992). Model of bronchial allergic inflammation in the Brown-Norway rat. Pharmacological modulation. *Int. J. Immunopharmac.*, **14**, 847-855.
-

- 
210. THORNE, J.R., BROADLEY, K.J. (1992). Adenosine-induced bronchoconstriction of isolated lung and trachea from sensitized guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.*, **106**, 978-985.
211. THORNE, J.R., DANAHAY, H., BROADLEY, K.J. (1996). Analysis of the bronchoconstrictor responses to adenosine receptor agonists in sensitised guinea-pig lungs and trachea. *Eur. J. Pharmacol.*, **316**, 263-271.
212. TIGANI, B., HANNON, J.P., SCHAEUBLIN, E., MAZZONI, L., FOZARD, J.R. (2003). Effects of immunomodulators on airways hyperresponsiveness to adenosine induced in actively sensitised Brown Norway rats by exposure to allergen. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **368**, 17-25.
213. TOWES, G.B., (1997). Macrophages. In: *Asthma*. Ed(s) BARNES, P.J., GRUNSTEIN, M.M., LEFF, A.R., WOOLCOCK, A.J., Lippencourt-Raven, pp. 381-398.
214. TUCKER, A.L., JIA, L., HOLETON, D., TAYLOR, A.J., LINDEN, J. (2000). Dominance of G<sub>s</sub> in doubly G<sub>s</sub>/G<sub>i</sub>-coupled chimeric A<sub>1</sub>/A<sub>2A</sub> adenosine receptors in HEK-293 cells. *Biochem. J.*, **352**, 203-210.
215. TUCKER, A.L., LINDEN, J., ROBEVA, A.S., D'ANGELO, D.D., LYNCH, K.R. (1992). Cloning and expression of a bovine adenosine A<sub>1</sub> receptor cDNA. *FEBS Letters*, **297**, 107-111.
216. UNDERWOOD, S.L., HADDAD, E.B., BIRRELL, M.A., MCCLUSKIE, K., PECORARO, M., DABROWSKI, D., WEBBER, S.E., FOSTER, M.L., BELVISI, M.G. (2002). Functional characterization and biomarker identification in the Brown Norway model of allergic airway inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, **137**, 263-275.
217. VAN CALKER, D., MULLER, M., HAMPRECHT, B. (1979). Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.*, **33**, 999-1005.
218. VAN DEN BERGE, M., KERSTJENS, H., MEIJER, R.J., DE REUS, D.M., KOËTER, G.H., KAUFFMAN, H.F., POSTMA, D.S. (2001a). Corticosteroid-induced
-

---

improvement in the PC<sub>20</sub> of adenosine monophosphate is more closely associated with reduction in airway inflammation than improvement in the PC<sub>20</sub> of methacholine. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **164**, 1127–1132.

219. VAN DEN BERGE, M., KERSTJENS, H.A.M., DE REUS, D.M., KOEETER, G.H., KAUFFMAN, H.F., POSTMA, D.S. (2004a). Provocation with adenosine 5'-monophosphate, but not methacholine, induces sputum eosinophilia. *Clin. exp. Allergy*, **34**, 71-76.
220. VAN DEN BERGE, M., MEIJER, R.J., KERSTJENS, H., DE REUS, D.M., KOËTER, G.H., KAUFFMAN, H.F., POSTMA, D.S. (2001b). PC<sub>20</sub> AMP is more closely associated with airway inflammation in asthma than PC<sub>20</sub> of methacholine. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **164**, 1546–1550.
221. VAN DEN BERGE, M., POLOSA, R., KERSTJENS, H.A.M., POSTMA, D.S. (2004b). The role of endogenous and exogenous AMP in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* pp. 737-746.
222. VAN SCHAICK, E.A., JACOBSON, K.A., KIM, H.O., IJZERMAN, A.P., DANHOF, M. (1996). Hemodynamic effects and histamine release elicited by the selective adenosine A<sub>3</sub> receptor agonist 2-Cl-IB-MECA in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **308**, 311-314.
223. WAN, W., SUTHERLAND, G.R., GEIGER, J.D. (1990). Binding of the adenosine A<sub>2</sub> receptor ligand [<sup>3</sup>H]CGS 21680 to human and rat brain: evidence for multiple sites. *J. Neurochem.*, **55**, 1763-1771.
224. WEERSINK, E.J.M., POSTMA, D.S., AALBERS, R., DE-MONCHY, J.G.R. (1994). Early and late asthmatic reaction after allergen challenge. *Resp. Med.*, **88**, 103-114.
225. WHITE, T.E., DICKENSON, J.M., HILL, S.J. (1993). Histamine H<sub>1</sub>-receptor-mediated inositol phospholipid hydrolysis in DDT1MF-2 cells: agonist and antagonist properties. *Br. J. Pharmacol.*, **108**, 196-203.
-

226. WILLIAMS, B.A., MANZER, A., BLAY, J., HOSKIN, D.W. (1997). Adenosine acts a novel extracellular receptor to inhibit granule exocytosis by natural killer cells. *Departements of Microbiol. And immunol.*, **231**, 264-269.
227. WOHLSEN, A., UHLIG, S., MARTIN, C. (2001). Immediate allergic response in small airways. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **163**, 1462-1469.
228. WOLLNER, A., WOLLNER, S., SMITH, J.B. (1993). Acting via A<sub>2</sub> receptors, adenosine inhibits the upregulation of Mac-1 (CD11b/CD18) expression on fMLP-stimulated neutrophils. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, **9**, 179-185.
229. XAUS, J., MIRABET, M., LLOBERAS, J., SOLER, C., LLUIS, C., FRANCO, R., CELADA, A. (1999). IFN-g up-regulates the A<sub>2B</sub> adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. *J. Immunol.*, **162**, 3607-3614.
230. XU, L.J., SAPIENZA, S., DU, T., WASERMAN, S., MARTIN, J.G. (1992). Comparison of upper and lower airway responses to two sensitised rat strains to inhaled antigen. *J. appl. Physiol.*, **73**, 1608-1613.
231. YAAR, R., JONES, M.R., CHEN, J.F., RAVID, K. (2004). Animal models for the study of adenosine receptor function. *J. Cell. Physiol.*, **202**, 9-20.
232. ZHONG, H., SHLYKOV, S.G., MOLINA, J.G., SANBORN, B.M., JACOBSON, M.J., TILLEY, S.L., BLACKBURN, M.R. (2003). Activation of murine lung mast cells by the adenosine A<sub>3</sub> receptor. *J. Immunol.*, **170**, 338-345.
233. ZHOU, Q.Y., LI, C., OLAH, M.E., JOHNSON, R.A., STILES, G.L., CIVELLI, O. (1992). Molecular cloning and characterisation of an adenosine receptor: the A<sub>3</sub> adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 7432-7436.
-

## **SECTION 7.**



### **7. Annexe**

---

## 7.1 Abréviations

Abréviation	Description
%	Pourcentage
<	Plus petit que
>	Plus grand que
±	Plus ou moins
≈	environ
µg	Micro gramme
µM	Micro (X10 <sup>-6</sup> ) Molaire
2-Cl-IB-MECA	2-chloro-N <sup>6</sup> -(3-iodobenzyl)-9[5-méthylcarbamoyl]-β-D-ribofuranosyl] adénineribofuranosyl] adénine
5'-AMP	Adénosine 5'-monophosphate
5-HT	Sérotonine (5-hydroxytryptamine)
8-SPT	8-(p-sulphophényl)théophylline
AC	Adénylate cyclase
ADA	Adénosine déaminase
ADO	Adénosine
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
AMPc	Adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique
APNEA	N <sup>6</sup> -[2-(4-aminophényl)éthyl] adénosine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AS	Activement sensibilisé
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BIE	Bronchoconstriction induite par l'exercice
BN	Brown Norway
Ca <sup>2+</sup>	Calcium intracellulaire
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de calcium
CGS 15943	9-chloro-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[1,5-C]quinazolin-5-amine
CGS 21680	2-[P-(2-carboxyéthyl) phénéthylamino]-5'-N-éthylcarboxamido adénosine hydrochloride
CHA	N <sup>6</sup> -Cyclohexyladénosine
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CPA	N <sup>6</sup> -Cyclopentyladénosine
DAG	Diacylglycérol
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
DPCPX	1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine
DSCG	Cromoglycate de soude
EPO	Peroxydase éosinophilique
ERK	Extracellular-Signal Regulated Kinases
<i>et al.</i>	<i>Et Alia</i> ; et autres
FcεRI	Récepteurs de haute affinité pour les IgEs
FcεRII	Récepteurs de faible affinité pour les IgEs
Fig.	Figure
g	Gramme
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor

<b>Abréviation</b>	<b>Description</b>
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
h	Heure
HRB	Hyperréactivité bronchique
H <sub>2</sub> O	Eau
IPDX	3-isobutyl-8-pyrrolidinoxanthine
i.p.	Par voie intrapéritonéale
i.t.	Par voie intratrachéale
i.v.	Par voie intraveineuse
I-ABOPX	3-(3-iodo-4-aminobenzyl)-8-(4-oxyacétate)phényl-1-propylxanthine
Ig	Immunoglobuline
IL-	Interleukine-
INF	Interféron
IP <sub>3</sub>	Inositol (1,4,5) trisphosphate
KCl	Chlorure de potassium
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphate de potassium
K <sup>+</sup>	Potassium
kg	Kilogramme
l	Litre
LPS	Lipopolysaccharide
m	Mètre
m <sup>2</sup>	Mètre carré
M	Molaire
MgSO <sub>4</sub>	Sulfate de magnésium
MBP	Protéine basique majeure
MEK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase/Extracellular Signal Regulated Kinase Kinase
MHC-1	Mastocyte de l'homme
MRS 1191	3-Ethyl-5-benzyl-2-méthyl-4-phényléthynyl-6-phényl-1,4-(±)-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate
MRS 1523	3-propyl-6-éthyl-5-[(éthylthio)carbonyl]-2 phényl-4-propyl-3-pyridine carboxylate
MRS 1754	N-(4-cyano-Phényl)-2-[4-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1H-purin-8-yl)-phénoxy]-acetamide
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Milli (X10 <sup>-3</sup> ) litre
mm	Milli (X10 <sup>-3</sup> ) mètre
mM	Milli (X10 <sup>-3</sup> ) molaire
n	Nombre d'animaux
NaCl	Chlorure de sodium
NaHCO <sub>3</sub>	Hydrogénocarbonate de sodium
NBTI	S-(p-nitrobenzyl)-6-thioinosine
NECA	N-éthylcarboxamidoadénosine
ng	Nano (X10 <sup>-9</sup> ) gramme
nm	Nano (X10 <sup>-9</sup> ) mètre
nM	Nano (X10 <sup>-9</sup> ) molaire
O <sub>2</sub>	Oxygène
OA	Ovalbumine

---

<b>Abréviation</b>	<b>Description</b>
°C	Degrés Celsius
PAF	Platelet Activating Factor
PBS	Phosphate buffured saline
PG	Prostaglandine
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol myristyl acetate
PTX	Toxine pertussique
s	Seconde
s.c.	De manière sous-cutanée
s.e. m.	Erreur standard sur la moyenne
SAH	S-adénosinehomocystéine
SCH 58261	5-amino-7-(phényléthyl)-2-(1-furyl)pyrazolo[4,3-E]-1,2,4-triazolo[1,5-C]pyrimidine
Th	Lymphocyte T helper
THP-1	Monocyte de l'homme
TNF	Tumour Necrosis Factor
TxA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
VEMs	Volume expiratoire maximal seconde
XAC	Xanthine Amine Congener
ZM 241385	4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-A][1,3,5]triazin-5-Yl-amino]éthyl) phénol
α	Alpha
β	Bêta
γ	Gamma
[ <sup>3</sup> H]-NECA	Récepteur de type A <sub>2</sub>

---

## 7.2 Présentations et Publications

### 7.2.1 Présentations

Fozard, J.R., Baur, F., **Wolber, C.** (2003). Antagonist pharmacology of adenosine A<sub>2B</sub> receptors from rat, guinea pig and dog. *Brit. J. Pharmacol.*, 138, 129P.

**Wolber, C.**, Fozard, J.R. (2003). Further definition of the mechanism of the contractile response to adenosine on lung parenchymal strips from actively sensitized, allergen-challenged Brown Norway rats. *Brit. J. Pharmacol.*, 138, 46P.

### 7.2.2 Publications

Fozard, J.R., Baur, F., **Wolber, C.**, Collingwood, S.P. (2001). Inhibition by Viozan of extravasation induced in rat trachea by capsaicin is mediated exclusively by  $\beta$ 2-adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 364, 570-572.

Hannon, J.P., Tigani, B., **Wolber, C.**, Williams, I., Mazzoni, L., Howes, C., Fozard, J.R. (2002). Evidence for an atypical receptor mediating the augmented bronchoconstrictor response to adenosine induced by allergen challenge in actively sensitized Brown Norway rats. *Brit. J. Pharmacol.*, 135, 685-696.

Fozard, J.R., Tigani, B., **Wolber, C.**, Williams, I., Mazzoni, L., Hannon, J.P. (2003). Modeling the response of the asthmatic airways to adenosine: Mechanisms and receptors. *Drug Develop. Res.*, 59, 23-29.

Fozard, J.R., Baur, F., **Wolber, C.** (2003). Antagonist pharmacology of adenosine A<sub>2B</sub> receptors from rat, guinea pig and dog. *Eur. J. Pharmacol.*, 475, 79-84.

**Wolber, C.**, Baur, F., Fozard, J.R. (2004). Interaction between adenosine and allergen or compound 48/80 on lung parenchymal strips from actively sensitised Brown Norway rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 498, 227-232.

**Wolber, C.** & Fozard, J.R. (2005). The receptor mechanism mediating the contractile response to adenosine on lung parenchymal strips from actively sensitized, allergen-challenged Brown Norway rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, Published online 27 January 2005.

---

### **7.3 Publication 5**

## **Modeling the Response of the Asthmatic Airways to Adenosine: Mechanisms and Receptors**

**J.R. Fozard, B. Tigani, C. Wolber, I. Williams, L. Mazzoni, J.P. Hannon**

*Drug Development Research* 59, 23-29 (2003)

---

## Résumé

Nous avons décrit un nouveau modèle animal qui imite les effets bronchoconstricteur de l'adénosine chez les asthmatiques. Les rats BN sont sensibilisés avec l'OA. Consécutivement la provocation avec l'OA induit une hyperréactivité sélective et très marquée à l'adénosine. La réponse augmentée à l'adénosine a été bloquée par le disodium cromoglycate, le méthysergide et la théophylline. La réponse s'accompagne d'une augmentation de la concentration plasmatique en histamine et en 5-HT et d'une dégranulation des mastocytes des voies respiratoires. Un agoniste non sélectif des récepteurs à l'adénosine, le NECA, induit également la bronchoconstriction chez les animaux AS et provoqués avec l'OA, alors que les agonistes sélectifs pour les récepteurs  $A_1$ ,  $A_{2A}$  et  $A_3$ , n'induisent que des effets minimaux. MRS 1754, qui a une affinité similaire pour les récepteurs  $A_{2B}$  et  $A_1$ , ne parvient pas à bloquer la réponse à l'adénosine, malgré le fait qu'il bloque le récepteur  $A_1$  qui est impliqué dans la bradycardie induite par le NECA. Le 8-SPT et le CGS 15943, les antagonistes des récepteurs  $A_1$ ,  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$  mais pas  $A_3$ , inhibent la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine. Toutefois, le degré de ce blocage ne reflète pas les concentrations plasmatiques, qui sont respectivement 139 et 21 fois plus grande que la valeur du  $K_B$  au récepteur  $A_{2B}$  de rat. L'adénosine et le NECA, mais pas le CPA, ni le CGS 21680 ou le 2-Cl-IB-MECA, induisent une contraction des bandes de parenchyme de poumons prélevées de rats BN AS sensibilisés et provoqués avec l'OA. Les réponses à l'adénosine peuvent être inhibées par le 8-SPT ou le MRS 1754 à des concentrations  $>50$  fois leurs affinités pour le récepteur  $A_{2B}$  de rat. La régulation par l'activation allergique, la dépendance des mastocytaires, et le blocage sélectif par la théophylline présente des similitudes frappantes entre la réponse bronchoconstrictive à l'adénosine chez le rat BN et celle dans les voies respiratoires des asthmatiques. Toutefois, le récepteur induisant la réponse bronchoconstrictive chez le rat, ne peut être classé comme l'un des quatre sous-types de récepteurs connus de l'adénosine.

---

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

John R. Frozard, Bruno Tigani, **Cedric Wolber**, Iwan Williams, Lazzaro Mazzoni,  
Jason P. Hannon

**Modeling the response of the asthmatic airways to adenosine : Mechanisms and  
receptors.**

Drug Development Research 59, 23-29 (2003)

Pages 23-29 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/104534351/PDFSTART>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

---

## Summary

Parenchymal strips prepared from Brown Norway (BN) rats, actively sensitised to ovalbumin (OA) and challenged with OA 3 h before death show a marked increase in the contractile response to adenosine. The aim of my project was to better understand the mechanism of this potentiation.

To provide further evidence that the interaction between OA and adenosine involves the mast cells of the lung, studies were carried out under entirely *in vitro* conditions. The results confirm that activation of the mast cells of the lung following either an immunological (OA) or a non-immunological (compound 48/80) stimulus is the basis of the potentiation of adenosine. Pretreatment with NBTI, an inhibitor of the facilitated transport of adenosine, potentiated the response to adenosine which indicates that the receptor(s) which mediate(s) the augmented response are not located within the cell. A range of adenosine receptor agonists was used to define the receptor subtype which mediates the augmented contractile response to adenosine on parenchymal strips removed from actively sensitised, OA-challenged animals. Adenosine and NECA ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  and  $A_3$  receptor agonists), but not CPA ( $A_1$ -selective), CGS 21680 ( $A_{2A}$ -selective) and 2-Cl-IB-MECA ( $A_3$  selective) induced contraction of the strip; The response to adenosine exhibits cross tachyphylaxis with NECA which suggests a common mechanism of action. The results from the agonist analysis suggested a major role for the  $A_{2B}$  receptor in the augmented response to adenosine. In contrast, a preliminary analysis of the effects of the broad spectrum ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ) antagonists, 8-SPT and CGS 15943, and the  $A_1/A_{2B}$  receptor selective antagonist, MRS 1754, indicated that the  $A_{2B}$  receptor was not involved. A study of the effects of high concentrations of CPA and 2-Cl-IB-MECA provided important insight into the receptors involved in the augmented response to adenosine. CPA contracted parenchymal strips removed from sensitised animals challenged with OA. The response was partially blocked by DPCPX a selective  $A_1$  receptor antagonist, and methysergide, an antagonist of 5-HT<sub>2</sub> receptors, and abolished by a combination of the two. A similar analysis of the response to adenosine indicated mediation in part by the  $A_1$  receptor (ca. 30%) and by a mechanism sensitive to methysergide and hence mast cell dependent (ca. 70%). 2-Cl-IB-MECA blocked the methysergide-sensitive component of the response to adenosine consistent with this  $A_3$  receptor agonist behaving as an antagonist at this site. A second selective  $A_3$  receptor agonist, inosine, contracted tissues from animals challenged with allergen through  $A_3$  receptor activation. An extended antagonist analysis was carried out. The selective  $A_3$  receptor antagonists, MRS 1523 and MRS 1191, showed no antagonist effects towards adenosine despite the use of concentrations up to respectively, 30- and 7-fold their affinities for the  $A_3$  receptor. Augmented responses to adenosine were abolished by pertussis toxin which blocks signaling pathways coupled to Gi.

Overall the results obtained during this project add significantly to our understanding of the mechanism of action of the adenosine-induced contractile response of the lung parenchymal strip augmented after allergen challenge. Potentiation of adenosine is dependent on activation of mast cells in the lung which can be by either immunological or non-immunological stimuli. The augmented response arises from activation of two Gi-protein coupled receptors One is the  $A_1$  receptor which is not mast cell located and which contributes to only a minor extent to the contractile response. The second is a receptor which is present on the mast cells of the lung and which shows pharmacological similarities to the  $A_3$  receptor but Cl-IB-MECA behaves as an antagonist and MRS 1523 and MRS 1191 are inactive at concentrations which substantially exceed their affinities for the rat  $A_3$  receptor.

---

---

## Résumé

Les bandes de parenchyme de poumons prélevées sur des rats Brown Norway (BN) activement sensibilisés (AS) et provoqués avec l'ovalbumine (OA) 3 h avant d'être sacrifiés, montrent une augmentation marquée de la réponse contractile à l'adénosine. Le but de mon projet a été de mieux comprendre le mécanisme induisant cette augmentation.

Afin de confirmer que l'interaction entre OA et l'adénosine implique exclusivement les mastocytes pulmonaires, des études sous condition entièrement *in vitro* ont été réalisées. L'ensemble de nos résultats montre que l'activation des mastocytes dans les poumons par un stimulus immunologique (OA) ou non immunologique (composé 48/80), est à l'origine de l'augmentation de la réponse contractile à l'adénosine. Un prétraitement par le NBTI, un inhibiteur du transport facilité de l'adénosine, conduit à une augmentation de la réponse à l'adénosine qui suggère que le(s) récepteur(s) impliqué(s) dans cette potentialisation n'est (ne sont) pas intracellulaire(s). De plus, il existe une tachyphylaxie croisée entre l'adénosine et le NECA, impliquant qu'ils agissent sur un mécanisme commun. Le(s) récepteur(s) induisant l'augmentation de la réponse à l'adénosine a été défini en utilisant des agonistes et des antagonistes. L'adénosine et le NECA (actifs au niveau des récepteurs  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  et  $A_3$ ) induisent une contraction de la bande; en revanche, ni CPA (sélectif pour  $A_1$ ), CGS 21680 (sélectif pour  $A_{2A}$ ) ou 2-Cl-IB-MECA (sélectif pour  $A_3$ ), seuls ou en combinaison, n'induisent de contraction. Ces résultats suggèrent un rôle majeur pour les récepteurs  $A_{2B}$  dans la réponse augmentée à l'adénosine. Contrairement aux conclusions apportées par les agonistes, une analyse préliminaire de l'effet des antagonistes, 8-SPT, CGS 15943 et MRS 1754, exclut qu'il puisse s'agir des récepteurs  $A_{2B}$ . Une étude des effets de fortes concentrations de CPA et de 2-Cl-IB-MECA permet de clarifier les récepteurs impliqués dans la réponse augmentée à l'adénosine. CPA contracte les tissus des animaux provoqués avec l'allergène. La réponse contractile est partiellement inhibée par l'antagoniste du récepteur  $A_1$ , le DCPCX, ou par l'antagoniste du récepteur 5-HT<sub>2</sub>, le méthysergide, et éliminée par une combinaison des deux composés. Une analyse similaire de la réponse à l'adénosine indique aussi une médiation par un récepteur  $A_1$  ( $\approx 30\%$ ) et par une autre composante sensible au méthysergide ( $\approx 70\%$ ) et dépendante des mastocytes. 2-Cl-IB-MECA bloque la composante sensible au méthysergide dans la réponse à l'adénosine, ce qui supporte le fait que cet agoniste du récepteur  $A_3$  se comporte comme un antagoniste. L'agoniste sélectif du récepteur  $A_3$ , l'inosine, contracte les tissus des animaux provoqués avec l'allergène. Ces réponses sont réduites de façon très marquée par le méthysergide, le disodium cromoglycate et le 2-Cl-IB-MECA, indiquant un rôle pour le récepteur  $A_3$  sur les mastocytes dans la réponse. En se basant sur ces résultats, nous avons testé les effets des antagonistes des récepteurs  $A_3$ , MRS 1523 et MRS 1191 sur la réponse à l'adénosine; de manière surprenante aucun d'eux n'a causé de blocage. La réponse à l'adénosine a été éliminée par la toxine pertussique qui interfère avec les systèmes de transduction du récepteur couplé à  $G_i/G_o$ .

En conclusion, la réponse contractile augmentée à l'adénosine est dépendante de l'activation des mastocytes pulmonaires suite à un stimulus de type immunologique ou non immunologique. Cette augmentation ne résulte pas d'une action intracellulaire, mais de l'activation de deux types de récepteurs couplés à des protéines  $G_i$ . L'un est le récepteur  $A_1$ , qui n'est pas localisé sur le mastocyte et qui contribue uniquement à une petite partie de la réponse contractile. L'autre est un récepteur qui est présent sur les mastocytes pulmonaires et qui induit la majeure partie de la réponse contractile à l'adénosine. Ce récepteur montre des similarités avec le récepteur  $A_3$  en répondant à l'adénosine, au NECA, à l'inosine et aux fortes concentrations de CPA, mais aussi des différences car le 2-Cl-IB-MECA se comporte comme un antagoniste et ni MRS 1523, ni MRS 1191 ne sont actifs malgré l'utilisation de concentrations excédant substantiellement leurs affinités pour le récepteur  $A_3$  de rat.

---