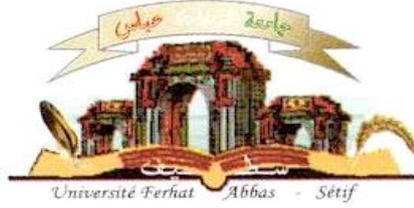


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2012

THÈSE

Présentée par : **Hanifa DJELILI**

Pour obtenir le diplôme de **Doctorat en Sciences**

Option Biochimie

THÈME

Effets Pharmacologiques Pulmonaires des Flavonoïdes : Caractérisation *in vitro*

des effets de la quercétine et de la génistéine

Soutenue publiquement le 10/01/2013

DEVANT LE JURY

Président: Baghiani Abedrahmane Professeur, Université Ferhat Abbas, Sétif

Rapporteurs: Arrar Lekhmici Professeur, Université Ferhat Abbas, Sétif

Devillier Philippe Professeur, Université de Versailles, France

Examineurs: Djerdjouri Bahia Professeur, Université Houari, Boumediene, Alger

Laroui Salah Professeur, Université Hadj Lakhder, Batna

Année universitaire 2012/2013

REMERCIEMENTS

Á monsieur le professeur Philippe Devillier (directeur de l'unité de recherche de pharmacologie respiratoire, faculté de médecine Paris-Ouest, France). Pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son laboratoire et pour tout le temps qu'il a consacré pour diriger ce travail. Avec mes plus sincères remerciements.

Á monsieur le professeur Lekhmeci Arrar (enseignant-chercheur à l'université de Sétif). Pour avoir accepté la charge d'être le promoteur de ma thèse et pour ses conseils avisés surtout au cours de la rédaction de ce travail. Avec toute ma reconnaissance.

Á monsieur le professeur A.R. Baghiani. Qui m'a honoré en acceptant d'être le président de ce jury. Avec toute ma reconnaissance.

A Mme Pr. B.Djarjouri et Pr. S.Laroui. Pour l'honneur qu'ils me font d'être les examinateurs de cette thèse. Avec toute ma reconnaissance.

Á monsieur Emmanuel Naline (Maître de conférence à l'unité de recherche de pharmacologie respiratoire, faculté de médecine Paris-Ouest, France). Pour son aide technique et scientifique ainsi pour ses nombreux conseils. Sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Avec mes plus sincères remerciements.

Á monsieur le professeur Didier Raoult (directeur de l'unité de recherche des Rickettsies, Faculté de médecine Marseille, France). Pour la qualité de votre accueil lors de ma visite à votre laboratoire et pour m'avoir fait bénéficier de l'expertise scientifique et technique de son équipe de recherche. Ma visite à votre laboratoire m'a encouragé de continuer mon travail de recherche malgré les difficultés qui me confrontent. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance sera sans bornes.

Á Mme Sabine Blouquit-laye (Maître de conférence à l'unité de recherche de pharmacologie respiratoire, faculté de médecine Paris-Ouest, France). Avec toute ma reconnaissance.

J'adresse, enfin et surtout ma plus profonde gratitude à ma mère, mon père, mes sœurs et mes frères qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances au cours de mes études. Avec toute mon affection et mes remerciements.

SOMMAIRE

Remerciements.....	i
Sommaire	ii
Liste des abréviations.....	vi
Résumé.....	viii
Abstract	ix

Revue de la littérature

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

Chapitre I :

Généralité sur la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

1.1. Définition.....	3
1.2. Aspects anatomopathologies.....	5
1.2.1. Bronchite chronique	5
1.2.2. Emphysème.....	6
1.3. Epidémiologie	6
1.4. Facteurs étiologiques	7

Chapitre II :

Physiopathologie de la BPCO

2.1. Cellules inflammatoires.....	12
2.1.1. Macrophages	12
2.1.2. Polynucléaires neutrophiles (PMN).....	13
2.1.3. Lymphocytes T	15
2.1.4. Eosinophiles et Mastocytes	15
2.1.5. Cellules dendritiques	16
2.1.6. Cellules épithéliales	17
2.2. Profil des médiateurs inflammatoires.....	18
2.2.1. Médiateurs lipidiques.....	19
2.2.2. Médiateurs peptidiques.....	20
2.2.3. Cytokines.....	21
2.2.3.1. Cytokines proinflammatoires.....	21
2.2.3.2. Chimiokines.....	26
2.2.4. Facteurs de croissance.....	32
2.2.4.1. Transforming Growth Factors (TGF- β 1).....	32

2.2.4.2. Transforming Growth Factors (TGF- α) et Epidermal Growth Factor (EGF).....	3
2.2.4.3. Vascular-Endothelial Growth Factor (VEGF).....	34
2.2.4.4. Fibroblast Growth Factors (FGF).....	35
2.3. Stress oxydatif.....	35
2.4. Protéases.....	40
2.4.1. Elastase du neutrophile.....	41
2.4.2. Cystéine-protéases.....	42
2.4.3. Métalloprotéinases matricielles (MMPs).....	43
2.5. Obstruction réversible des débits aériens dans la BPCO.....	44
2.5.1. Innervation pulmonaire.....	44
2.5.1.1. Récepteurs muscariniques.....	45
2.5.1.2. Récepteurs β 2-adrénergiques.....	48
2.5.2. Dysfonction de la voie cholinergique.....	49

Chapitre III :

Flavonoïdes

3.1. Structure chimique et classification.....	52
3.2. Distribution et localisation des flavonoïdes.....	53
3.3. Propriétés des flavonoïdes.....	54
3.3.1. Activités biologiques des flavonoïdes.....	55
3.3.1.1. Activité antioxydante.....	55
3.3.1.2. Activités anti-inflammatoires.....	59
3.3.1.3. Effet antispasmodique.....	60
3.4. Flavonoïdes et voies de signalisation.....	61
3.5. Biodisponibilité des flavonoïdes.....	63
OBJECTIFS ET CONDUITE DE TRAVAIL.....	65

Matériels et Méthodes

4. Matériels.....	67
4.1. Réactifs.....	67
4.2. Matériel biologique.....	67
4.3. Structures chimiques des flavonoïdes utilisés au cours de cette étude.....	68
5. Méthodes.....	69

5.1. Mesure de la chimiluminescence luminol-dépendante –induite par l’acide hypochloreux	69
5.1.1. Effet scavenger des flavonols sur l’HOCl.....	69
5.1.2. Traitement de la rutine par naringinase.....	69
5.2. Etude de l’activité anti-inflammatoire des flavonoides.....	
70	
5.2.1. Culture à court terme du parenchyme pulmonaire	70
5.2.2. Préparation des surnageants des cultures du parenchyme humain....	70
5.2.3. Quantification des médiateurs sécrétés dans le milieu de culture.....	71
5.3. Etudes fonctionnelles.....	72
5.3.1. Technique des cuves à organes isolés.....	72
5.3.2. Etude de l’effet de flavonoides sur les bronches humaines précontractées.....	73
5.3.3. Effets des flavonoides sur les courbes concentrations-réponses à l’isoprenaline, au formotérol et au nitroprussiate de sodium.....	74
5.3.4. Effets des flavonoides sur la contraction des bronches induites par KCl/CaCl ₂	75
6. Analyses de résultats.....	77

Résultats

7. Evaluation de l'effet scavenger de la quercétine sur l'acide hypochloreux (HOCl).....	79
7.1. Effet de la quercétine sur la cinétique de luminescence du luminol HOCl-induite.....	79
7.2. Effet inhibiteur de la quercétine sur la luminescence de luminol HOCl-induite.....	81
8. Activité anti-inflammatoire de la génistéine et de la quercétine.....	86
8.1. Dosage de médiateurs sécrétés par le parenchyme pulmonaire humain.....	86
8.2. Modulation des sécrétions spontanées du TNF- α , d’IL-8 et du MIP-1 β par la génistéine et la quercétine.....	88
8.3. Effet de la génistéine sur les sécrétions LPS-induites de TNF- α , IL-8 et de MIP-1 β	90
8.4. Effet de la quercétine sur les sécrétions LPS-induites de TNF- α , d’IL-8 et de MIP-1 β	94
9. Etudes fonctionnelles sur les bronches humaines isolées.....	99

9.1. Effet anti-spasmodique de la génistéine et de la quercétine sur les bronches humaines isolées.....	99
9.2. Effet de la génistéine et de la quercétine sur la relaxation induite par les agonistes β -2 adrénergiques sur les bronches humaines isolées.....	104
9.3. Effet de la génistéine et de la quercétine sur la relaxation induite par les activateurs de la voie GMPc sur les bronches humaines isolées.....	113
9.4. Effet de la génistéine et de la quercétine sur la contraction KCl- et CaCl ₂ - induite sur les bronches humaines isolées.....	116

Discussion

10. Effet scavenger de la quercétine sur l'acide hypochloreux.....	121
11. Activité anti-inflammatoire de la génistéine et de la quercétine sur le parenchyme humain.....	126
12. Activité relaxante de la génistéine et de la quercétine sur la bronche humaine.....	130
13. Considérations cliniques de la génistéine et de la quercétine.....	138
CONCLUSION.....	140
REFERENCES.....	142

LISTE DES ABREVIATIONS

AC	Adenylate cyclase
ACh	Acétylcholine
AChT	Acétylcholine transférase
ADPc	Adénosine Diphosphate cyclique
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
AP-1	Activator Protein-1
α 1-AT	alpha -1 Antitrypsine
ATP	Adénosine Triphosphate
ATS	American Thoracic Society
BPCO	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
CaM	Calmoduline
CL	Chimiluminescence
CLM	Chaîne Légère de la Myosine
CLMK	Chaîne Légère de la Myosine kinase
CLMP	Chaîne Légère de la Myosine Phosphatase
COX-2	Cyclooxygénase-2
CPI-17	
CVF	Capacité Vitale Forcée
DAG	Diacylglycérol
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ECP	Protéines cationique d'éosinophiles
EC ₅₀	Concentration efficace
EDTA	Acide ethylenediaminetetraacétique
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
E _{max}	Efficacité maximale
EN	Elastase du neutrophile
EOR	Espèces oxygénées réactives
ERK	Extracellular Signal-Regulated kinase
ERS	European Respiratory Society
Et-1	Endothéline-1
FGF	Fibroblast Growth Factor
For	formotérol
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GMPc	Guanine monophosphate cyclique
Gold	Global Initiative Lung Disease
GRO- α	Growth -Related Oncogène- α
GSH	Glutathion réduit
GTP	Guanine triphosphate
HAT	Histone acétyltransférase
HDAC	Histone deacétylase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HOCl	Acide hypochloreux
ICMA-1	InterCellular Adhésion Molécule-1
IFN- γ	Interféron- γ
I κ B	Inhibiteur de κ B
IL	Interleukine

IC ₅₀	concentration inhibitrice 50
IP3	Inositol 1,4,3 triphosphate
IP-10	Interféron inductible protéine 10kDa
ISO	Isoprénaline
I-TAC	Interféron- γ inductible T Cell-A chemoattractant
KO	knock out
LBA	Lavages BronchoAlvéolaires
LPS	Lipopolysaccharide
LTB ₄	Leucotriène B ₄
MAP	Mitogen-Activated Protein kinase
MCP-1	Monocytes Chemoattractant Protein-1
Mig	Monokine induced by interféron-gamma
MIP	Macrophage-Inflammatory Protein-1
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MPO	Myeloperoxydase
MR	Récepteur muscarinique
MyD	Myeloid Differentiation
NAC	N-acetyl-L-cysteine
NADPH	
NF- κ B	Facteur de transcription Nucléaire-kappa B
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
[•] OH	Radical hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONOO ⁻	Anion peroxydrite
PAF	Platelet activating factor
PBS	Phosphate buffered salin
pD2	Puissance (-Log EC ₅₀)
PDE	Phosphodiesterase
PG	Prostaglandines
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5 diphosphate
PKC	Protéine kinase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PMA	
PMN	Polynucléaires neutrophiles
RANTES	release by activated T cell expressed and secreted
PTK	Protéine tyrosine kinase
RLU	Relative Luminescence Unit
SLPI	Secretory leucoprotease inhibiteur
SNP	Nitroprussiate de sodium
TGF	Transforming Growth Factors
Th	T helper
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase
TLR-4	Toll-Like-Receptor-4
TNF- α	Tumor necrosis facteur-Alpha
TRAF6	TNF Receptor-Associated Factor 6
VEGF	Vascular-Endothelial Growth Factor
VEMS	Volume Expiré Maximal par Seconde
VOC	Voltage-operated channels

Résumé

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est un problème de santé publique majeur dont la prévalence est en croissance rapide. Aucun des traitements disponibles n'est à présent capable de ralentir la progression de cette maladie. Le présent travail étudie, *in vitro*, l'effet pulmo-protecteur de deux naturels flavonoïdes, quercétine et génistéine, connus par leur impact positif sur la santé humaine.

Sur le système acellulaire, l'effet scavenger de la quercétine, et les flavonols en relation, myricétine, kaempférol et rutine, sur l' HOCl est étudié par chimiluminescence luminol-dépendante. L'activité scavenger de la quercétine a été également comparée à celle des substances connues pour leur pouvoir anti-oxydant tels que N-acetylcystéine, vitamine C et taurines. Parmi les substances testées, la quercétine et son dérivé glycosyl rutine sont les agents scavenger les plus potentiels.

Sur le parenchyme pulmonaire humain, stimulé avec LPS pour 4 et 24 h, l'effet inhibiteur de la quercétine et de la génistéine, sur la production de $\text{TNF-}\alpha$, IL-8 et MIP- β , a été examiné. Comme quantifiés par ELISA, nos résultats ont montré, que la quercétine est plus potentiel en inhibant la libération de $\text{TNF-}\alpha$, IL-8 et MIP- β après 4 h qu'après 24 h d'incubation. Sur les sécrétions de 4 et de 24 h d'incubation, la génistéine est plus efficace en inhibant $\text{TNF-}\alpha$ et MIP- β mais sans effet prononcé sur la production d'IL-8.

Sur la bronche humaine precontractée soit par l'acétylcholine ou l'histamine, nous avons étudié l'effet relaxant de la quercétine et la génistéine et leur mécanisme d'action possible. Nos données ont montré que la quercétine et la génistéine sont capables d'induire une relaxation potentielle contre les deux agonistes contractiles et avec un même degré d'efficacité. Par ailleurs, la relaxation provoquée par l'isoprenaline et formotérol, les β -2 mimétiques, ou par le sodium nitroprussiate, un activateur de la GMPc , est significativement potentialisée en présence de la génistéine et de la quercétine. Du même, les contractions KCl- et CaCl_2 -induites sont inhibées d'une façon efficace et dose-dépendante par la quercétine et la génistéine. Nos données soutiennent l'idée que le mécanisme majeur de leur action est via l'inhibition $\text{AMPc-phosphodiesterase}$ et/ ou blocage du canal calcique.

Bien que le mécanisme moléculaire de leurs effets biologiques reste encore à explorer, notre étude suggère que la quercétine et la génistéine puissent contribuer dans la prévention et la cure de la maladie BPCO.

Mots clé : quercétine, génistéine, effets : scavenger, anti-inflammatoire and relaxant, HOCl , parenchyme- et bronche humains.

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major global health problem that has an increasing prevalence. No currently available treatments have been shown to slow the progression of this disease. The present study was investigated in vitro the pulmoprotective effect of two naturally occurring flavonoids, quercetin and genistein, which are assumed to protect human health.

In a cell free assay, the scavenger effect of quercetin and related flavonols, myricetin, kaempferol and its rutoside rutin, was studied towards hypochlorite acid (HOCl), using luminol-dependent chemiluminescence. The scavenging activity of quercetin was also compared to others substances known for their anti-oxidante properties such as, N-acetylcysteine, vitamin-C and taurine. Among the substances tested, rutin and quercetin have been found to be the most scavenging agents

On human pulmonary parenchyma, stimulated with lipopolysaccharide (LPS) for 4 and 24 h, the inhibitory effect of quercetin and genistein, on the production of TNF- α , IL-8 and MIP- β , was examined. As quantitated by ELISA, our results showed, that quercetin was more potent in inhibiting TNF- α , IL-8 and MIP- β production after 4h than after 24 h of incubation. At 4 and 24 h of incubation, genistein was more effective in inhibiting TNF- α and MIP- β but had no pronounced effect on IL-8 release.

On human bronchus precontracted with either acetylcholine or histamine, we investigated the relaxant effect of genistein and quercetin and thier possible mechanism of action. Our finfings showed that quercetin and genistein ara able to evoke a potent relaxation against both contractils agonists and in similar level. Furthermore, the relaxation evoked by the β -adrenoreceptor agonists, isoprenaline and formoterol, and an activator of soluble guanylyl cyclic GMP, sodium nitroprusside, was significantly potentiated by genistein and quercetin. In same way, genistein and quercetin inhibited effectively and dose-dependently the contraction elicited by KCl and CaCl₂. Our data support the view that the major mechanism of their action is via inhibition cAMP-phosphodiesterase and/ or blockade of Ca²⁺ channel.

Although the molecular mechanisms of thier biological effects remain to be clarified, our data suggest that quercetin and genistein may contribute to preventive and cure effects on COPD.

Key words: quercetin, genistein, scavenger, relaxant and antiinflammatory effects, HOCl, human parenchyma and bronchus.

ملخص

يعتبر مرض انسداد القصبات الرئوية المزمن (broncho-pneumopathie chronique obstructive: BPCO) من أكبر مشاكل الصحة العمومية، وذلك من حيث انتشاره أو خطورته. بالإضافة إلى عدم توفر أي علاج قادر على التخفيف من تقدم هذا المرض في الوقت الحالي.

تناولنا في هذا البحث دراسة مفعول اثنين من فلافونيدات طبيعية كرسيتين و جنستيين ومشابهاتهما البنيوية، المعروفة بتأثيرهما الإيجابي على صحة الإنسان، على مرض انسداد القصبات الرئوية. تمت دراسة المفعول الإزاحي (effet scavenger) لكرستيين و فلافونات مشابهة لها بنيويا؛ Rutine و Kaempférol، Myrécitine على حمض HOCl بواسطة طريقة التآلق الكيميائي باستعمال luminol. كما تمت مقارنة النشاط الإزاحي بين كرسيتين و مواد ذات مفعول قوي ضد الأوكسدة. و من بين المواد المختبرة كانت كرسيتين و Rutine الأكثر فعالية على HOCl.

من جهة أخرى استعملنا النسيج الرئوي الإسفنجي للإنسان المحفز بواسطة LPS لملاحظة مفعول تثبيط كرسيتين و جنستيين على إنتاج سيتوكينات (cytokines): TNF- α و IL-8 و MIP1- β . بينت النتائج المتحصل عليها بواسطة ELISA أن كرسيتين مثبط فعال على إنتاج TNF- α و IL-8 و MIP1- β بعد 4 سا، بالمقارنة مع التي تم إنتاجها بعد 24 سا، كما أظهرت جنستيين مفعولا مثبطا ناجعا على إنتاج TNF- α و MIP1- β ومفعولا غير معتبر على إنتاج IL-8 سواء بعد 4 أو 24 سا من الحضان.

استعملنا القصبة الرئوية للإنسان بعد تقلصها إما بالأسيتيلكولين أو الهيستامين، لدراسة تأثير الاسترخاء وآليته بالنسبة لكرستيين و جنستيين، فوضحت النتائج أن كرسيتين و جنستيين قادران على إحداث استرخاء قوي للقصبة الرئوية المقلصة وبنفس الفعالية. كما لاحظنا أن وجود كرسيتين و جنستيين يزيد في قوة تأثير β_2 -mimétiques و Isoprenalin و Formotérol و sodium nitroprussiate، المنشط لـ GMPC على استرخاء القصبة الرئوية. وكذلك تمكنت كرسيتين و جنستيين و بطريقة فعالة ومرتبطة بالتركيز تثبيط تقلص القصبة الرئوية الناتج عن KCl و CaCl₂. تدعم هذه المعطيات فكرة أن أهم آلية لتأثيرهما تكون عن طريق تثبيط AMPc-phosphodiesterase و/أو حصر قناة الكالسيوم. وبالرغم من أن الآلية الجزيئية لتأثيرهما تحتاج إلى دراسة أكثر إلا أن هذه الدراسة تشير إلى إمكانية كرسيتين و جنستيين المساهمة وقائيا و علاجيا لمرض BPCO.

مفاتيح البحث: كرسيتين، جنستيين، التأثير الإزاحي، ضد الالتهاب، تقلص/استرخاء، HOCl، النسيج الرئوي الإسفنجي، القصبة الرئوية

Introduction

INTRODUCTION

Les poumons représentent une interface importante entre l'organisme et le monde extérieur; ils sont donc en première ligne en ce qui concerne l'effet de polluants divers.

Parmi les pathologies atteignant les poumons, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), dont la prévalence est en croissance rapide, est une affection respiratoire caractérisée par une inflammation chronique responsable de nombreux changements physiopathologiques au niveau bronchique et alvéolaire. Les effecteurs de la réaction inflammatoire associés à la BPCO sont en partie méconnus, mais schématiquement, à côté de neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes (principalement CD8 positifs) sont en nombre augmenté dans les divers secteurs du poumon. Un déséquilibre de la balance protéase/antiprotéase et un stress oxydatif s'ajoutent au processus agressif entretenu par l'inflammation. L'inflammation ainsi induite a pour conséquent à moyen terme une perturbation de la contractilité du muscle lisse. Etendue au parenchyme, elle se traduit par un emphysème centrolobulaire souvent associé.

Au cours de la BPCO, l'obstruction bronchique ne peut pas être totalement expliquée par les anomalies structurales liées à la maladie inflammatoire des petites bronches et à la perte des attaches alvéolo-septales aux bronchioles. Cependant, l'efficacité des antagonistes sélectifs des récepteurs muscariniques chez plus d'un tiers des patients porteurs de BPCO, a pu montrer qu'il existe une hypertonie vagale broncho-constrictrice. Cette dernière est liée à une stimulation des fibres parasympathiques par la distension pulmonaire, l'inflammation de la muqueuse et l'irritation due au tabac.

À l'heure actuelle, les moyens thérapeutiques disponibles pour le traitement des patients atteints de la PBCO, en dehors des exacerbations, sont limités. Ils visent pour l'essentiel à réduire le déclin de la fonction pulmonaire.

Durant ces dernières années, plusieurs études ont montré que les flavonoïdes possèdent de remarquables activités biologiques et pharmacologiques, notamment, anti-inflammatoires, anti-oxydantes et anti-tumorales. Les flavonoïdes sont des substances naturelles retrouvées en abondance dans les plantes, les fruits et les légumes.

Après une recherche bibliographiée sur les différentes molécules appartenant à la famille des flavonoïdes, la génistéine et la quercétine sont les molécules d'intérêt retenues par ce travail. Bien qu'on soit loin de tout connaître au sujet de la génistéine et de la

quercétine, leurs multiples effets bénéfiques sur l'organisme ont été observées au cours de nombreuses études *in vitro*, sur des modèles animaux et chez l'homme. La quercétine est un flavonol trouvée naturellement dans une grande variété d'aliments incluant les oignons, les pommes, le thé, certaines graines et des fruits oléagineux comme les noix. La génistéine est le principal isoflavone trouvée dans les produits de soja. Ces deux polyphénols ont fait l'objet de douzaines de rapports scientifiques au cours de ces trente dernières années. Un grand nombre de preuves indiquent que la quercétine possède de puissantes propriétés antioxydantes, et la génistéine comme chélateur des traces des métaux responsables de la production des espèces oxygénées réactives (EOA). Par ailleurs, la quercétine et la génistéine ont été indiquées dans toutes les situations inflammatoires entre autre l'inhibition de la production des médiateurs de l'inflammation. Actuellement, de nombreux rapports ont fait l'état de l'effet relaxant de la génistéine et de la quercétine sur diverses portions des organes de mammifères.

Avant de présenter les résultats de notre travail, nous présenterons d'abord les principales données de la littérature concernant les connaissances physiopathologiques de la maladie BPCO, ainsi que les principales propriétés biologiques des flavonoïdes.

CHAPITRE I

1. GENERALITE SUR LA BRONCHOPNEUMOPATHIE CHRONIQUE OBSTRUCTIVE

1. 1. Définition

La Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une des maladies pulmonaires les plus répandues et son impact en termes de santé publique est énorme. Elle touche 6% de la population mondiale et représente la quatrième cause de mortalité dans le monde (Lopez et Murray, 1998). L'ATS "American Thoracic Society" et l'ERS "European Respiratory Society" considèrent la BPCO comme une maladie caractérisée par une limitation obstructive partiellement réversible (< 15%) des débits aériens éventuellement accompagnée d'une hyperréactivité bronchique. Cette insuffisance respiratoire s'installe progressivement et est associée à une réponse inflammatoire anormale pulmonaire à des particules ou des gaz nocifs. Le tabagisme constitue le facteur de risque majeur, impliqué dans plus de 80 % des BPCO (Gold, 2006).

La limitation des débits aériens est caractérisée par un trouble ventilatoire obstructif défini par un rapport volume expiré maximal par seconde (VEMS) sur capacité vitale forcée (CVF) inférieur à 70% et sans réversibilité significative. Les manifestations cliniques comprennent une dyspnée d'effort d'apparition et de majoration progressive. L'association à une toux et une expectoration chronique traduit l'existence d'une bronchite chronique associée (Jeffery, 1998). La BPCO est marquée par des épisodes d'exacerbations, impliquant des pathogènes bactériens et/ou viraux dans 80% des cas (Sethi, 2004). La limitation des débits aériens ventilatoires résulte de deux mécanismes distincts, mais souvent associés : l'obstruction des voies aériennes (bronchite chronique obstructive) et la destruction du parenchyme pulmonaire (emphysème) (Barnes, 2000a).

L'obstruction des débits aériens chez les BPCO a été souvent considérée comme étant irréversible. Cependant, un nombre des patients atteints de la BPCO modéré à sévère répondent de façon efficace aux agents broncho-dilatateurs avec des changements significatifs dans la fonction pulmonaire (Brusasco, 2006). Actuellement, il a été bien admis que l'obstruction des débits aériens caractérisant la maladie BPCO soit en fait le résultat de deux composantes irréversible et réversible. La dysfonction du tonus cholinergique représente la voie majeure de l'obstruction réversible des débits aériens (Gross *et al*, 1984, Brusasco, 2006). L'épaississement de la paroi des voies respiratoires et la perte des zones d'attachement entre les voies aériennes et le parenchyme sont les

composantes de l'obstruction bronchique irréversible (Chung, 2005 ; Bergeron *et al*, 2006). Ces changements structuraux irréversibles amplifient le tonus cholinergique bronchique (Brusasco, 2006).

La BPCO constitué un groupe hétérogène de maladies ayant en commun une obstruction irréversible des débits aériens. On exclut dans ce cadre nosologique les pathologies respiratoires ayant également un trouble ventilatoire obstructif irréversible, telles que les bronchectasies, la mucoviscidose et les bronchiolites.

1.2. Aspects anatomopathologies

1.2.1. Bronchite chronique

La bronchite chronique est définie par une toux et une expectoration chronique. Elle est caractérisée par une inflammation de la muqueuse bronchique, une hyperplasie des glandes muqueuses, une hypersécrétion bronchique et une augmentation de la perméabilité épithéliale (MacNee, 2005; Molfino et Jeffery, 2006). La fumée de cigarette favorise la migration des cellules inflammatoires dans l'épithélium et l'hypersécrétion de mucus. Les atteintes des grosses bronches sont faiblement corrélées à la sévérité de l'obstruction évaluée sur le VEMS. A ce titre, la bronchite chronique n'est pas obligatoirement associée à un trouble ventilatoire obstructif, mais en constitué un facteur de risque (Lams *et al*, 2000 ; Shao *et al*, 2004). 30 % des patients atteints de bronchite chronique développent ultérieurement un trouble ventilatoire obstructif. Cependant, les lésions inflammatoires des petites bronches et des bronchioles, présentes dès les stades précoces, sont d'autant plus importantes que la BPCO est sévère. Ces lésions inflammatoires sont caractérisées par l'épaississement de la paroi bronchique et par l'obstruction de la lumière bronchique par un exsudat inflammatoire et muqueux (Molfino *et al*, 2005). L'infiltrat inflammatoire (macrophages, lymphocytes T et B) associé à un remodelage, l'hyperplasie des cellules caliciformes et la métaplasie de l'épithélium, participent à l'obstruction endo-luminale et à l'épaississement de la paroi des petites bronches (Molfino et Jeffery, 2006).

1.2.2. Emphysème

L'emphysème est défini par une distension des espaces aériens et une destruction de leur paroi au-delà de la bronchiole terminale. Ce processus de destruction, avec perte des zones d'attachement bronchiolo-alvéolaires est associée à une fibrose des cloisons inter-alvéolaires (Snider *et al*, 1985 ; Snider, 1989). La destruction élective de la bronchiole respiratoire caractérise l'emphysème centro-lobulaire généralement associé avec le

tabagisme. Tandis que, la destruction de l'ensemble de l'acinus à l'intérieur du lobule secondaire caractérise l'emphysème pan acinaire ou pan lobulaire lié au déficit en α 1-antitrypsine (Kim *et al*, 1991, Szilasi *et al*, 2006). La perte des forces de rétraction élastique explique en partie le trouble ventilatoire obstructif par fermeture des petites voies aériennes lors de l'expiration, limitant ainsi le VEMS. D'autres part, la distension des espaces aériens associée à la fermeture précoce des petites voies aériennes en fin d'expiration, entraîne une augmentation des volumes pulmonaires non mobilisables en fin d'expiration (Vlahovic *et al*, 1999, Snider, 1986).

1.3. Epidémiologie

La prévalence de la BPCO augmente avec l'âge et apparaît dans la grande majorité des cas après 40 ans. Le risque pour un fumeur de développer une BPCO est classiquement estimé à 15-25%, mais pourrait être supérieur (Rennard, 2004). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) prévoit qu'en 2020, la BPCO sera la 3^{ème} cause mondiale de mortalité et la 5^{ème} cause mondiale de morbidité (Hanset *et al*, 2004). L'OMS a estimé la prévalence de la BPCO dans le monde à 9,33 pour 1000 chez les hommes et à 7,33 pour 1000 chez les femmes. Cette prévalence était plus élevée dans les pays industrialisés. En France, la prévalence des BPCO est estimée à 15,5 % chez les hommes et 14,8 % chez les femmes (Molinie, 2003). En Amérique, plus de 26 millions américains souffrent de cette pathologie en 2003 et représente la 4^{ème} cause de mortalité (Mapel *et al*, 2004). Dans les pays à revenu intermédiaire, tels que l'Algérie, la prévalence des BPCO est vraisemblablement sous-estimée, car ces affections ne sont généralement diagnostiquées qu'une fois devenues apparentes sur le plan clinique et déjà passablement avancées. Une étude statistique en Algérie a estimé qu'en 2010 la prévalence de la BPCO serait de 250.000/ 36.000.000 habitants (Zidouni, 2003).

1.4. Facteurs étiologiques

Le tabac est de loin le facteur de risque mis en cause dans 80 % des BPCO. Le tabagisme joue donc un rôle majeur dans le développement de la maladie, mais les facteurs de susceptibilité individuelle au tabagisme ne sont pas clairement élucidés (Barnes *et al*, 2003). Une susceptibilité d'origine génétique est probablement impliquée dans certaines BPCO et a été clairement démontrée pour le déficit en α 1-antitrypsine (α 1-AT) induisant un emphysème de type pan-lobulaire (DeMeo et Silverman, 2004). D'autres mutations génétiques impliquant dans le métabolisme oxydatif comme la glutathion transférase ou

encore dans l'inflammation tel que le TNF- α pourraient constituer des facteurs de risque de la BPCO modéré ou sévère dont leur rôle exacte reste à préciser selon les populations. L'hyperréactivité bronchique, le faible poids à la naissance et les infections respiratoires à l'enfance sont d'autant d'autres facteurs de risque identifiés de faible amplitude que celui du tabac (Joos, 2004). D'autre part, d'autres facteurs environnementaux peuvent agir comme facteur d'initiation ou comme co-facteur associé au tabagisme. Les polluants professionnels minéraux, chimiques ou organiques sont responsables de 20 % des BPCO (Pauwels *et al*, 2001). Des facteurs infectieux bactériens ou viraux sont également probablement impliqués dans la genèse et l'aggravation des BPCO (Chodoch, 1991 ; Saint *et al*, 1995). Enfin la carence en certains éléments nutritionnels, tels que la vitamine C et E, β -carotène et les flavonoïdes, est suggérée par plusieurs études épidémiologiques comme facteur déterminant la BPCO (Barnes, 2003 ; Barnes *et al*, 2003).

Le tabagisme constitue le facteur de risque majeur de la BPCO, la fumée de tabac contient de multiples composants chimiques et oxydatifs qui peuvent être impliqués dans la genèse de l'inflammation caractérisant la BPCO. Ces composants peuvent agir sur plusieurs aspects de la physiopathologie de la BPCO : stimulation de la sécrétion de médiateurs inflammatoires, effet toxique direct sur l'épithélium et la matrice extracellulaire, déséquilibre de la balance protéase-antiprotéase par différents mécanismes et induction d'un stress oxydatif.

Parmi de nombreux composés chimiques, il a été démontré que la fumée de cigarette contient de 0,12 à 20 μ g de lipopolysaccharide (LPS) par cigarette, et que le LPS constitue un élément majeur de l'inflammation induite par la fumée de tabac (Hasday, 1999). Le lipopolysaccharide (LPS) est le constituant principal de la membrane externe des bacilles à Gram négatif et un contaminant ubiquitaire de l'environnement. Le LPS agit comme un puissant agent pro-inflammatoire de type PAMP (pathogen-associated molecular patterns) capable d'induire une réponse immune de type innée par de nombreuses cellules de système immunitaire (Beutler, 2002). Une inflammation liée à une exposition chronique au LPS est associée à la présence d'un afflux de neutrophiles et par la libération des cytokines pro-inflammatoires (Creamer *et al*, 1991)). Les recherches menées dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans la BPCO utilisent le plus couramment le LPS comme modèle d'infection car il permet de reproduire une inflammation caractéristique de la maladie BPCO. La réponse au LPS implique le TLR-4 (Toll-like-Receptor) associé aux molécules CD14 et MD-2 (Hoshino *et al*, 1999 ; Nagai *et*

al, 2002). Le TLR-4 est aussi impliqué, au moins *in vitro*, dans la réponse inflammatoire à la fumée de cigarette (Karimi *et al*, 2006). Dans le tissu pulmonaire, l'expression des récepteurs TLR-4 est ubiquitaire. Ils sont exprimés par les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses des voies aériennes (Shan *et al*, 2006), les macrophages alvéolaires, les cellules dendritiques, les fibroblastes, les mastocytes, les lymphocytes B et T et les cellules endothéliales (Takeda *et al*, 2003).

L'interaction du LPS avec le complexe TLR-4/CD14/MD-2 entraîne une cascade d'activation intracellulaire via le complexe de signalisation du récepteur à l'IL-1, impliquant les protéines adaptatrices MyD88 (myeloid differentiation) et TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6), ainsi que la serine-thréonine-kinase IRAK. De nombreuses kinases sont impliquées dans différentes voies de transduction du signal, notamment des MAP kinases (mitogen-activated protein kinases) telles que ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) et la p38 kinase (Takeuchi, 2000). Cette transduction du signal aboutit à l'induction du codage de multiples gènes des médiateurs inflammatoires (**Figure 1**).

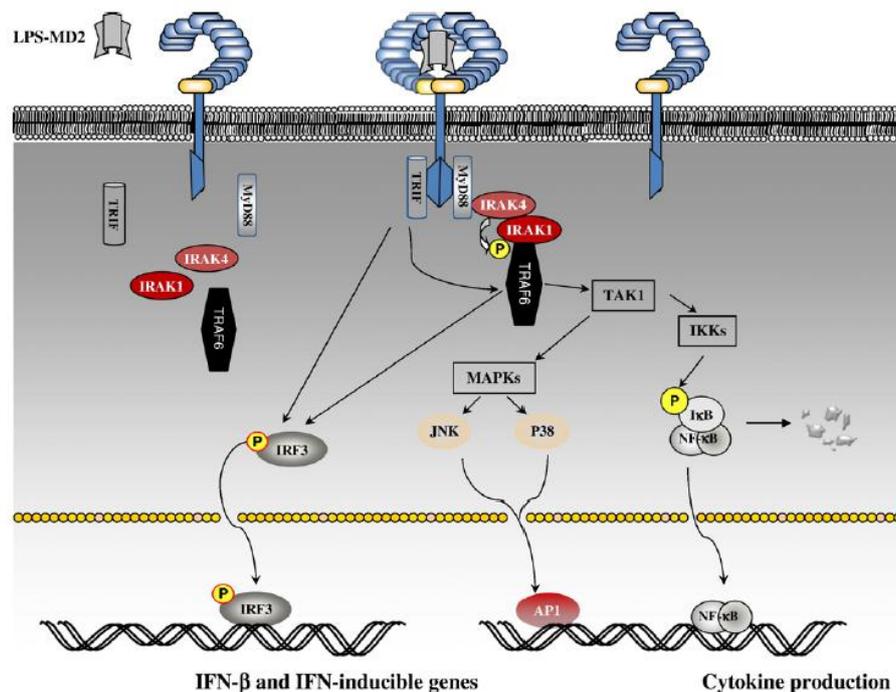


Figure 1 : Mécanismes de transduction du signal induit par l'activation de TLR4 par LPS (Sarir *et al*, 2008).

Au niveau des cellules immunes monocytes/macrophages, une stimulation par 1 ng/ml de LPS induit une réponse inflammatoire caractérisée par une augmentation significative de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8. Au niveau des cellules épithéliales bronchiques, une stimulation par 1-10 µg/ml de LPS est nécessaire pour obtenir une réponse équivalente en terme de production d'IL-8 (Guillot, 2004).

Les monocytes/macrophages expriment fortement le TLR-4 à la membrane. À l'état basal, les cellules épithéliales bronchiques n'expriment pas le TLR-4 sur la membrane, mais il est plutôt présent au niveau intracellulaire. Il a été récemment démontré que l'interaction entre le LPS et le TLR-4 est réalisée au niveau intracellulaire, et active les molécules de transduction du signal ERK1/2, MyD88, IRAK et TRAF6, ainsi que le facteur de transcription NF-κB, aboutissant à la production de médiateurs inflammatoires (Guillot, 2004).

Compte tenu de ces capacités à induire une réponse inflammatoire, le LPS constitue un élément potentiel d'initiation et/ou de maintien de l'inflammation pulmonaire chronique. Chez les sujets sains, l'inhalation expérimentale de LPS entraîne un afflux de cellules inflammatoires et une augmentation de la production de médiateurs inflammatoires au niveau bronchique (Sandstrom, 1992 ; Michel, 1997). De plus, des études épidémiologiques suggèrent que le niveau d'exposition au LPS dans certaines professions constitue un facteur de risque à développer une BPCO (Schwartz, 1995). Chez les souris, l'exposition intratrachéale chronique au LPS entraîne le développement d'une inflammation broncho-pulmonaire de type BPCO (Vernooy, 2002). L'administration intranasale de LPS induit une inflammation pulmonaire intense, accompagnée par l'activation des macrophages et le recrutement des neutrophiles dans l'intertitium, les alvéoles et les voies aériennes de cobayes, de rats et de souris (Haddad et Fahlman, 2002). De plus, l'instillation intrabronchique d'endotoxine se traduit par une réaction inflammatoire en deux phases (O'Grady *et al.*, 2001). Une phase précoce, 2 à 6 heures après l'exposition au LPS, caractérisée par une augmentation dans les liquides LBA, du nombre de neutrophiles et des concentrations de plusieurs cytokines et chimiokines telles que TNF-α et des récepteurs solubles, IL-1β et IL-1RA, IL-6, G-CSF, IL-8, ENA-78, MCP-1, MIP-1α et MIP-1β, mais sans variation des taux d'IL-10 et de GRO-α. Une phase tardive, entre la 24^{ème} et la 48^{ème} heure caractérisée par une augmentation dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire (LBA) du nombre de neutrophiles, de macrophages, de monocytes et de lymphocytes, et par retour au niveau basal après 48 heures de la plupart

des médiateurs mesurés (O'Grady *et al*, 2001). Ces résultats suggèrent que la régulation de la réponse inflammatoire au LPS pourrait constituer un élément impliqué dans la physiopathologie de la BPCO (Risse, 2006).

CHAPITRE II

2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA BPCO

Actuellement, il est devenu évident que la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une affection respiratoire caractérisée par une inflammation chronique responsable de nombreux changements physiopathologiques au niveau des voies aériennes. D'une façon générale, l'inflammation observée dans les poumons de BPCO résulte de l'inhalation de particules et de gaz délétères. La fumée de tabac a la capacité d'induire cette inflammation et d'entraîner par elle-même des dommages directs dans les bronches et le parenchyme pulmonaire. Il est très probable que d'autres facteurs de risque pour la BPCO soient en mesure d'initier un processus d'inflammation similaire, bien qu'en cela, les preuves soient moins convaincantes que pour la fumée de tabac (**Figure 2**).

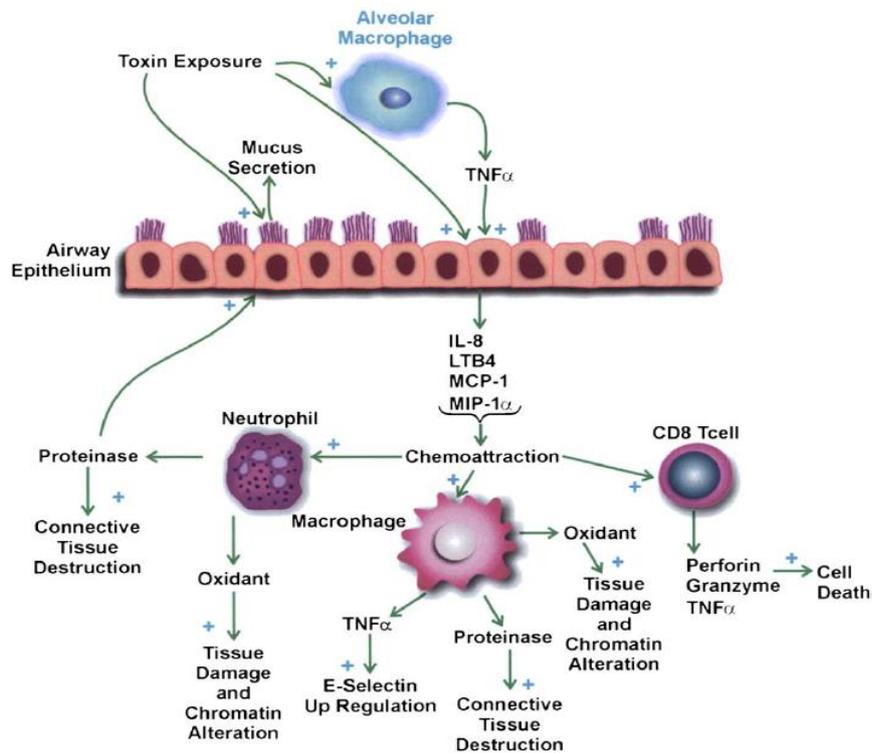


Figure 2 : Les évènements moléculaires et cellulaires durant la pathogénèse de la BPCO (Daheshia, 2005).

2.1. Cellules inflammatoires

2.1.1. Macrophages

Les macrophages, cellules phagocytaires, jouent un rôle central dans la pathophysiologie de la BPCO ou ils comptent pour la plupart des caractéristiques connues de la maladie (**Figure 3**). A l'état normal, ils tapissent la surface épithéliale alvéolaire. Chez les patients porteurs de la BPCO, leur nombre est élevé de 5 à 10 fois dans les voies aériennes, parenchyme pulmonaire, le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LBA) et dans les expectorations. Chez les emphysemateux, le nombre de macrophage est augmenté de 25 fois dans le parenchyme et l'espace alvéolaire en comparaison avec les fumeurs sains (Retamales *et al*, 2001). En outre, ces cellules ont été localisées dans les régions de destruction alvéolaire (Finkelstein *et al*, 1995 ; Meshi *et al*, 2002). L'infiltrat macrophagique est en corrélation avec la sévérité de la maladie BPCO (DiStefano *et al*, 1998). Sous l'effet de la fumée de cigarette, les macrophages libèrent des médiateurs inflammatoires, y compris le TNF- α , IL-8, LTB₄ et autres chimiokines CXC tel que MCP-1 (monocyte chemotactic peptide-1) et les espèces oxygénées activées. Les macrophages activés libèrent également un arsenal d'enzymes à activité élastolytique : des métalloprotéinases (Punturieri *et al*, 2000 ; Russell *et al*, 2002). La majorité des protéines sécrétées par les macrophages sont sous contrôle du facteur de transcription nucléaire- κ B (NF- κ B). Le NF- κ B est activé dans les macrophages des patients ayant la BPCO particulièrement durant l'exacerbation (Di Stefane *et al*, 2002 ; Caramori *et al*, 2003).

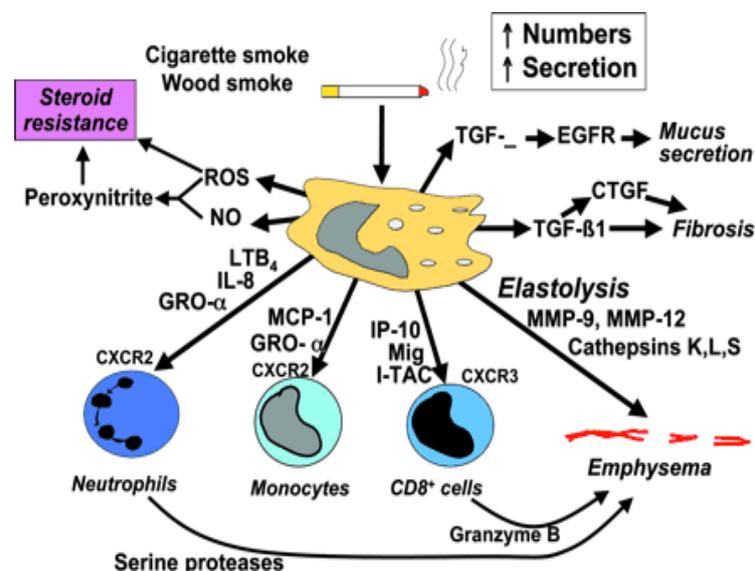


Figure 3 : Rôle du macrophage dans la BPCO (Barnes, 2003).

2.1.2. Polymorphonucléaires neutrophiles (PMN)

Les PMN représentent l'élément clef de la réaction inflammatoire. Les PMN ou neutrophiles ont la capacité de synthétiser différents médiateurs comme les prostaglandines, les thromboxanes, le leucotriène B4 et le PAF et sont également une source des espèces oxygénées activées (EOA). Considérés autrefois comme les principales cellules mises en cause dans la BPCO, les PMN jouent un rôle encore discuté dans la pathogenèse. Ils semblent pourtant nombreux dans le liquide de LBA et les expectorations des sujets (Lacoste *et al*, 1993 ; Keatings *et al*, 1996) mais relativement faible dans les voies aériennes et le parenchyme des maladies porteuses de la BPCO comparativement aux sujets sains (Finkelstein *et al*, 1995). Ceci revient éventuellement à leur migration rapide à travers ces secteurs pulmonaires (Selby et MacNee, 1993). Le recrutement des PMN vers les voies aériennes et le parenchyme implique leur adhésion aux cellules endothéliales où la selectine-1 est surexprimée dans les voies aériennes des patients BPCO (Di Stefano *et al*, 1994). Les PMN s'adhèrent puis migrent vers le système respiratoire suivant un gradient de molécules chimiotactiques dont l'IL-8 et le LTB4 ont une part importante dans cette étape chimiotactique. De plus la survie des neutrophiles peut être prolongée par les cytokines comme GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) et G-CSF (granulocyte colony stimulating factor). La fumée de cigarette stimule la libération de GM-CSF et de G-CSF par les macrophages pulmonaires ce qui pourrait, d'une part entraîner la production et la libération des polynucléaires (Terashima *et al*, 1997), et d'autre part favoriser la rétention des neutrophiles dans les poumons (MacNee *et al*, 1989). Bien que, la présence des neutrophiles ne soit pas une caractéristique prééminente de l'inflammation pulmonaire caractérisant la BPCO, la neutrophilie des voies aériennes est liée à l'hypersécrétion du mucus dans le cas d'une bronchite chronique. Les sérine protéases libérées par les neutrophiles comme l'élastase, cathepsine G et protéinase-3, stimulent potentiellement la sécrétion du mucus des glandes submuqueuses et des cellules caliciformes dans l'épithélium (Sommerhoff *et al*, 1990 ; Witko-Sarsat *et al*, 1999). Toutefois, le déclin de la fonction respiratoire et la sévérité de la pathologie sont en corrélation avec le nombre des PMN dans les biopsies bronchiales et l'expectoration induite (DiStefano *et al*, 1998 ; Keatings *et al*, 1996). La présence significative des protéines granulaires telles que, la myéloperoxydase et la lipocaline neutrophilique dans le surnageant des expectorations des patients ayant la BPCO témoignent de la présence des PMN activés dans les voies respiratoires (Keatings et Barnes, 1997 ; Yamamoto *et al*,

1997 ; Peleman *et al*, 1999). Par ailleurs, l'élévation de la flambée respiratoire est proportionnelle au degré de la limitation des débits aériens (Richards *et al*, 1989). Les PMN sont fortement impliqués dans la destruction et l'altération tissulaire, notamment via la synthèse et la libération des protéases et des oxydants.

2.1.3. Lymphocytes T

Ces cellules immunocompétentes ont un rôle important dans l'initiation et le maintien de l'inflammation dans les voies respiratoires. Le nombre total des lymphocytes T particulièrement le sous-groupe CD8⁺ est élevé dans les voies aériennes périphériques et centrales des patients BPCO (Retamales *et al*, 2001 ; Saetta *et al*, 1999 ; Majo *et al*, 2001). Le degré de la destruction alvéolaire et la sévérité de l'obstruction des débits aériens sont en corrélation avec le nombre total des cellules T (Majo *et al*, 2001). Les lymphocytes T peuvent être divisés en deux sous-types, les Tc1 (produisant l'interféron) et les Tc2 (produisant l'IL-4). Dans les biopsies bronchiques de BPCO, la majorité des cellules T sont de type Tc1 (Saetta *et al*, 2002). L'intérêt physiopathologique des cellules T dans la BPCO reste à préciser et celui des CD4⁺ est à présent mal élucidé (Retamales *et al*, 2001). Une possibilité est que ces cellules acquièrent une mémoire immunologique en lui permettant d'entretenir le processus. La présence des cellules CD8⁺ est associée à l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaire via la libération des perforines, granzyme-B et TNF- α (Hashimoto *et al*, 2000).

2.1.4. Eosinophiles et Mastocytes

Ces sont les cellules clés de l'inflammation chez l'asthmatique. Aucune augmentation de l'éosinophilie pulmonaire dans le cas BPCO n'a été décrite dans toutes ces études (Lacoste, 1993 ; Saetta *et al*, 1997 ; Turato *et al*, 2001). La présence des éosinophiles dans les voies aériennes des patients BPCO est prédictive d'une réponse à la corticothérapie et pourrait refléter la coexistence d'un asthme (Brightling *et al*, 2000 ; Papi *et al*, 2000). L'augmentation du nombre d'éosinophiles a été rapportée dans les biopsies bronchiques et les liquides de LBA durant les exacerbations et les bronchites chroniques (Saetta *et al*, 1994 ; Saetta *et al*, 1996). Un événement surprenant est que malgré l'absence visible d'éosinophiles, le taux de protéines basiques d'éosinophiles (ECP) dans le LBA (Kim *et al*, 2002) et dans l'expectoration induite est augmenté chez les BPCO que chez les asthmatiques (Keatings *et al*, 1997 ; Yamamoto *et al*, 1997 ; Gursel *et al*, 1997). Bien que normalement associée avec l'activité chimiotactique des neutrophiles, IL-8 exerce un effet

chimiotactique sur les éosinophiles pré-activés et corrèle avec le taux de la ECP dans le liquide de LBA des patients avec une bronchite chronique (Riise *et al*, 1995).

L'aptitude des mastocytes à libérer une variété des médiateurs, un rôle non négligeable leur était attribué dans l'inflammation caractérisant la BPCO. Ceci pourrait inclure le recrutement des PMN via la libération des facteurs chimiotactiques, lésions tissulaires sous l'action des enzymes secrétés tryptase, chymase et elastase, et l'hypersécrétion via l'action secretagogue potentiel de la chymase mastocytaire (Sommerhoff *et al*, 1989). Les études sur les biopsies bronchiques des patients BPCO ont révélé l'abondance des mastocytes (Grashoff *et al*, 1997 ; Pesci *et al*, 1994). En outre la dégranulation des mastocytes est activement prononcée au niveau de la couche de la glande bronchiale des sujets avec une bronchite chronique que chez les sujets sains (Pesci *et al*, 1994).

2.1.5. Cellules dendritiques

Ce sont les principales cellules immunitaires permettant le lien entre l'immunité innée et la réponse immune spécifique (Banchereau *et al*, 2000). Dans l'appareil respiratoire, elles sont localisées sous l'épithélium des voies aériennes et sous la membrane basale, dans le poumon et la plèvre. Une localisation idéale pour la capture de toute substance étrangère inhalée (Holt et Stumbles, 2000). Les cellules dendritiques peuvent activer une variété des cellules immunes et inflammatoires, y compris les macrophages, les PMN et les lymphocytes T et B (Huang *et al*, 2001). Il est donc vraisemblable que la cellule dendritique joue un rôle important dans la réponse pulmonaire à la fumée de cigarette et aux autres agents toxiques inhalés (**Figure 4**). Le nombre des dendrites est augmenté dans les poumons des rats exposés à la fumée de la cigarette (Zeid et Muller, 1995) et dans les voies aériennes et les parois alvéolaires des fumeurs (Casolaro *et al*, 1988 ; Soler *et al*, 1989). Chez les souris exposées à la fumée de cigarette, l'augmentation des cellules dendritiques est observée dans les voies aériennes et le parenchyme pulmonaire (D'Hulst *et al*, 2002). Implication des cellules dendritiques dans le recrutement des autres cellules effectrices dans la maladie BPCO pourraient constituer un des éléments clé de la BPCO et mérite davantage d'étude.

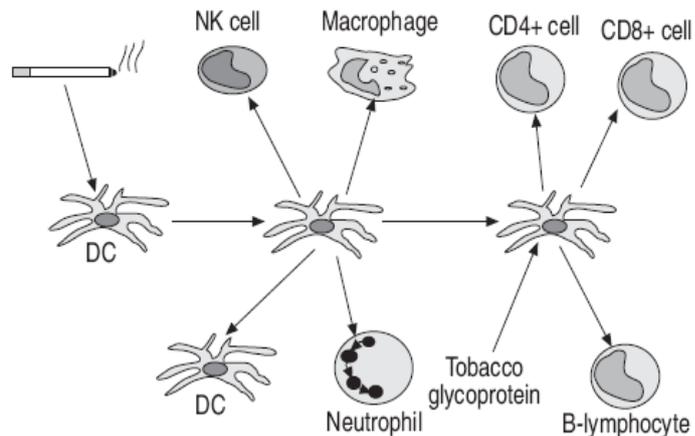


Figure 4 : Rôle des cellules dendritiques dans la physiopathologie de la BPCO (Barnes *et al*, 2003).

2.1.6. Cellules épithéliales

De nombreuses cellules contrôlent les processus qui mettent en place et pérennisent l'inflammation pulmonaire, caractéristique principale de nombreuses maladies des voies aériennes. Parmi ces cellules, celles constituant l'épithélium pulmonaire jouent un rôle crucial dans la pathogenèse de la BPCO. En effet, les cellules épithéliales ne forment pas seulement une barrière passive mais en réponse à la fumée de cigarette, elles produisent et sécrètent de nombreuses molécules effectrices dans le site inflammatoire tels que le TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, et IL-8 (Mio *et al*, 1997 ; Hellermann *et al*, 2002).

Ces cellules épithéliales jouent également un rôle important dans la protection des voies aériennes en sécrétant des antioxydants ainsi que des antiprotéases (Pilette *et al*, 2001). Le mucus produit par les cellules caliciformes piège les bactéries et les particules inhalées (Adler et Li, 2001). La fumée de cigarette ou d'autres agents nocifs, pourraient affecter ces systèmes de défenses et augmenter le risque d'infection.

Les cellules épithéliales contribuent aussi au phénomène de remodelage tissulaire. Dans les voies aériennes, les cellules épithéliales constituent une source essentielle de TGF- α , et capable ainsi d'induire une fibrose locale (Takizawa *et al*, 2001). Le VEGF (vascular-endothelial growth factor) semble nécessaire au maintien des cellules épithéliales en vie, et le blocage des récepteurs VEGF (VEGFR2) chez les rats induit l'apoptose des

cellules alvéolaires et la formation d'emphysème (Kasahara *et al*, 2000). Dans le cas d'une bronchite chronique et BPCO, l'épithélium des voies aériennes montre souvent une métaplasie squameuse résultant d'une prolifération accentuée des cellules épithéliales. Cependant, l'expression des récepteurs aux facteurs de croissance sur les cellules épithéliales bronchique des fumeurs pourrait favoriser la prolifération cellulaire, entraîner la formation de métaplasies squameuses et augmenter le risque de carcinomes bronchiques (Franklin *et al*, 2002).

2.2. Profil des médiateurs inflammatoires

Dans la BPCO, l'analyse des condensats d'expiration, des expectorations et de liquide de LBA, a montré l'élévation du taux des médiateurs inflammatoires en comparaison avec les sujets non fumeurs. Ces médiateurs ont des effets délétères au niveau des voies respiratoires conduisant au recrutement des cellules inflammatoires, bronchoconstriction, changement vasculaire, sécrétion du mucus, et changements structuraux affectant les voies aériennes et le parenchyme pulmonaire (**Figure 5**). L'implication thérapeutique visant à bloquer la génération ou les récepteurs de ces médiateurs pourrait avoir des effets cliniques bénéfiques.

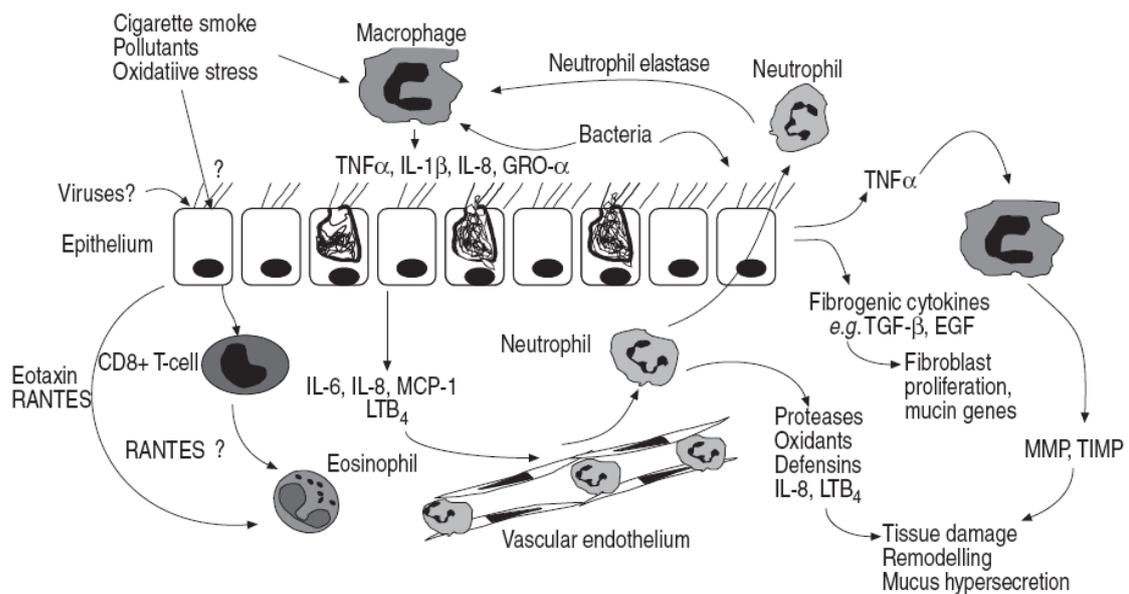


Figure 5 : Les interactions cellules-cytokines durant l'inflammation de voies aériennes dans la pathogénèse de la BPCO (Chung, 2001).

2.2.1 Médiateurs lipidiques

Le taux des prostaglandines PGE2 et PGF2 α est augmenté dans les condensats d'expiration des patients atteints de la BPCO (Moutuschi *et al*, 2003). La PGE2, un bronchodilatateur des voies aériennes humaines, inhibe la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (Meja *et al*, 1997) et l'acétylcholine par les fibres cholinergiques (Spicuzza *et al*, 1998). De plus, la PGE2 potentialise l'action anti-inflammatoire des inhibiteurs des phosphodiesterases de type 4, molécules actuellement en développement dans le traitement de la BPCO (Au *et al*, 1998). A coté de son effet protecteur, La PGE2 possède des effets délétères en stimulant la production de mucus et l'expression des gènes MUC5A et MUCB (Borchers *et al*, 1999) et favorise la toux en sensibilisant et en activant les fibres sensorielles (Lee *et al*, 2002). La PGF2 α , un bronchoconstricteur, est capable aussi d'induire une toux en activant les fibres sensorielles (Nichol *et al*, 1990). Dans les macrophages alvéolaires, ces PG sont synthétisés via la voie de cyclooxygénase-2 (COX-2) dont l'expression est augmentée chez les BPCO (Taha *et al*, 2000).

Le leucotriène B4 (LTB $_4$), un puissant chimioattractant des neutrophiles par le biais d'activation des récepteurs BLT1, est principalement produit par les macrophages et les neutrophiles via la voie de phospholipase A2 (Shamsuddin *et al*, 2003). La concentration de LTB $_4$ est augmentée dans les condensats d'expiration et dans les expectorations des patients atteints de la BPCO notamment lors d'exacerbations (Biernacki *et al*, 2003). Les antagonistes du récepteur BLT1 inhibent l'attraction de neutrophiles de 25% dans les expectorations des patients BPCO, laissant entrevoir le potentiel thérapeutique de ces molécules, sans pour autant négliger la contribution d'autres facteurs chimioattractants (Crooks *et al*, 2000 ; Beeh *et al*, 2003a).

2.2.2. Médiateurs peptidiques

Dans les expectorations et les liquides de LBA de patients BPCO, la concentration d'endothéline-1 (Et-1) est augmentée (Chalmers *et al*, 1999 ; Bacakoglu *et al*, 2003), particulièrement durant les périodes d'exacerbations (Roland *et al*, 2001). Bien que le rôle physiopathologie de ce peptide dans la BPCO reste encore à justifier, mais il semble qu'il contribue au remodelage vasculaire associé avec l'hypertension hypoxique pulmonaire (Giaid *et al*, 1993). Les antagonistes tachykinines bloquent la sécrétion du mucus induite

par la fumée de cigarette, justifiant le potentiel thérapeutique de ces molécules et ainsi l'intérêt physiopathologique des tachykinines dans la BPCO (Barnes, 2002).

2.2.3. Cytokines

Les cytokines sont des molécules de signalisation extracellulaire dont le poids moléculaire est généralement inférieure à 80 kDa et sont produits par de nombreuses cellules immuno-inflammatoires et résidentes. Elles exercent des effets soit localement par des mécanismes auto- ou paracrines et parfois à distance (endocrines). Schématiquement, les cytokines sont catégorisées en lymphokines (cytokines Th₁ induisent une réponse immune cellulaire et Th₂ induisent une réponse immune humorale), cytokines proinflammatoires, les chimiokines (cytokines chimioattractants), cytokines anti-inflammatoires et les facteurs de croissance.

2.2.3.1. Cytokines proinflammatoires

- ***Tumor necrosis facteur (TNF- α)***

Au niveau pulmonaire, les sources cellulaires résidentes de TNF- α sont majoritairement les macrophages alvéolaires et les cellules de l'épithélium respiratoire (pneumocytes de type II) (Lasky et Brody, 2000). La production de TNF- α par les monocytes et les macrophages est induite par différents facteurs dont l'IL-1, le GM-CSF et l'IFN γ . Le TNF- α agit par le biais de deux récepteurs distincts, le sTNF-R55 et le sTNF-R75 (Tartaglia et Goeddel, 1992). Chez les patients atteints de BPCO, des taux élevés de TNF- α sont retrouvés dans les condensats d'expiration et les expectorations notamment durant l'exacerbation (Keatings *et al*, 1996, Vernooy *et al*, 2002). Cette augmentation est associée à celle de ses récepteurs solubles, sTNF-R55 dans les expectorations et sTNF-R75 dans le plasma (Vernooy *et al*, 2002). Des études réalisées avec des souris KO déficientes pour le récepteur membranaire du TNF- α suggèrent que cette cytokine serait responsable de 70% d'emphysème induit par la fumée de cigarette (Churg *et al*, 2004).

Le TNF- α produit par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales bronchiques induit une augmentation de la production d'IL-8 et des autres chimiokines *via* l'activation de facteur de transcription nucléaire (NF- κ B), principal facteur de transcription des gènes de l'inflammation (Devalia *et al*, 1994). Cette cytokine active simultanément la P38 MAP kinase qui participe également à l'activation d'une batterie de gènes et interagit avec la voie du NF- κ B. Le TNF- α produit conduit à l'activation des neutrophiles, des monocytes, des macrophages et des cellules épithéliales bronchiques, à la sécrétion de

mucus et à la destruction du parenchyme pulmonaire en stimulant la libération de radicaux libres et de protéases (**Figure 6**). De plus, TNF- α joue un rôle important dans la fibrose de l'épithélium pulmonaire, en favorisant l'accumulation des fibroblastes et en régulant le métabolisme du collagène (Tufvesson et Westergen-Thorsson, 2000). Produit par les macrophages et les mastocytes infiltrants, le TNF- α agit de façon précoce sur les cellules de l'épithélium respiratoire, lesquelles libèrent un ensemble complexe de médiateurs. Entre autre le PGDF qui contribue à la bronchoconstriction par activation des cellules du muscle lisse, (Shah *et al*, 1995). Les effets pro-inflammatoires du TNF- α soulignent l'intérêt physiopathologique de cette cytokine dans la BPCO et par conséquent la thérapie anti- TNF- α serait une des approches dans le traitement de la BPCO.

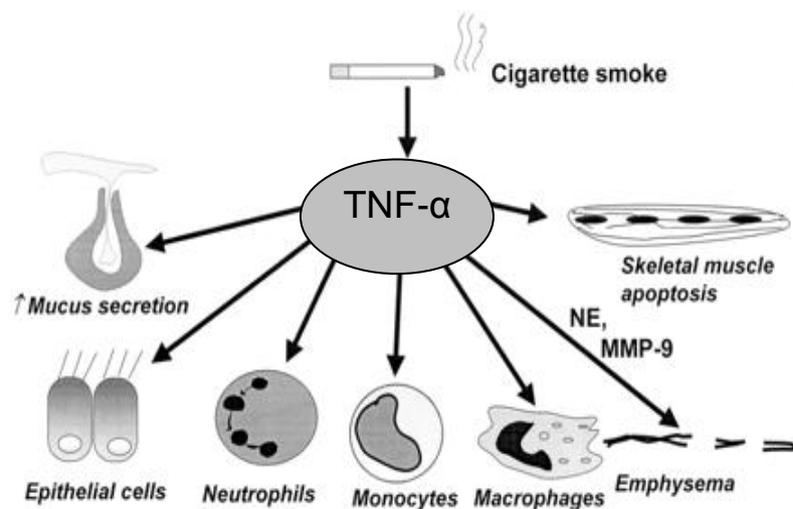


Figure 6 : Rôle central de TNF- α dans l'entretien de la réponse inflammatoire dans la BPCO (Barnes, 2004a).

- **Interleukine-1 β (IL-1 β)**

Les effets de l'IL-1 β , un puissant activateur des macrophages alvéolaires chez les BPCO, sont relativement semblables à ceux de TNF- α (Russell *et al*, 2002). Les cellules épithéliales bronchiques de patients BPCO en culture, stimulées par la fumée de cigarette libèrent plus de l'IL-1 β que les cellules de sujets normaux (Rusznak *et al*, 2000). L'IL-1 β favorise l'hyperleucocytose en stimulant la libération de neutrophiles par la moelle osseuse. Cette cytokine induit aussi l'expression vasculaire de molécule d'adhésion intercellulaire (ICMA-1) en favorisant ainsi l'adhésion des neutrophiles et des éosinophiles à

l'endothélium vasculaire et l'épithélium respiratoire. Elle favorise également la prolifération des fibroblastes, augmente la sécrétion de prostaglandines et de collagénase et augmente la synthèse de la fibronectine et du collagène (Chung, 2001). Par ailleurs l'IL-1 β contribue également à la bronchoconstriction par la diminution de l'expression et de la fonction du récepteur muscarinique M₂ couplés à la protéine Gi (Hakonarson *et al*, 1996). Par ailleurs, rôle de l'IL-1 β dans le développement de l'emphysème a été étudié. Après vingt un jours de l'instillation intra-trachéale d'elastase pancréatique du porc sur différentes souris KO, pour les récepteurs de type 1 à l'IL-1 β , type 1 et 2 au TNF- α et pour la combinaison des récepteurs au TNF- α et à l'IL-1 β , l'emphysème était réduit chez toutes les souris KO en comparaison avec les souris sauvages. La délétion combinée des récepteurs au TNF- α et à l'IL-1 β s'est montrée la plus efficace, suggérant ainsi que l'IL-1 β et TNF- α participent de façon importante et synergique à la pathogénèse dans ce modèle murin d'emphysème (Lucey *et al*, 2002).

- ***Interleukine-10 (IL-10)***

La concentration d'IL-10 est réduite dans les expectorations des patients BPCO (Barnes, 2001). Cependant, il n'est pas encore clair si la production d'IL-10 est relativement réduite dans les macrophages des patients BPCO en amplifiant dans ce cas l'inflammation. Néanmoins, sa production et son expression sont augmentées dans les macrophages des fumeurs sains (Lim *et al*, 2000) et dans les biopsies bronchiques des patients BPCO, respectivement (Panzner *et al*, 2003). Son large spectre d'effets anti-inflammatoire lui confère un intérêt thérapeutique potentiel dans le traitement de la BPCO dont la majorité de ces effets sont médiés par l'inhibition de NF- κ B (Williams *et al*, 2004).

- ***Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)***

La concentration de GM-CSF est élevée dans le liquide LBA particulièrement durant la période d'exacerbation (Balbi *et al*, 1997). GM-CSF participe à l'activation et à la prolongation de la durée de vie des neutrophiles en potentialisant l'inflammation neutrophilie. La production spontanée ou induite de GM-CSF par les macrophages alvéolaires ne semble pas différente entre les patients BPCO et les fumeurs sains, ou une augmentation sensible de TNF- α , IL-8 et MMP-9 est observée (Culpitt *et al*, 2003a). De plus la sécrétion de GM-CSF est réprimée par les corticoïdes tandis que d'autres cytokines paraissent corticoïdes-résistantes (Barnes, 2004a).

- ***Autres cytokines pro-inflammatoires***

Dans le liquide LBA et dans le plasma des patients BPCO, l'IL-6 est retrouvé à des niveaux élevés dans les condensats d'expiration, notamment durant les périodes d'exacerbation (Song *et al*, 2001 ; Bucchioni *et al*, 2003). Les monocytes des patients BPCO libèrent plus d'IL-6 en réponse à la stimulation avec LPS que les cellules des sujets normaux (Aldonyte *et al*, 2003).

Dans les biopsies bronchiques des patients BPCO, l'IL-9 et l'IL-13 et d'IL-12 sont fortement exprimées. La surexpression d'IL-9 et d'IL-13 est associée avec une hypersécrétion du mucus chez les fumeurs que chez les fumeurs asymptomatiques (Miotto *et al*, 2003, Reader *et al*, 2003 ; Di Stefano *et al*, 2004). La surexpression de l'IL-13 et d'IFN- γ dans les poumons murins emphysémateux est liée à une augmentation d'expression des MMPs et des cathepsines (Zheng *et al*, 2000). Enfin, le polymorphisme du promoteur du gène codant pour l'IL-13 est fréquemment présent dans la BPCO (van der Pouw Kraan *et al*, 2002).

Dans les poumons murins, la surexpression d'IFN- γ est associée au développement d'un emphysème (Wang *et al*, 2000). Dans les biopsies bronchiques des patients BPCO, l'IFN- γ est surexprimée (Di Stefano *et al*, 2004). Les cellules T exprimant l'IFN- γ , c'est-à-dire les Th1 et les Tc1 sont retrouvées en quantité importante dans les expectorations des patients BPCO (Tzanakis *et al*, 2004).

2.2.3.2. Chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines de poids moléculaire comprise entre 8-10 kDa et sont capables d'attirer les leucocytes vers les tissus enflammés. Les quatre familles de chimiokines (CC, CXC, Cm, CX₃C) se distinguent en fonction de la structure d'un motif conservé, riche en résidus cystéines, localisée sur la portion N-terminale. Les deux familles majeure sont les chimiokines CC (chimiokines β) caractérisées par la succession de deux cystéines et les chimiokines CXC (chimiokines α) dont les deux cystéines sont séparées par un acide aminé non conservé (X). Les chimiokines orchestrent la réponse inflammatoire et immune en régulant la migration des cellules inflammatoires et immunes vers les tissus cibles (Olson et Ley, 2002).

- **Interleukine-8 (IL-8)**

Le niveau d'IL-8 est augmenté dans les expectorations induites et liquides LBA des patients BPCO et corrélés avec la proportion de neutrophiles. Cette augmentation est accentuée dans les expectorations durant les périodes d'exacerbations et contribue probablement à l'augmentation de neutrophiles et la purulence des expectorations (Aaron *et al*, 2001 ; Gompertz *et al*, 2001). La concentration d'IL-8 est sensiblement plus élevée chez les fumeurs emphysemateux que les fumeurs sans obstruction bronchique. En revanche, les concentrations des autres chimiokines de la même famille CXC ne semblent pas significativement distinctes entre ces deux groupes (Tanino *et al*, 2002).

Dans la BPCO, la source cellulaire d'IL-8 est encore incertaine. Cependant, les cellules épithéliales des voies aériennes sécrètent l'IL-8 en réponse à divers stimuli comme les cytokines telles que le TNF- α , IL-1 β et les produits bactériens tels que le lipopolysaccharide (LPS), certains virus, le stress oxydatif et l'extrait de fumée de cigarette (Kwon *et al*, 1994 ; Johnston *et al*, 1998 ; Schulz *et al*, 2004). De façon intéressante, la stimulation des cellules épithéliales bronchiques en culture et les macrophages alvéolaires des patients BPCO produisent plus d'IL-8 que les cellules des fumeurs sains (Culpitt *et al*, 2003). En outre, la production basale d'IL-8 des cellules épithéliales bronchiques et bronchiolaires est plus élevée chez les patients BPCO (Profita *et al*, 2003 ; Schulz *et al*, 2003). La sécrétion d'IL-8 est contrôlée par différentes voies de régulation transcriptionnelle la voie p38 MAP kinase et la voie ERK (Wang *et al*, 2003) et par plusieurs facteurs de transcription principalement NF- κ B (**Figure 7**). La MMP-9 est capable d'augmenter l'activité de l'IL-8 en clivant une partie de la portion N-terminale (Van Den Steen *et al*, 2000).

L'IL-8 agit via deux récepteurs : CXCR1, un récepteur strictement spécifique pour l'IL-8 mais de faible affinité et CXCR2 avait une haute affinité mais avec une large spécificité dont il partage avec d'autres CXC (**Figure 8**). Le récepteur CXCR1 induit la libération des médiateurs et des protéases tandis que le récepteur CXCR2 est impliqué dans la réponse chimiotactique des neutrophiles et des monocytes. Dans les cellules épithéliales bronchiques des patients BPCO, CXCR2 est surexprimée notamment durant les exacerbations aiguës et son expression est corrélée avec le nombre de neutrophiles (Qiu *et al*, 2003).

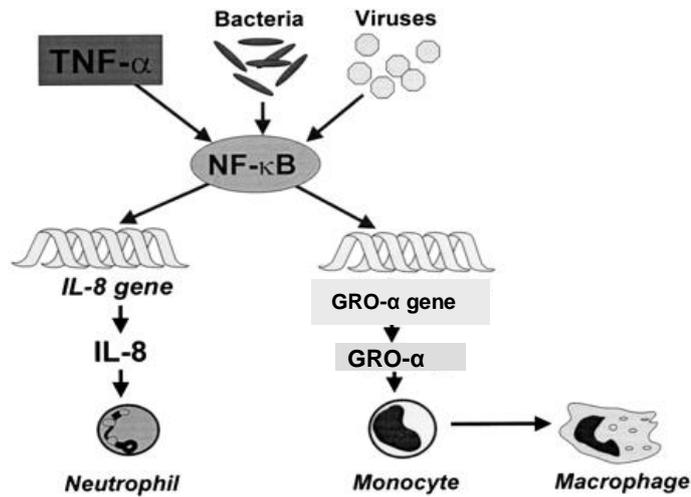


Figure 7 : Rôle central du NF-κB dans la régulation des gènes des chimiokines : IL-8 et GRO-α (Barnes, 2004a).

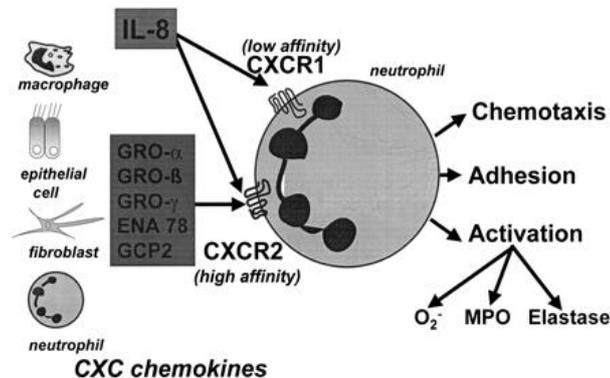


Figure 8 : Récepteurs de chimiokines CXC sur le neutrophile (Barnes, 2004a).

La neutralisation d'IL-8 par un anticorps anti-cette cytokine réduit l'activité chimioattractante des neutrophiles dans les expectorations des patients BPCO (Crooks *et al*, 2000 ; Beeh *et al*, 2003a). Cette réduction est approximativement d'ordre 30% indiquant la contribution d'autres facteurs chimioattractants. L'inhibition d'IL-8 ne peut être à elle seule une stratégie thérapeutique suffisante dans la répression de l'inflammation dans le tractus respiratoire (Yang *et al*, 1999). Cependant l'antagonisme du récepteur CXCR2 est une des stratégies thérapeutiques efficaces. Actuellement, de petites molécules inhibitrices du récepteur CXCR2 sont en développement clinique pour le traitement des BPCO (white *et al*, 1998 ; Hay et Sarau, 2001).

- ***Growth –Related Oncogène- α (GRO- α)***

Le GRO- α (CXCL1) est une chimiokine sécrétée par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales de voies aériennes en réponse à une stimulation par du TNF- α et de l'IL-17 (**Figure 8**) (Prause *et al*, 2003 ; Schulz *et al*, 2004). Le GRO- α active les neutrophiles, monocytes, basophiles et les lymphocytes T via le récepteur CXCR2 (**Figure 9**) (Geiser *et al*, 1993). Les cellules épithéliales des patients BPCO sécrètent plus de GRO- α que celles des fumeurs sains (Schulz *et al*, 2004). La concentration de GRO- α est importante dans les expectorations induites et dans le liquide LBA des patients BPCO en comparaison avec les fumeurs sains et les non-fumeurs (Traves *et al*, 2002). Chez les patients BPCO, l'activité chimioattractante de monocytes est augmentée en réponse à GRO- α et pourrait être un des mécanismes responsable de l'augmentation de nombre de macrophages alvéolaires dans les poumons des patients BPCO (Retamales *et al*, 2001).

- ***Chimiokines des lymphocytes T CXC3 (Mig, IP-10 et I-TAC)***

Les cellules T dans les voies respiratoires périphériques des patients BPCO montrent une surexpression de CXCR3, un récepteur activé par une protéine interféron-inductible (IP-10, CXCL10), une monokine interféron-inductible (Mig, CXCL9), et cellule-T chimioattractant interféron-inductible (I-TAC, CXCL11). Toutes ces trois cytokines activent le récepteur CXCR3 (Clark-Lewis *et al*, 2003). L'intérêt physiopathologique des cellules CD8⁺ dans la BPCO est encore incertain, ayant la capacité de produire la perforine et la granzyme, un rôle apoptotique de l'épithélium alvéolaire et des cellules endothéliales lui est cependant attribué et par lequel contribue au développement de l'emphysème (Majo *et al*, 2001 ; Cosio *et al*, 2002) (**Figure 9**).

- ***Monocytes Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)***

MCP-1 (CCL2) appartient à la famille des chimiokines CC capables d'activer le récepteur CCR2 sur les monocytes et lymphocytes T (Rose *et al*, 2003). Dans la BPCO, les niveaux de MCP-1 sont retrouvés élevés dans les expectorations, le liquide LBA et le poumon. Le MCP-1 est un puissant chimioattractant de monocytes et des macrophages et pourrait contribuer dans ce contexte au développement de la BPCO. L'activité chimioattractante induite par les expectorations des patients BPCO est abrogée par un anticorps anti-récepteur CCR2. Vu le rôle critique des macrophages dans la BPCO, le blocage des récepteurs CCR2 pourrait constituer une stratégie thérapeutique de grand intérêt dans le traitement de la maladie BPCO (Barnes, 2004).

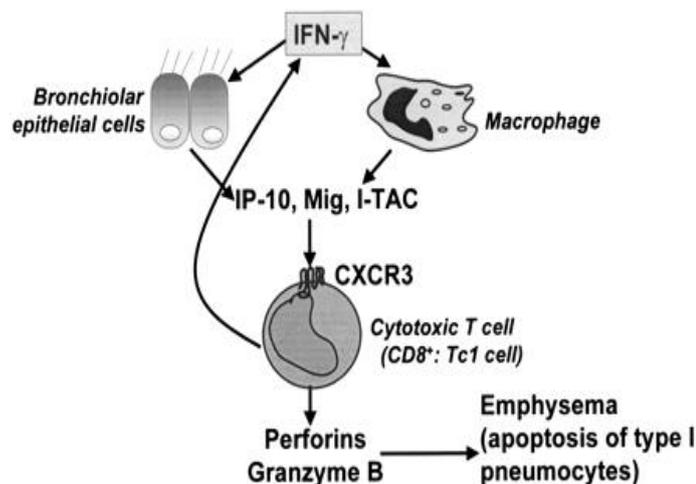


Figure 9 : Chimiotactisme des cellules T cytotoxique (CD8+) *via* l'activation de récepteur CXCR3 par les chimiokines Mig, IP-10 et I-TAC. Les cellules CD8+ libèrent la perforine et la granzyme B responsable en partie de l'apoptose des cellules alvéolaires et libèrent également l'IFN- γ , qui à son tour active la libération des chimiokines (Barnes, 2004a).

- ***Macrophage-Inflammation-Protein (MIP)***

MIP- 1 β (CCL4) est libérée par les macrophages et possède une activité chimioattractante pour les monocytes et les neutrophiles via le récepteur CCR1. Une corrélation négative est observée entre le taux de MIP- 1 β et le VEMS chez les patients soufferts d'une bronchite chronique. Cependant dans le liquide LBA, les niveaux de MIP- 1 β sont significativement élevés chez les patients atteints de la bronchite chronique que les fumeurs asymptomatique (Capelli *et al*, 1999).

- ***Chimiokines spécifiques des cellules dendritiques (MIP-3 α)***

Dans le poumon des rats exposés à la fumée de cigarette, le nombre des cellules dendritiques est augmenté (Muller *et al*, 1995 ; D'Hulst *et al*, 2002). Cette augmentation est confirmée dans les voies aériennes et les parois alvéolaires des fumeurs (Casolaro *et al*, 1988 ; Soler *et al*, 1989). MIP-3 α (CCL20) est un puissant chimioattractant des cellules dendritiques immatures via le récepteur CCR6 et est exprimée sur les cellules épithéliales bronchiques en réponse à l'IFN- γ (Reibman *et al*, 2003).

- ***Eosinophil-Selective chemokines (RANTES et eotaxine)***

Comme précédemment décrit, bien que les éosinophiles ne soient pas les cellules inflammatoires prédominante dans la BPCO, leur nombre est augmenté dans les voies aériennes et le poumon. Leur attraction est médiée par plusieurs chimiokines via le récepteur CCR3 exprimé majoritairement sur ces cellules. Dans la BPCO, peu d'éosinophile et de la protéine basique majeure (MBP) sont retrouvés dans les expectorations et le liquide LBA dont le nombre est augmenté durant les exacerbations de la bronchite chronique (Saetta *et al*, 1994 ; Pesci *et al*, 1998). RANTES (CCL5) est une chimiokine fortement exprimée sur les cellules épithéliales bronchiques des patients atteints de la bronchite chronique en exacerbation (Zhu *et al*, 2001). Eotaxin (CCL11) et son récepteur CCR3 sont surexprimés dans les bronches des patients atteints de la bronchite chronique en exacerbation dont leur taux est en corrélation positive avec le nombre des éosinophiles (Bocchino *et al*, 2002).

2.2.4. Facteurs de croissance

Dans la BPCO, les changements structuraux retrouvés dans les petites voies aériennes et le parenchyme pulmonaire sont probablement les conséquences d'une inflammation chronique et de la libération des facteurs de croissance responsables de la fibrose et de la prolifération cellulaire.

2.2.4.1 .Transforming Growth Factors (TGF- β 1)

Chez les patients BPCO, l'expression de TGF- β 1 est augmentée dans l'épithélium de petites voies aériennes et des macrophages alvéolaires (de Boer *et al*, 1998 ; Takizawa *et al*, 2001) suggérant l'implication de TGF- β 1 dans la fibrose de petites voies aériennes (de Boer *et al*, 1998 ; Takizawa *et al*, 2001). De plus les monocytes sanguins périphériques des patients BPCO sécrètent de TGF- β 1 (Hodge *et al*, 2003). Dans le tissu pulmonaire périphérique des patients BPCO, l'expression de TGF- β 1 est en corrélation avec le 4-hydroxy-4-nonenal, un marqueur de stress oxydatif (Rahman *et al*, 2002). Chez l'homme, l'expression de TGF- β 1 est prononcée dans la lignée cellulaire épithéliale et pendant les infections latentes adénovirus associées avec la BPCO. En réponse au TGF- β 1, le collagène tissue growth factor (CTGF), médiateur de la fibrose, est libéré (Ogawa *et al*, 2004). Le TGF- β 1 est sécrété sous une forme latente inactive et devienne biologiquement active après clivage protéolytique, via la MMP-9, de TGF-binding protein-1 (**Figure 10**). Par ce mécanisme, la MMP-9 pourrait être un lien entre la destruction des fibres élastiques et

l'induction simultanée de la fibrose par l'activation de TGF- β 1 (Dallas *et al*, 2002). Dans la lignée cellulaire épithéliale, le TGF- β 1 inhibe la transcription de gène des récepteurs β 2-adrenergiques (Takeyama *et al*, 2001), en réduisant ainsi la réponse bronchorelaxante du muscle lisse aux β 2-mimétiques (Ishikawa *et al*, 2003). Actuellement, plusieurs molécules inhibitrices des récepteurs TGF- β 1 sont en cours de développement et ces antagonistes pourraient être un moyen efficace de prévenir la fibrose des petites voies aériennes caractéristique de la BPCO.

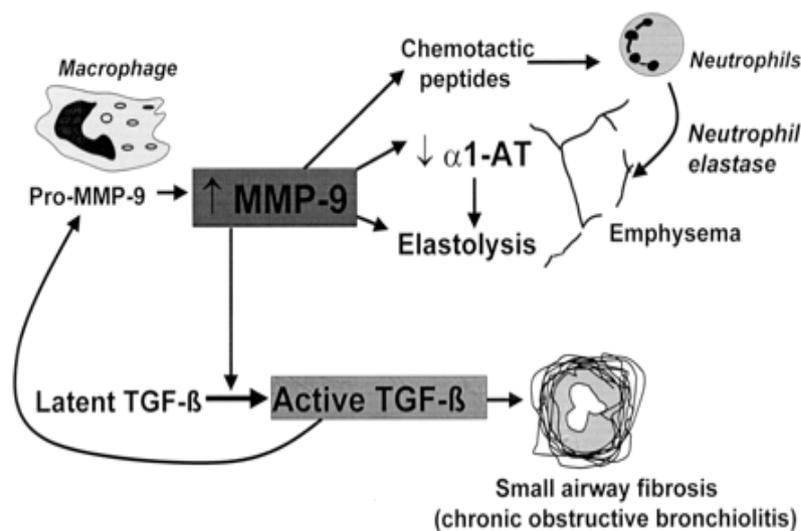


Figure 10 : Relation entre fibrose de petites voies aériennes et emphyseme dans la BPCO.

TGF- β activé par la MMP-9 induit la destruction alvéolaire et inactive aussi l' α 1-AT amplifiant ainsi les effets de l'élastase de neutrophile attiré par les peptides générés par l'action protéolytique de MMP-9 (Barnes, 2004a).

2.2.4.2. Transforming Growth Factors (TGF- α) et Epidermal Growth Factor (EGF)

Le TGF- α et l'EGF agissent via le récepteur tyrosine kinase EGFR. L'activation de récepteur EGFR est le déterminant principal de la régulation de l'expression des gènes de la mucine, la sécrétion de mucus et la différenciation de la sécrétion à mucus (Nadel et Burgel, 2001). Le stress oxydatif et la fumée de cigarette sont à l'origine d'une hypersécrétion de mucus via le récepteur EGFR (Takeyama *et al*, 2001, Basbaum *et al*, 2002) (**Figure 11**). Dans les cellules épithéliales des voies aériennes, la fumée de cigarette active l'enzyme de conversion de TNF- α dont il résulte l'activation de TNF- α et du

récepteur EGFR et par conséquent une hypersécrétion de mucus (Shao *et al*, 2004). Actuellement, des inhibiteurs de récepteur tyrosine kinase EGFR, comme le géfitinib, sont en développement pour le traitement des cancers pulmonaires (Wakeling, 2002). Ces antagonistes semblent être tolérables et ainsi seront un traitement suitable de l'hypersécrétion de mucus observée dans la BPCO.

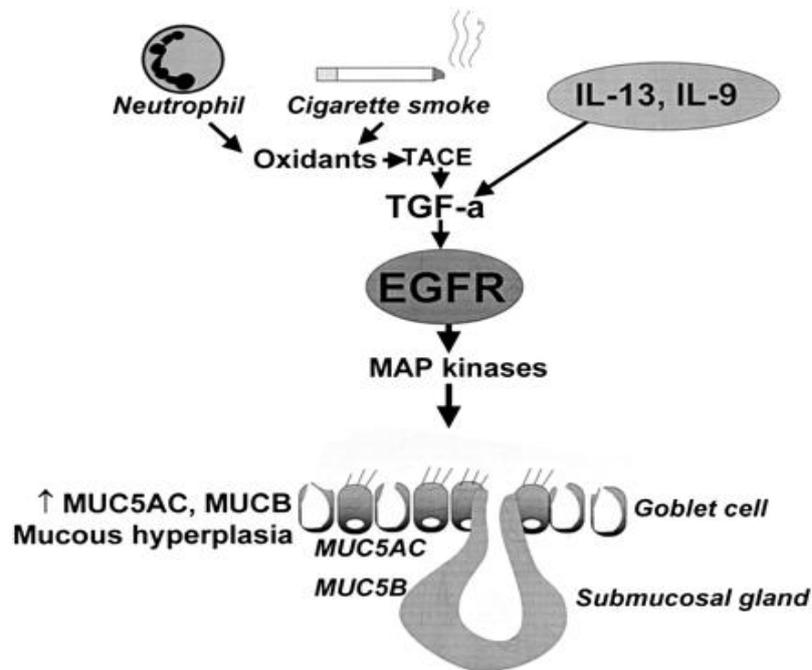


Figure 11 : Rôle central de récepteur EGFR dans la régulation de la sécrétion de mucus en augmentant l'expression des gènes MUC5C et MUCB, la différenciation de cellules caliciformes et l'hyperplasie des cellules à mucus (Barnes, 2004a).

2.2.4.3. Vascular-Endothelial Growth Factor (VEGF)

Le VEGF est surexprimé dans les muscles lisses vasculaires pulmonaires des patients avec BPCO modérée, mais il est paradoxalement réduit chez les BPCO avec emphysème (Santos *et al*, 2003). L'utilisation chez les rats d'un inhibiteur sélectif des récepteurs VEGF induit l'apoptose des cellules endothéliales alvéolaires et conduit par conséquent à la formation d'un emphysème (Kasahara *et al*, 2000) . De façon intéressante, la concentration de VEGF est augmentée dans les expectorations induites des patients asthmatiques et avec bronchite chronique (Kanazawa *et al*, 2003).

2.2.4.4. Fibroblast Growth Factors (FGF)

Les membres de la famille des facteurs de croissances FGFs sont impliqués dans la cicatrisation. Chez les patients BPCO, FGF-1, FGF-2 et leurs récepteurs est surexprimés par les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules épithéliales pulmonaires périphériques (Kranenburg *et al*, 2002). La surexpression de FGF est particulièrement en corrélation avec l'importance du remodelage vasculaire (Hokuto *et al*, 2003).

2.3. Stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. Actuellement, le stress oxydatif est un autre élément potentiellement impliqué dans la physiopathologie de la BPCO (**Figure 12**). Le stress oxydatif est augmenté dans la BPCO, notamment en cas d'exacerbation (Repine *et al*, 1997 ; MacNee, 2001). Dans les voies aériennes des patients BPCO, les cellules résidentes tels que les cellules épithéliales et plus particulièrement les cellules inflammatoires activées, comme les neutrophiles, éosinophiles, macrophages, sont une source importante des EOA (MacNee, 2001). L'activation membranaire des neutrophiles est traduite par une hyperréactivité métabolique caractérisée par la consommation excessive de l'oxygène. Cette consommation de l'oxygène est liée essentiellement à la production de l'anion superoxyde (O_2^-) ; par un système enzymatique NADPH-oxydase membranaire. La génération de l' O_2^- serait à l'origine de la formation des autres EOA. Ce processus est connu sous le nom de la flambée respiratoire (Beckman et Koppenol, 1996). L' O_2^- généré est dismuté soit spontanément ou en présence du superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La majorité de l' H_2O_2 produit est convertie en acide hypochloreux (HOCl) en présence des anions chlorures Cl^- via la myeloperoxydase (MPO), une enzyme majeure des granules azurophiles des neutrophiles (van der Vliet *et al*, 1999; Winterbourn, 2000). L'HOCl est capable de détruire les tissus, en s'attaquant aux principaux composés cellulaires, protéines, lipides, sucres et l'ADN via des réactions d'oxydation et de chlorination (Kirkham et Rahman, 2006).

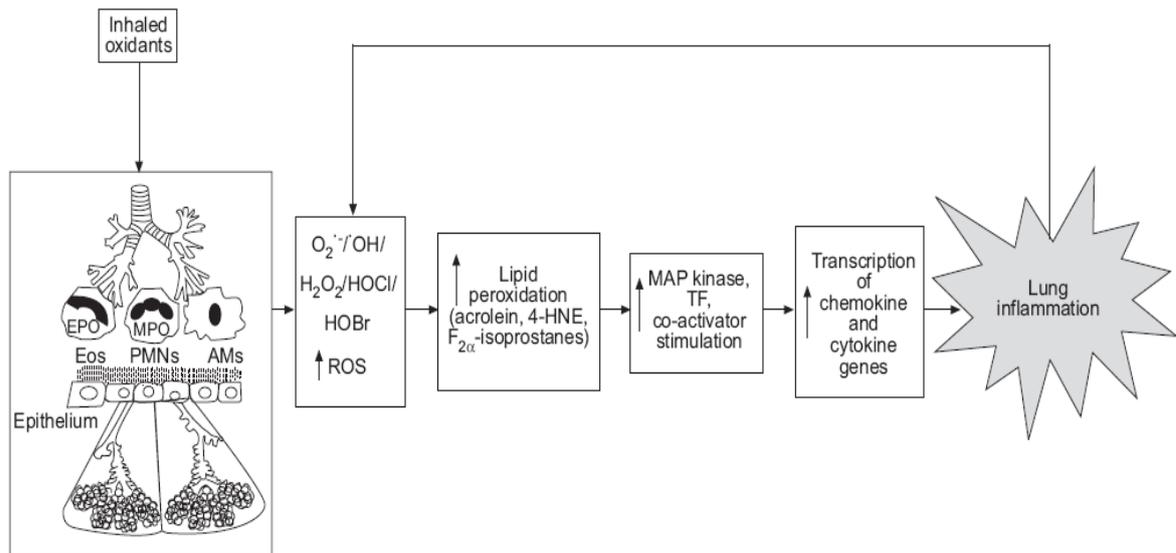


Figure 12 : Stress oxydatif dans la BPCO. Le stress oxydatif joue un rôle clé dans la physiopathologie de la BPCO et amplifie les processus de destruction et de l'inflammation (Rahman et Adcock, 2006).

En effet, une production excessive de cet oxydant peut être à l'origine des lésions tissulaires lors de l'inflammation aiguë ou chronique notamment dans l'emphysème pulmonaire (Cochrane *et al*, 1983). La myéloperoxydase joue un rôle important dans le stress oxydatif qui peut conduire à l'oxydation de l'acide arachidonique et à la formation d'une nouvelle série de prostanoides, appelés isoprostanes (Morrow, 2000), ayant des effets bronchoconstricteurs et inducteurs d'exsudation plasmatique par la stimulation des récepteurs du thromboxane A2. Les concentrations de la MPO sont élevées et l'enzyme active se retrouve dans les alvéoles en corrélation avec le nombre de neutrophiles et d'autres produits de la dégranulation de ces cellules (élastase, lactoferrine), et en corrélation avec une activité oxydante des liquides de lavage alvéolaire (Cochrane *et al*, 1983 ; Eiserich *et al*, 1998 ; Mathy-Hartert *et al*, 2000). De nombreux travaux ont montré l'impact de l'HOCl sur les défenses anti-oxydantes et anti-protéases. Le glutathion réduit (GSH) , un composé important de la balance oxydo-réductrice cellulaire, est oxydé par HOCl en dérivés (notamment une sulfonamide cyclique) qui ne peuvent plus être ramenés au stade de GSH par la GSH réductase, entraînant une chute du GSH, une diminution des

défenses antioxydantes et une perturbation de l'équilibre oxydo-réducteur (Winterbourn et Brennan, 1997). Par ailleurs, chez les fumeurs avec la bronchite chronique, la réduction de la CVF est en corrélation avec la diminution du taux GSH dans les lavages pulmonaires (Repine *et al*, 1997). L' HOCl oxyde pratiquement tous les acides aminés en aldéhydes qui deviennent des composés actifs au site inflammatoire (Hazen *et al*, 1998) et détruit les antiprotéases comme l' $\alpha 1$ -protéinase inhibiteur et l' $\alpha 2$ -macroglobuline permettant à l'élastase libre de se retrouver dans les liquides de LBA (Cochrane *et al*, 1983 ; Suter *et al*, 1992). Chez les cochons d'indes, la stimulation des cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires inactive l' $\alpha 1$ -antitrypsine en présence de la myéloperoxydase (Wallaert *et al*, 1993). En outre, dans les lavages pulmonaires des fumeurs et des patients BPCO, l'activité inhibitrice de l' $\alpha 1$ -antitrypsine est à moitié inactive (Maier *et al*, 1992). L' HOCl agit encore au site inflammatoire en activant des enzymes latentes comme la progélatinase et la procollagénase, activation qui conduit à une fragilisation du squelette protéique et à la destruction des tissus connectifs (Weiss *et al*, 1985 ; Hawkins et Davies, 1998). Bien que les chloramines, les produits de la réaction de l' HOCl avec les amines, sont moins oxydants, leur stabilité leur confère une longue demi-vie et ainsi une capacité de propager le dommage distal de site de génération de l' HOCl (Carr *et al*, 2001). La réactivité de l' HOCl est intermédiaire entre le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) et le peroxydite (ONOO^-) dans l'ordre suivant $\text{ONOO}^- < \text{HOCl} < \cdot\text{OH}$ (**Figure 13**).

En plus de la source endogène, le tractus respiratoire est également exposé à des oxydants exogènes. Dans la BPCO, le stress oxydatif est principalement issu de la fumée de cigarette dont elle constitue une source hautement riche en EOA (Pryor et Stone, 1993; MacNee, 2001). Des études épidémiologiques ont indiqué qu'un régime alimentaire pauvre en antioxydant peut être un déterminant de la maladie BPCO. Par exemple, une carence en acide ascorbique a été associée au déclin de la fonction respiratoire (Britton *et al*, 1995 ; Schunemann *et al*, 2001). En outre, plusieurs études ont pu montré l'augmentation des marqueurs de stress oxydatif dans les condensats d'expiration des patients BPCO comme H_2O_2 , le 8-isoprostane et l'éthane (Kharitonov et Barnes, 2001 ; Paredi *et al*, 2002). Un marqueur spécifique de la peroxydation des lipides, le 4-hydroxyl-2-nonenal a été détecté par immunohistochimie dans le poumon des patients avec BPCO et est en corrélation avec l'obstruction bronchique (Rahman *et al*, 2002).

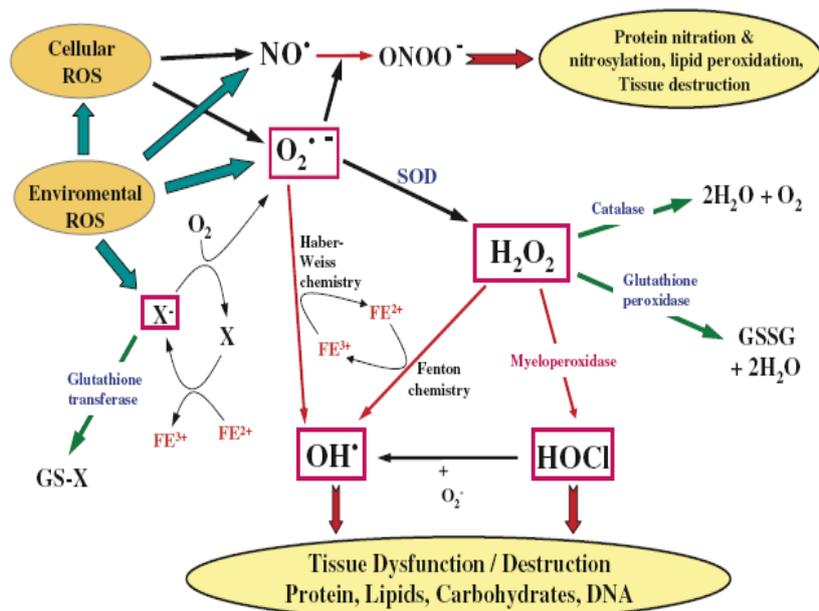


Figure 13 : Les conséquences moléculaires du stress oxydatif (Kirkham et Rahman, 2006).

Plusieurs effets ont été attribués aux EOA dans les voies aériennes, entre autre l'amplification de la réponse inflammatoire et l'induction des lésions sur l'épithélium. Ces effets peuvent être médié directement par l'action des EOA sur les cibles cellulaires, mais aussi indirectement via l'activation de voies de transduction et de certains facteurs de transcription comme le NF- κ B, régulant la production de cytokines pro-inflammatoires (Janssen-Heininger *et al*, 2000). De plus, les EOA peuvent diminuer l'activité des facteurs anti-protéasiques tels que le α 1-AT et SLPI et accélérer la destruction des composantes de la matrice extracellulaire, l'élastine et collagène (Taggart *et al*, 2000). En outre, les EOA contribuent à l'augmentation de la production de mucus, de la bronchoconstriction et de l'œdème en rapport avec la production d'isoprostanes (kawikova *et al*, 1996 ; Ohru *et al*, 1991 ; Spicuzza *et al*, 2001). La faible réponse des BPCO aux corticostéroïdes est probablement la conséquence du déséquilibre de la balance anti-oxydants : oxydants chez ces patients (**Figure 14**). Le stress oxydatif perturbe la liaison des récepteurs des glucocorticoïdes sur l'ADN et leur translocation du cytoplasme vers le noyau (Hutchison *et al*, 1991 ; Okamoto *et al*, 1999). Ceci en réduisant l'activité de l'histone deacétylase (HDAC2), enzyme responsable de l'inhibition de l'expression des gènes inflammatoires, et

par conséquent rehausse la réponse inflammatoire (Ito *et al*, 2000, 2001 ; Barnes *et al*, 2003).

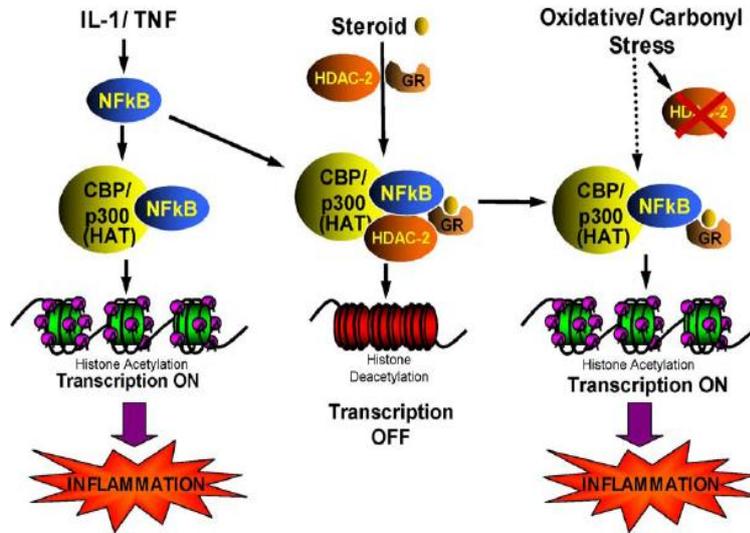


Figure 14 : Impact du stress oxydatif sur la régulation de la structure de la chromatine et de l'expression des gènes pro-inflammatoires (Kirkham et Rahman, 2006).

2.4. Protéases

Depuis longtemps les protéases sont considérées responsables de la destruction des composantes du tissu conjonctif, particulièrement l'élastine dans le parenchyme pulmonaire, conduisant ainsi au développement de l'emphysème. Un déséquilibre de la balance protéases:anti-protéases endogènes est en faveur des effets médiés par les protéases (**Figure 15**). L'élastine semble la cible la plus importante pour ces enzymes, sa dégradation s'accompagne de la perte de l'élasticité du parenchyme pulmonaire et de la destruction des espaces alvéolaires. Une évidence de la dégradation d'élastine est fournie par l'augmentation de l'excrétion du desmosine chez les fumeurs, un marqueur spécifique dans les pontages trouvés dans l'architecture de l'élastine, avec le déclin rapide de la fonction pulmonaire en comparaison avec les sujets sains (Gottlieb *et al*, 1996). Bien qu'une attention soit focalisée sur l'élastase neutrophilique, plusieurs autres protéases ont également la capacité de dégrader l'élastine (Stockley, 2001).

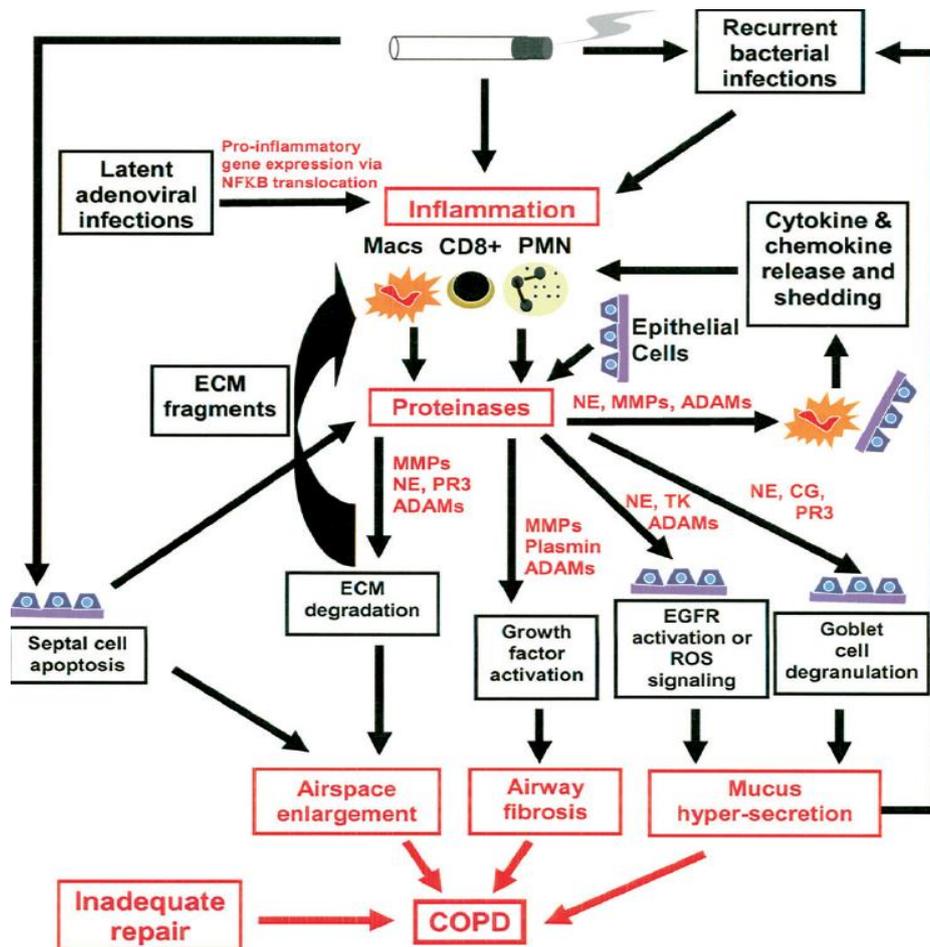


Figure 15 : Mécanismes de lésions pulmonaires médiés par les protéases (Owen, 2005).

2.4.1. Elastase du neutrophile

Une importance est accordée à l'elastase du neutrophile (EN) depuis l'observation clinique de l'apparition prématurée d'un emphysème chez les patients génétiquement déficients en α 1-antitrypsine. Par ailleurs, l'inactivation de l' α 1-antitrypsine par la fumée de cigarette a soulevé la possibilité de l'importance de l'EN chez les fumeurs dont l'activité α 1-antitrypsine est normale. Dans le même contexte, sur des modèles animaux, l'instillation intratracheale de l'EN induit l'emphysème et l'infiltration de neutrophiles dans le parenchyme (Senior *et al*, 1977). Par la technique immunohistochimique, l'elastase a été détectée sur les fibres d'élastine du parenchyme pulmonaire des patients avec

l'emphysème (Damiano *et al*, 1986). Dans le liquide LBA, la concentration du complexe NE/ α 1- antitrypsine est augmentée chez les patients BPCO (Yoshioka *et al*, 1995), et est en corrélation avec le déclin du VEMS (Betsuyaku *et al*, 2000).

L'exposition des cobayes à la fumée de cigarette, un inhibiteur de l'EN réduit sensiblement l'emphysème et la réponse inflammatoire neutrophilie (Wright *et al*, 2002). Les souris KO pour l'EN sont significativement protégées contre le développement d'emphysème provoqué par la fumée de cigarette avec diminution du nombre de neutrophiles dans le poumon (Shapiro *et al*, 2003). Les neutrophiles stockes aussi deux autres serine protéases, cathepsine G et protéinase 3, dans leurs granules spécifiques. Ces serine protéases ont des propriétés similaires à l'EN et induisent la sécrétion de mucus dans une voie similaire (Witko-Sarsat *et al*, 1999).

2.4.2. Cystéine-protéases

Les cystéines protéases lysosomiales, les cathepsines, peuvent aussi impliquées dans la pathogenèse de la BPCO (Turk *et al*, 2001). L'expression de la cathepsine S est induite par l'interféron- γ (IFN- γ) par plusieurs types de cellules, y compris les cellules musculaires lisses. Le développement de l'emphysème, provoqué chez les souris par une surexpression de l' IFN- γ , est associé à une augmentation de l'expression des cathepsines B, D, H, L, et S (Wang *et al*, 2000). Les inhibiteurs des cathepsines réduisent considérablement l'emphysème induit chez les souris transgéniques en IL-13 indiquant le potentiel élastolytique des cathepsines (Zheng *et al*, 2000). La concentration de la cathepsine L est augmentée dans le fluide LBA des patients emphysémateux (Takeyabu *et al*, 1998), et la sécrétion de cystéine-protéase est plus importante par les macrophages alvéolaires des patients BPCO comparativement avec les fumeurs sains et les non fumeurs (Russell *et al*, 2002a). Peu est connu quant au rôle des inhibiteurs endogène des cathepsines, cystatines et stéfines, dans la maladie BPCO. Une étude a pu montré que la concentration de la cystatine est élevée dans le fluide LBA des patients atteints de la BPCO (Takeyabu *et al*, 1998).

2.4.3. Métalloprotéinases matricielles (MMPs)

Les MMPs constituent une vaste famille de protéinase zinc-dépendantes et participent dans la régulation et la destruction des composantes de la matrice extracellulaire (Stamenkovic, 2003). Il est actuellement bien reconnu que les MMPs interviennent dans le développement de la BPCO et jouent un rôle comme médiateurs de

la sécrétion des cytokines, chimiokines et des facteurs de croissance (Shapiro et Senior, 1999). En effet l'inhibiteur de MMP, marimastat, a montré que les MMPs comptent pour la majorité de l'activité élastolytique libérée par les macrophages alvéolaires des patients BPCO (Russell *et al*, 2002b). Chez les patients emphysémateux, l'expression de MMP-1 (collagénase) et MMP-9 (gélatinase B) est augmentée dans les macrophages et leurs concentrations dans le liquide LBA (Finlay *et al*, 1997 ; Culpitt *et al*, 1999). Par ailleurs, l'augmentation de l'activité de MMP-9 dans le parenchyme et les macrophages alvéolaires est en corrélation avec le VEMS et la consommation du tabac (Kang *et al*, 2003). La concentration de MMP-9 et le rapport MMP-9 : TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase) est augmentée dans les expectorations induites des patients BPCO (Beeh *et al*, 2003b). L'expression de MMP-1 est augmentée dans le poumon des patients emphysémateux avec une localisation prédominante sur les pneumocytes de type II (Imai *et al*, 2001).

L'implication évidente de la MMP-9 dans la BPCO suggère l'intérêt de l'utilisation des inhibiteurs dans la prévention de l'emphysème (Belvisi et Bottomley, 2003). Un inhibiteur non sélectif de MMP est capable d'empêcher le développement de l'emphysème chez les cobayes exposés à la fumée de cigarette (Selman *et al*, 2003). Cependant, l'utilisation des inhibiteurs non sélectifs, tel que le marimastat, est accompagnée par des effets secondaires indésirables sur le muscle squelettique. Il paraît donc nécessaire d'augmenter la sélectivité des antagonistes ou de cibler plus particulièrement le parenchyme pulmonaire. La concentration de la MMP-9 circulante est réduite chez les emphysémateux traités avec l'acide rétinoïque (Mao *et al*, 2003). D'autres approches autour de la MMP-9 peuvent aussi être envisagées, comme la réduction de son expression dans les cellules pulmonaires ou l'utilisation thérapeutique des TIMPs.

2.5. Obstruction réversible des débits aériens dans la BPCO

L'efficacité de la thérapie anticholinergique chez les patients BPCO soutient le concept que la dysfonction du tonus cholinergique représente la voie majeure de l'obstruction réversible des débits aériens (Belmonte, 2005 ; Brusasco, 2006). L'épaississement de la paroi des voies respiratoires et la perte de l'interdépendance entre les voies aériennes et le parenchyme, les composants de l'obstruction bronchique irréversible, amplifient le tonus cholinergique bronchique (Brusasco, 2006).

2.5.1. Innervation pulmonaire

L'arbre bronchique est richement innervé par les nerfs afférents et efférents du système nerveux autonome (Barnes, 2004b). Les voies respiratoires sont sous contrôle de deux composants principaux du système nerveux autonome: le système nerveux sympathique et le système nerveux parasympathique. Les fibres efférentes du nerf vague sont distribuées au niveau des muscles lisses et des glandes bronchiques. Cette innervation prédomine au niveau des grosses voies aériennes et diminue en périphérie avec aucune innervation au niveau petites voies aériennes et du parenchyme. Elles ont un rôle bronchoconstricteur et représentent le principal système de contrôle neurologique du tonus et des sécrétions bronchiques (Barnes *et al*, 1983, Barnes, 2004b).

Les fibres de type cholinergiques constituent l'innervation excitatrice prédominante dans les voies respiratoires (Belmonte, 2005). Le neurotransmetteur associé à ce système neuronal est l'acétylcholine (ACh), une molécule ayant la capacité de se fixer autant aux récepteurs de type muscarinique qu'aux récepteurs nicotiniques (Belmonte, 2005). Via les récepteurs muscariniques, l'ACh assure une activité régulatrice sur le tonus bronchique, la contraction du muscle lisse bronchique, sécrétion du mucus, et la vasodilatation (Gosens *et al*, 2006). Les fibres cholinergiques ne sont pas la seule source d'ACh pulmonaire, les cellules épithéliales, les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes et même les cellules musculaires lisses expriment l'acétylcholine transférase (AChT), enzyme responsable de la synthèse d'ACh (Wessler *et al*, 1998). La libération de l'ACh par les cellules épithéliales est augmentée sous l'effet des médiateurs inflammatoires. Ceci pourrait être un mécanisme important de la contribution de l'ACh extraneuronale dans l'obstruction des voies aériennes périphériques ayant rapport avec la maladie BPCO. Par ailleurs l'ACh est impliqué dans le remodelage des voies aériennes associée avec l'inflammation chronique (Gosens *et al*, 2004a).

2.5.1.1. Récepteurs muscariniques

Les récepteurs muscariniques appartiennent à la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Il existe 5 différents récepteurs (M1, M2, M3, M4 et M5) qui possèdent tous des fonctions bien distinctes (Caulfield et Birdsall, 1998). De nombreuses cellules possèdent ce type de récepteur pour l'ACh à leur surface, tant les cellules neuronales que les cellules non-neuronales telles que les macrophages, les lymphocytes, les mastocytes, les muscles lisses ou les cellules épithéliales (Koyama *et al*,

1992). Dans les voies respiratoires, 3 sous-types de récepteurs muscariniques ont été identifiés, M2 et M3 sur les muscles lisses et les M1 et M2 sur les ganglions et les nerfs parasympathiques (Van koppen *et al*, 1987 ; Barnes, 1993). Le schéma classique de la localisation de chaque sous-type de récepteur et de sa fonction dans la régulation de tonus bronchique est montré dans la **figure16**. La neurotransmission cholinergique au niveau des ganglions parasympathiques est régulée par les récepteurs nicotiniques en conjonction avec les récepteurs M1 (Bernheim *et al*, 1992 ; Barnes, 2004b). Au niveau des terminaisons nerveuses parasympathique, la libération d'ACh est régulée par les récepteurs M2 fonctionnant en un mode d'auto-feedback inhibiteur qui prévient la libération supplémentaire d'ACh (Fryer *et al*, 1998 ; Racke *et al*, 2004). Sur le muscle lisse bronchique, les récepteurs M2 couplés à la protéine G α i fonctionnent en inhibant la synthèse et l'accumulation de l'AMPc selon un mode qui s'oppose à la voie de relaxation médiée par les récepteurs β 2-adrénorécepteurs (**Figure 17**). Les récepteurs M3 sont les seuls impliqués dans la contraction des muscles lisses bronchiques et dans la production de mucus en réponse à l'acétylcholine (Roffel *et al*, 1990 ; Barnes, 2004b). Les agonistes des récepteurs muscariniques induisent la contraction bronchique via deux voies : Ca⁺²-dépendante et Ca⁺²-indépendante (**Figure 18**, Gosens *et al*, 2006). La liaison de l'acétylcholine aux récepteurs M3, couplés à la protéine hétéro-trimère Gq est suivie par la dissociation de cette dernière en libérant la sous-unité α active. Cette dernière stimule la phospholipase C qui à son tour catalyse la dégradation de phosphatidylinositol 4,5 diphosphate (PIP2) membranaire en deux messagers intracellulaires le diacylglycérol (DAG) et inositol 1, 4,3 triphosphate (IP3). L'IP3 induit la libération de Ca⁺² des stocks internes de réticulum endoplasmique (RE). Via le CD38, dont le mécanisme de contraction n'est pas encore été éclairci, le récepteur M3 contribue à la production d'ADPc-ribose et la libération de Ca⁺² des stocks internes de RE via les canaux de récepteur ryanodine (Deshpande *et al*, 2005). L'élévation du calcium cytosolique déclenche la contraction bronchique en se liant à la protéine calmoduline (CaM) dont le complexe CaM-Ca⁺² active la chaîne légère de la myosine kinase (CLMK). La CLMK phosphoryle la chaîne légère régulatrice de la myosine de 20 KDa (CLM₂₀).

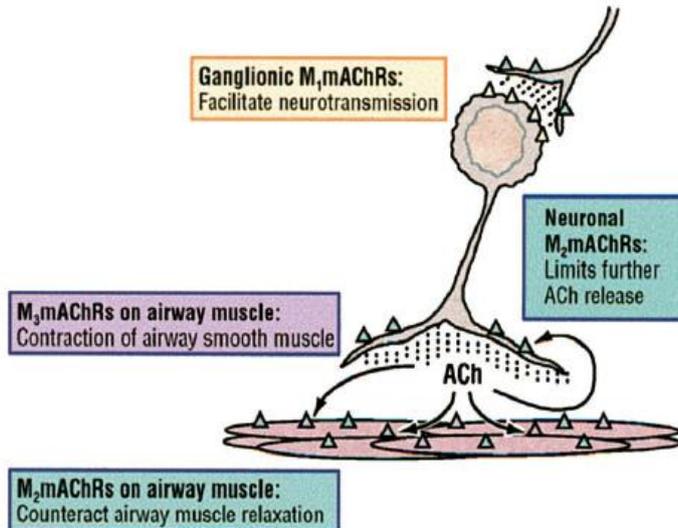


Figure 16 : Régulation cholinergique du tonus bronchique (Belmonte, 2005).

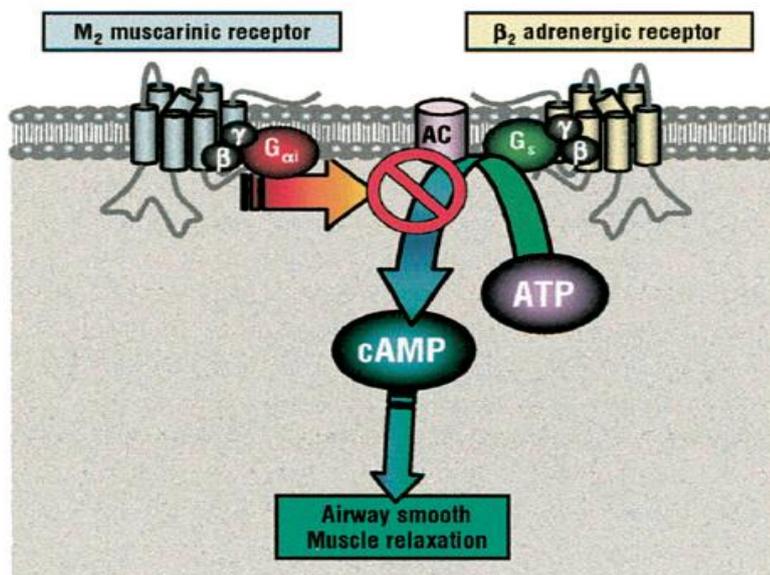


Figure 17 : Fonctionnement de récepteur M2 sur le muscle lisse bronchique (Belmonte, 2005).

Le niveau de phosphorylation de la CLM est aussi contrôlé par les voies qui inhibent la chaîne légère de la myosine phosphatase (CLMP), et améliore ainsi la sensibilité au Ca⁺². Le DAG dérivé de l'activité catalytique PLC active la protéine kinase C (PKC), conduisant à la phosphorylation de la CPI-17 et l'inhibition de la MLCP en aval. La voie Rho-kinase, activé par le monomère de la protéine G Rho-A, phosphoryle la CPI-17 et inhibe directement la CLMP (Gosens *et al*, 2004b). Cette même voie de

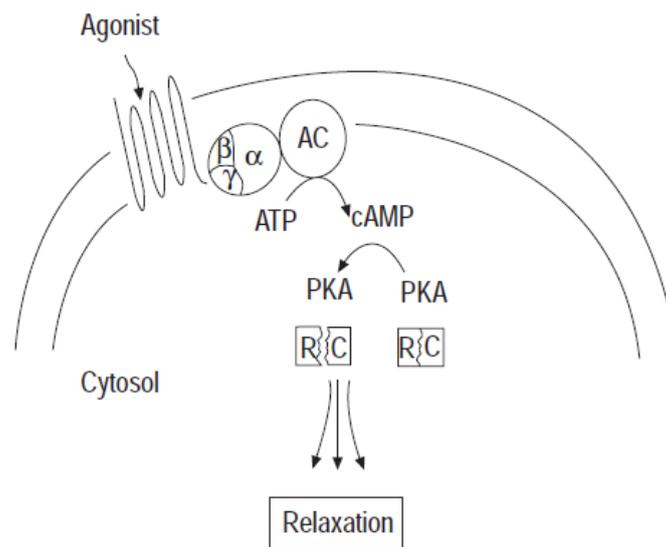


Figure 19 : Fonctionnement des récepteurs β -adrénergiques (Hall, 2000).

2.5.2. Dysfonction de la voie cholinergique

Chez les patients BPCO, l'activité parasympathique est augmentée dans les voies aériennes enflammées (Gross *et al*, 1984 ; Belmonte, 2005). L'augmentation de l'activité parasympathique est responsable en grande partie de l'hyperréactivité du tonus bronchique. Deux mécanismes traduisent la perturbation du contrôle muscarinique de tonus bronchique (Gosens *et al*, 2006).

- L'augmentation de l'expression et de la fonction des molécules de signalisation de la voie contractile ;
- libération accrue de l'ACh neuronal due à une perte du contrôle neuronal associée à une inflammation.

L'histamine et l'acétylcholine sont les agonistes contractiles les plus impliqués dans la bronchoconstriction associée avec la BPCO. Les observations cliniques et expérimentales récentes ont pu mettre en évidence l'efficacité thérapeutique des drogues anticholinergiques, en plus de leur effet bronchodilatateur, ils réduisent le remodelage des voies respiratoires et le déclin de la fonction pulmonaire (Gosens *et al*, 2006). Dans les biopsies bronchiques des patients BPCO, les basophiles et les mastocytes ont été trouvés en abondance (Grashoff *et al*, 1997 ; Pesci *et al*, 1994). Une étude sur les bronches humaines a montré que l'histamine stimule directement le nerf vague en augmentant la libération d'acétylcholine et que la contraction histamine-induite est médiée partiellement par l'acétylcholine (Aizawa *et al*, 2000). Par ailleurs la fumée de cigarette, et plusieurs

médiateurs inflammatoires, incluant les takykinines, histamine, bradykinines et prostaglandines, facilitent la neurotransmission ganglionnaire d'acétylcholine (Myers, 2001, Coulson et Fryer, 2003). La dégranulation des mastocytes est activement prononcée chez les patients avec une bronchite chronique (Pesci *et al*, 1994). La synthèse d'acétylcholine par les cellules épithéliales est augmentée par les médiateurs inflammatoires tels que le TNF- α (**Figure 20**). La constriction muscarinique des voies périphériques, dépourvues d'innervation cholinergique, caractérisant la BPCO pourrait s'expliquer par ce mécanisme (Barnes, 2004b). D'autre part, un rôle d'un médiateur inflammatoire est également attribué à l'acétylcholine. Des études fonctionnelles ont montré que l'acétylcholine à son tour induit la libération de leucotriènes B₄ en quantité significative et active la voie MAP kinase p42/p44 dans les cellules des expectorations des patients BPCO (Profita *et al*, 2005). L'activité chimiotactique des éosinophiles, monocytes et des neutrophiles est aussi augmentée en réponse à l'acétylcholine (Koyama *et al*, 1992).

Plusieurs études ont démontré, *In vitro* et sur des modèles animaux asthmatiques et BPCO, que les cytokines pro-inflammatoires tels que TNF- α , IL-13 et IFN- γ ou la fumée de cigarette augmentent l'expression et la fonction des molécules de la voie contractile Ca²⁺-indépendante ; Rho-A, CPI-17 et CD38 (Deshpande *et al*, 2004, Tliba *et al*, 2004 ; Sakai *et al*, 2004 ; Sakai *et al*, 2005).

Dans des modèles expérimentaux (animal et humain) de provocation antigénique, d'infection virale et d'exposition à l'ozone, aucun changement n'a été observé soit au niveau de l'activité ou de la quantité des récepteurs M1 et M3 (Belmonte, 2005 et Gosens *et al*, 2006). Il y'a par contre de nombreuses études qui font état d'une dysfonction du récepteur M2 dans ces modèles (Jacoby *et al*, 1993 ; Yost *et al*, 1999 ; Seemungal *et al*, 2001, Belmonte, 2005). Ces conditions induisent la dysfonction des récepteurs M2 via le recrutement des éosinophiles vers les nerfs des voies respiratoires et secrètent une protéine basique majeure exerce un antagonisme allostérique au niveau du récepteur M2 (Jacoby *et al*, 1993). Les infections virales induisent la dysfonction des récepteurs M2 via le clivage de la portion glycosylé du récepteur M2 par la neuraminidase contenant dans le revêtement des virus (Seemungal *et al*, 2001). De nombreuses études ont démontré que l'infection virale chronique et le stress oxydatif sont les deux facteurs siégeant dans les poumons des patients atteints de la BPCO (Barnes, 2000 a). Cette dysfonction du récepteur M2 conduit à une augmentation de la libération d'ACh, qui elle, induit l'hyperréactivité dans ces

modèles (Belmonte, 2005). L'hyperréactivité bronchique au méthacholine ou à l'histamine est aussi observée chez les patients avec la BPCO (Willemse *et al*, 2004).

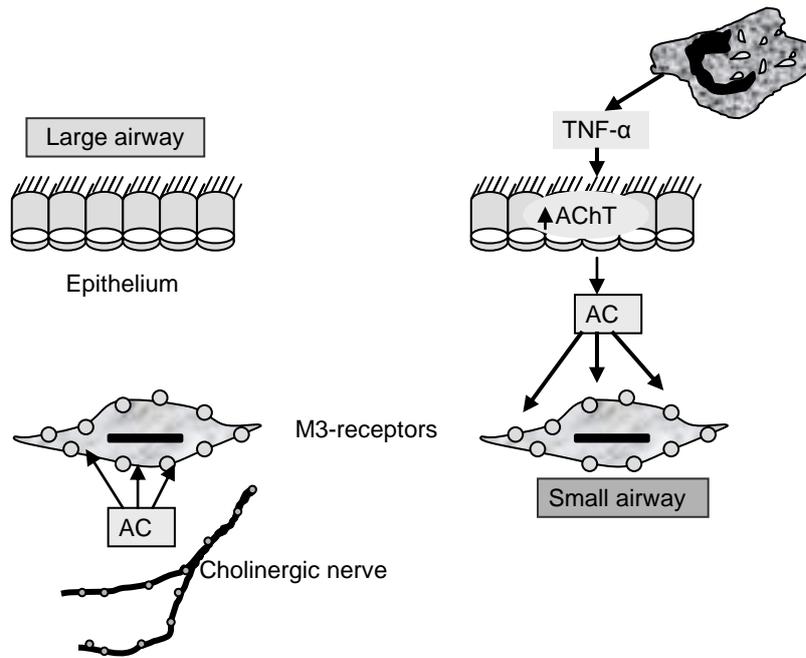


Figure 20 : La constriction muscarinique des voies périphériques en réponse au stimulus inflammatoire, TNF- α (Barnes, 2004).

CHAPITRE III

3. FLAVONOÏDES

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Les flavonoïdes sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils possèdent des propriétés biologiques diverses que nous présenterons dans cette partie de la thèse.

3.1. Structure chimique et classification

De nos jours, plus de 6000 flavonoïdes ont été identifiés. Ainsi, nous en absorbons chaque fois que nous consommons un aliment d'origine végétale. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C_6 (A et B), reliés par une chaîne en C_3 (**Figure 21**) (Bruneton, 1999). Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins. Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C_3 intermédiaire (**Figure 21**). A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone (Harbone et Williams, 2000).

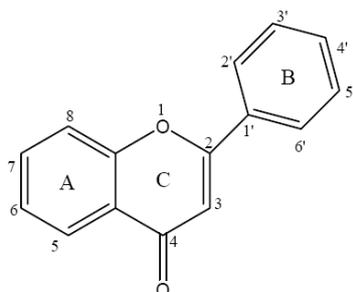


Figure 21 : Squelette de base des flavonoïdes (Rice-Evans *et al*, 1996).

3.2. Distribution et localisation

Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes feuilles (salade, choux, épinards, etc), ainsi que dans les téguments externes des fruits (**Tableau 1**). Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones, isoflavones et flavanones (Justen, 1998; Crozier, 1997). Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysin, de la quercétine, et de la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes les synthétisent à partir des sécrétions de bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, le sapin, et les modifient grâce à leurs enzymes salivaires (Havesteen, 2002).

3.3. Propriétés des flavonoïdes

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes (Moyano *et al*, 1996). Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est à dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (Picman *et al*, 1995).

Par ailleurs, les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (Prix Nobel, 1937), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou de jus de citron, alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïque. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité).

Malgré ces premiers résultats prometteurs, les recherches ne permirent pas ensuite d'attribuer un rôle essentiel aux divers polyphénols du monde végétal. A partir des années quatre-vingts, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour ces molécules dont les propriétés antioxydantes sont très marquées.

Tableau 1: Sources alimentaires des flavonoïdes (Havesteen, 2002)

Flavonoïdes	Aliments
Flavanones <ul style="list-style-type: none">• Naringénine	Fruits du genre citrus
Flavones <ul style="list-style-type: none">• Chryssine• Apigénine• Lutéoline	Peau des fruits, Persil, thym, romarin, céleri Céleri, persil
Flavanols <ul style="list-style-type: none">• Kaempférol• Quercétine• Myricétine	Radis, Brocoli, Thé noir Oignon, Pomme, Olive, Tomate Canneberge
Isoflavones <ul style="list-style-type: none">• Génistéine• Daidzéine	Soja, Haricots verts, Haricots noirs et Pois
Flavan-3-ols <ul style="list-style-type: none">• Epicatéchine• Catéchine	Thé noir, Thé vert Cassis, Myrtilles
Anthocyanidols <ul style="list-style-type: none">• Cyanidol• Malvidol• Apigénidol	Raisins, Fraises, cassis Framboises, fraises

3.3.1. Activités biologiques des flavonoides

3.3.1.1. Activité antioxydante

D'après Halliwell (1994), les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

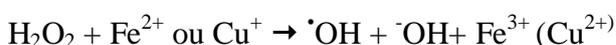
- (i) Le piégeage direct des EOA (effet scavenger).
- (ii) L'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production des EOA.
- (iii) La protection des systèmes de défense antioxydants.

- ***Inhibition enzymatique***

Les différents points qui ressortent de l'étude de Cos et collaborateurs (Cos *et al*, 1998) qui ont mesuré l'activité d'une trentaine de flavonoides sur la production d'acide urique, un produit de la réaction enzymatique xanthine oxydase-xanthine, sont : Seuls les flavonols et les flavones ont la capacité à inactiver l'enzyme. Ceci montre l'importance de la double liaison C₂-C₃ dans l'inhibition de la xanthine oxydase. D'autres études ont montré que les flavonoïdes sont aussi des bons inhibiteurs d'autres enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase (Landolfi, 1984), NADPH oxydase, enzyme clé de la fièvre respiratoire et la MPO (Winterbourn, 1985). Il s'agit des flavonoides saturés en position C₂-C₃, comportant une fonction cétone en C₄ et des groupements hydroxyles en C₃', C₄' et C₅'. Les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés. Par exemple, la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine (Cos et al. 1998).

- ***Chélation des ions métalliques***

Les ions du fer (Fe²⁺) et du cuivre (Cu⁺) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant, par exemple, Fe pour la catalase, et Cu et Zn pour la superoxyde dismutase. Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (Morris *et al*, 1995 ; Brown *et al*, 1998). Les études menées par Van Acker et ses collaborateurs (1996) ont montré que cette chélation nécessite (**Figure 22**):

- (i) un noyau catéchol sur le cycle B,
- (ii) les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C,
- (iii) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C.

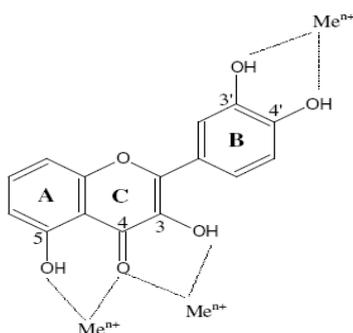


Figure 22: Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques Me^{n+} (Van Acker, 1996).

- **Piégeage des radicaux libres**

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leurs faibles potentiels redox (Jovanovic *et al*, 1994 ; Jovanovic *et al*, 1998), les flavonoïdes (FL-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants par transfert d'hydrogène :



Le radical flavonoxy (FL-O[•]) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (**Figure 23**). En outre, le radical flavonoxy peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant indésirable des flavonoïdes. Nous constatons que la capacité des flavonoïdes d'agir comme antioxydants dépend non seulement du potentiel redox du couple FL-O[•] / FL-OH mais aussi de la réactivité du radical flavonoxy.

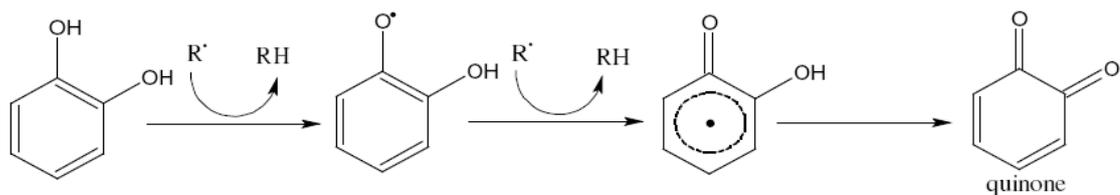


Figure 23 : Piégeage des EOA ($R\cdot$) par les flavonoïdes (Jovanovic *et al*, 1998).

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres (Winterbourn, 1985 ; Jovanovic *et al*, 1994 ; Van Acker *et al*, 1996 ; Rice-Evans *et al*, 1996 ; Cao *et al*, 1997 ; Cos *et al*, 1998 ; Pietta, 2000). En analysant les résultats concernant la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres, la communauté scientifique a pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants (**Figure 24**):

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons ;
- La double liaison C_2-C_3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C_2-C_3 ;

A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes.

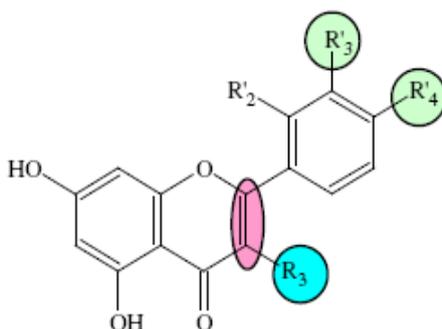


Figure 24 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.

3.3.1.2. Activités anti-inflammatoires

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Da Silva *et al*, 1994 ; Galati *et al*, 1994 ; Read, 1995) et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Middleton , 1996). Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Mookerjee *et al*, 1986 ; Namgoong *et al*, 1994). Cet effet des flavonoïdes sur les lymphocytes B ou T peut être variable: en effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que seule la myricétine est active sur les lymphocytes B. L'explication est encore inconnue. L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase) (Mookerjee *et al*, 1986 ; Namgoong *et al*, 1994). Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes (Middleton et Drzewiecki, 1984). Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Landolfi et son groupe (1984) ont montré que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes. Ils ont même rapporté que les effets de la quercétine et la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipooxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipooxygénase est affectée.

3.3.1.3. Effet antispasmodique

Les flavonoïdes sont capables d'agir comme des agents anti-spasmodiques via la relaxation de muscle lisse (Duarte *et al*, 1993a). La génisteine et la quercétine sont susceptibles d'atténuer la contraction anaphylactique antigène-induite sur les voies aériennes des cochons d'inde (Macander, 1986 ; Tsang et Fred Wong, 2000). La baicaleine, un puissant inhibiteur de la lipooxygénase, réduit fortement la contraction des artères en réponse à l'angiotensine II mais non à la norepinephrine (Stern *et al*, 1989). Par ailleurs, la réponse contractile de muscle lisse des rats aux divers agonistes contractiles comme KCl, Ca²⁺ et PMA, est inhibée par la quercétine d'une manière concentration-dépendante (Duarte *et al*, 1993b). Les travaux récents ont rapportés que la quercétine et ses dérivés éther, méthyles et glycosylés ainsi que la génisteine exercent une action broncho-dilatatrice sur plusieurs préparations bronchiales et trachéales des rats, des chiens et des

cochons d'inde (Abu-Niaaj *et al*, 1993 ; Ko *et al*, 2002 ; Ko *et al*, 2003 ; Lin *et al*, 2007). Bien qu'à présent le mécanisme d'action des ces flavonoides sur la contractilité du muscle lisse est encore mal compris mais il pourrait s'expliquer par une interférence avec la mobilisation du Ca^{2+} .

3.4. Flavonoides et voies de signalisation

L'activité des flavonoides a cependant été démontré dans de nombreuses fonctions : anti-inflammatoire, anti-oxydantes, anti-allergiques, anti-spasmogène, hépatoprotectrices, anti-thrombotiques, anti-virales, anti-carcinogènes et même anti-âge (Havsteen, 2002). Cependant, les mécanismes d'action des flavonoides restent pour l'essentiel mal compris (Middleton *et al*, 2000). Ainsi, on ne sait pas ni comment ils rentrent dans la cellule ni si ces molécules peuvent s'accumuler dans des organites cellulaires. Leurs effets étant très variés, de nombreux sites d'action ont été mis en évidence. Cependant, pour l'essentiel des travaux, les voies de signalisation des flavonoides ont été jusqu'à présent peu étudiées.

- Action sur les kinases : les kinases sont des enzymes intervenant dans de multiple voies de signalisation. Ainsi, la protéine kinase C (PKC) participe notamment au processus inflammatoire, au processus sécrétoire ainsi qu'à la contraction du muscle lisse et à la fonction lymphocytaire (Nishizuka, 1995). Cette enzyme est inhibée par la quercétine, la fisétine et la lutéoline (Ferriola *et al*, 1989). La quercétine agit comme un substrat compétitif de l'ATP et GTP. Dans plusieurs types de cellules, la myosine kinase catalyse la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine. Cette kinase est essentielle au développement de la tension contractile du muscle lisse ainsi qu'à la migration et à la mobilisation des autres cellules. Cette myosine kinase est puissamment inhibée par les composés flavonoïques ayant une double liaison $\text{C}_2\text{-C}_3$ et avec deux des trois cycles aromatiques polyhydroxylés notamment le kaempférol et la quercétine (Rogers et Williams, 1989 ; Jinsart *et al*, 1991). Les protéines tyrosine kinases (PTK) sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation comme la régulation, la transformation, croissance et contraction cellulaire, l'expression des gènes, le déplacement et l'adhésion cellulaire (Taniguchi *et al*, 1995). La génistéine (Akiyama *et al*, 1987) et la quercétine (Srivastava, 1985) inhibent ces enzymes.

- Action sur la phospholipase A₂ (PLA₂) : la PLA₂, un des principaux médiateurs intra- et extracellulaire de l'inflammation. L'action de la PLA₂ sur les phospholipides membranaires libère l'acide arachidonique (Pruzanski et Vadas, 1991). La quercétine est un inhibiteur de la PLA₂ des leucocytes humains et de lapin (Lee *et al*, 1982).
- Action sur les ATPases : la quercétine inhibe la calcium-ATPase en agissant comme un inhibiteur compétitif de l'ATP (Murakami *et al*, 1992).
- Action sur les lipoxygénases et les cyclo-oxygénases : la quercétine est un inhibiteur efficace de la lipoxygénase-12 (Rao *et al*, 1985). La quercétine et certains de ses dérivés inhibent l'activité et l'expression COX-2 (O'leary *et al*, 2004).
- Action sur les phosphodiésterases (PDE) : de nombreux flavonoïdes inhibent la PDE de diverses origines cellulaires (Beretz *et al*, 1986 ; Ko *et al*, 2004). Il est à noter que cette enzyme dégrade nucléotides cycliques (AMPc et GMPc) qui sont impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires (division cellulaire, contraction des muscles lisses, sécrétions, immunité, agrégation plaquettaire...).
- Action sur le facteur de transcription nucléaire (NF-κB) : Dans le cytoplasme, le NF-κB est inactivé par le biais de son association avec une protéine inhibitrice IκB. La phosphorylation de cette dernière IκB est accompagnée par l'activation et la translocation de facteur NF-κB vers le noyau. Des travaux ont mis en évidence l'effet de la quercétine (Nair *et al*, 2006) et la génistéine (Kang *et al*, 2001) sur la translocation nucléaire de NF-κB en inhibant éventuellement la phosphorylation de la protéine IκB.

3.5. Biodisponibilité des flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent ainsi des propriétés thérapeutiques bénéfiques. Cependant la qualité nutritionnelle et les effets systémiques des flavonoïdes dépendent de leur absorption au niveau du tractus digestif. Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez L'homme. Toutefois, d'après des expériences menées sur des flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que leur absorption est faible et implique des mécanismes encore mal connus (Hollman *et al*, 1997 ; Spencer *et al*, 2004 ; Manach *et al*, 2004). Seuls les aglycones sont supposés être absorbables, alors que les glycosides, comme la rutine, doivent subir l'hydrolyse de leur liaison osidique par l'action de la microflore intestinale pour être absorbés au niveau du côlon (Hollman et Katan, 1998). Les aglycones ainsi formés subissent une O-méthylation ou une sulfonation (Hollman *et al*, 1997 ; Walle, 2000). Les principaux sites de

métabolisme sont la flore intestinale et le foie. Les métabolites, glucuro- et sulfoconjugués des flavonoïdes absorbés sont éliminés principalement par la bile, l'excrétion urinaire ne représentant que 3 à 6 % de l'élimination totale.

La quantité et la nature des flavonoides apportés par l'alimentation varient selon les pays. La consommation journalière en flavonoides atteints 1 g / jour aux USA (Sampson *et al*, 2002), 23 mg / jour aux Pays-Bas (Hertog *et al*, 1993) et jusqu'à 35 g / jour chez la population asiatique (Kimira *et al*, 1998). La quantité de flavonoides apportés dans le régime méditerranéen doit être très élevée, ce régime étant riche en huile d'olive, et en agrumes et végétaux divers. Ces quantités pourraient se traduire par des concentrations plasmatiques et tissulaires significatives (Lee *et al*, 1995 ; Manach *et al*, 2003 ; Watanabe *et al*, 1998 ; King et Bursill, 1998). De toute façon, quelque soit le pays, les apports alimentaires en flavonoides dépassent largement celle de la vitamine E et du bêta-carotène qui avoisinent le milligramme par jour (Middleton *et al*, 2000).

OBJECTIFS ET CONDUITE DE TRAVAIL

Actuellement, il est devenu évident que la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une affection respiratoire caractérisée par une inflammation chronique responsable de nombreux changements physiopathologiques au niveau des voies aériennes. Aucun des traitements disponibles n'est à présent capable de modifier le déclin à long terme de la fonction pulmonaire. La recherche de substances capables de combattre sur plusieurs fronts la maladie BPCO est l'une des préoccupations majeures de la communauté médicale. Les effets pléiotropes attribués aux flavonoïdes ont fait de ces derniers les meilleurs candidats pour rechercher à valoriser leurs effets pharmacologiques pulmonaires.

L'objectif général de ce travail de thèse était d'évaluer l'intérêt thérapeutique des polyphénols, en vue de prévenir et/ ou de limiter l'évolution de certains désordres affectant le tractus respiratoire dans la maladie BPCO.

Le travail de cette thèse comporte en trois parties :

1. Etude *in vitro* sur un modèle acellulaire:

- Etude de l'effet scavenger 'piégeur' de la quercétine sur l'HOCl par la chimiluminescence ;
- Comparaison des profils de l'effet scavenger des flavonols (quercétine, rutine, kaempférol et myricétine) sur l'HOCl pour évaluer la relation structure-activité des Flavonols ;
- Evaluation de l'effet scavenger de la quercétine sur l'HOCl par comparaison avec des substances connues par leurs propriétés antioxydantes ; taurine, vitamine C et N-acétyl-L-Cystéine (NAC).

2. Etude sur un modèle de culture à court terme du parenchyme pulmonaire humain.

Sur ce modèle, qui imite certains aspects de l'inflammation caractérisant la BPCO, nous avons caractérisé la potentialité anti-inflammatoire de la quercétine et de la génistéine sur la production des cytokines pro-inflammatoires : TNF- α , IL-8 et MIP-1 β par :

- Les fragments du parenchyme pulmonaire cultivés sans LPS.
- Les fragments du parenchyme pulmonaire cultivés en présence du LPS

3. Etude fonctionnelle de la réactivité des bronches humaines dans des cuves à organes isolés.

- Evaluation de la capacité de la génistéine et de la quercétine sur la réactivité bronchique induite sur la base de leur effet bronchorelaxant.

- Mise au point le mode d'action de la génistéine et de la quercétine sur les deux principaux seconds messagers impliqués dans la régulation de la réponse contractile : AMPc et Ca²⁺.

4. MATERIELS

4.1. Réactifs

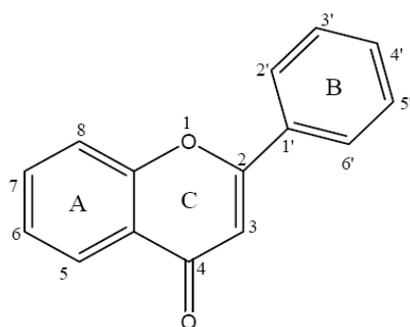
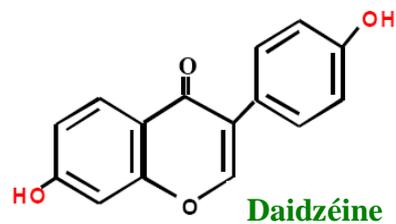
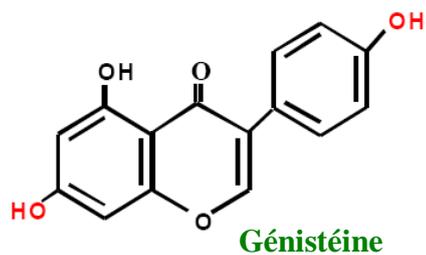
La plupart des réactifs utilisés dans cette étude proviennent de Sigma (Paris, France). Kaempférol, myricétine, quercétine, rutine, N-acetyl-L-cysteine (NAC), taurine, et naringinase proviennent de Fluka (Chemikalien GmbH Buchs, Suisse), le luminol de La Roche (Mannheim, Allemagne). Les kits ELISA (TNF- α , IL-8 et MIP-1 β) proviennent de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Isoprénaline, formotérol, théophylline (PCH, Paris, France) ; LPS (*E.coli* Serotype 0111 :B4) provient de Sigma (Paris, France) et acétylcholine, histamine (Glaxo, Paris, France).

La solution stock du luminol est préparée dans le tampon phosphate de sodium, PBS (10 mM), contenant du NaCl (140 mM) pH 7,4. La solution stock du NaOCl est préparée quotidiennement dans l'eau distillée et sa concentration est déterminée spectrophotométriquement en utilisant $\epsilon_{290} = 350M /cm$ à pH 12 (Morris, 1966). Les solutions stocks des flavonoides sont préparées dans l'éthanol pour l'étude de l'effet scavenger et dans diméthylsulfoxyde (DMSO) pour l'étude de l'effet des flavonoides sur les tissus humains. Les autres solutions sont préparées dans le tampon PBS ou dans l'eau distillée et conservées à 4 °C. Les kits ELISA sont préparés selon le protocole de R&D Systems et stockés entre -20°C à -70°C pour plus de 6 mois.

4.2. Matériel biologique

Les tissus pulmonaires humains, bronches et parenchyme, ont été issus de pièces opératoires de lobectomie ou de pneumonectomie des patients opérés essentiellement pour cancer broncho-pulmonaire (Hôpital Foch, Suresnes, Paris). Les conditions de recueil des tissus ont été approuvées par le comité consultatif pour la protection des personnes participant à la recherche biomédicale de Versailles, France. Le tissu pulmonaire est prélevé en zone macroscopique saine à distance de la tumeur et acheminé immédiatement au laboratoire. Les bronches humaines sont mises dans une solution de Krebs et le parenchyme pulmonaire dans un milieu de culture RPMI 1640 stérile supplémenté en antibiotiques (100 μ g/ml de streptomycine et 100 U/ml de pénicilline).

4.3. Structures chimiques des flavonoïdes utilisés au cours de cette étude



Squelette de base des flavonols

FLAVONOIDS	2'	3'	4'	3
Kaempferol	H	OH	H	OH
Quercétine	OH	OH	H	OH
Myricétine	OH	OH	OH	OH
Rutine	OH	OH	H	O- RHAMNOGLUCOSYL

5. METHODES

5.1. Mesure de la chimiluminescence luminol-dépendante induite par l'HOCl

La luminescence est la propriété qu'ont certaines substances de restituer sous forme de photons d'énergie $q=hu$ d'origine non thermique une partie de l'énergie absorbée au cours d'une excitation. Il s'agit donc de la désactivation d'une molécule excitée vers un état énergétique moins élevé. Dans notre cas, le marqueur de luminescence est de type chimique (Luminol) d'où la chimiluminescence. Les mesures de la chimiluminescence sont effectuées, selon la méthode d'Arnhold et collaborateurs (1993) par un luminomètre Microlumat LB 96.

5.1.1. Effet scavenger des flavonols sur l'HOCl

Les substances à tester sont préincubées en présence du luminol dans le tampon PBS à pH 7,4. Ensuite, 50 μ l du NaOCl sont injectés dans un volume final de 225 μ l. La concentration finale du luminol et du NaOCl étant de 10^{-5} M et $2,5 \times 10^{-6}$ M, respectivement. Toutes les mesures sont répétées au moins trois fois à 37 °C. Le nombre de photons est compté durant les 10 secondes qui suivent l'injection du NaOCl.

5.1.2. Traitement de la rutine par naringinase

La solution de la rutine est tout d'abord ajustée à pH 4 avec l'acide ortho-phosphorique, ensuite la naringinase (2 mg/ml d'une solution stock 10 fois concentré dans l'eau distillée) est ajoutée, pour libérer le squelette *O*-rhamnoglucosyl de la rutine par clivage de la liaison osidique. Le mélange réactionnel et en parallèle avec la solution de la rutine non traitée est incubé à 37°C pour 90 min. Après hydrolyse, le pH est amené à 7,4. L'échantillon est testé pour l'oxydation du luminol HOCl-induite comme précédemment décrit.

5.2. Etude de l'activité anti-inflammatoire des flavonoides

5.2.1. Culture à court terme du parenchyme pulmonaire

Le parenchyme pulmonaire est découpé sous hotte stérile en petits fragments homogènes d'environ 30 à 40 mg dans le milieu RPMI 1640 supplémenté en antibiotiques. Afin d'éliminer les éventuelles cellules sanguines ainsi que les médiateurs libérés lors de la phase initiale de la préparation, les fragments de parenchyme étaient lavés et filtrés trois

fois dans des tubes stérile contenant 25 ml de milieu de culture supplémenté en antibiotiques. Pour limiter les conséquences du stress tissulaire provoqué par la dissection des tissus et faciliter la réalisation des expériences, les fragments de parenchyme sont laissés une nuit à 5°C entre leur préparation et leur mise en culture (Risse, 2006).

En fonction de la quantité de tissu disponible, 6 à 9 fragments du parenchyme humain étaient repartis stérilement de manière à obtenir une quantité de tissu approximativement égale et homogène dans chaque puits. Le volume de milieu de culture (RPMI 1640 supplémenté en antibiotiques) est fixé à 5 ml par puits. Les plaques de culture cellulaire à 6 puits, dont trois puits contiennent les fragments du parenchyme et trois autres les milieux de culture seuls, ont été incubées dans un incubateur thermostaté à 37 °C en présence de CO₂. Après une heure de stabilisation, les fragments de tissu étaient transférés dans des puits contenant le milieu de culture à l'aide de pinces stériles afin de s'assurer du renouvellement complet du milieu de culture.

5.2.2. Préparation des surnageants de parenchyme humain cultivé

Le potentiel anti-inflammatoire de différents flavonoïdes, genisteine, daidzeine, quercétine et rutine à des concentrations allant de 3×10^{-6} à 10^{-4} M, a été évalué après 4 et 24 heures d'incubation des fragments de parenchyme humain en absence ou en présence de 1 µg/ml de lipopolysaccharide (LPS), (**Figure 25**). A la fin d'incubation, les milieux de culture sont collectés puis centrifugés (5 min à 3000 tours.min⁻¹) pour éliminer les éventuelles cellules en suspension. Les surnageants récupérés sont repartis en aliquotes et congelés à -80 °C jusqu'à leur utilisation. Tous les fragments ont été séchés entre deux compresses pour être pesés afin de rapporter les concentrations des cytokines mesurées dans les surnageants de culture au poids de tissu exprimé en mg.

5.2.3. Quantification de cytokines produites dans le milieu de culture

Dans cette partie expérimentale, les cytokines inflammatoires choisis pour le dosage sont : le tumor necrosis factor- alpha (TNF-α), l'interleukine-8 (IL-8) et le macrophage inflammatory protein -1 bêta (MIP-1β). Le choix de ces cytokines est basé sur leur rôle dans la physiopathologie de la réaction inflammatoire bronchopulmonaire de la BPCO. La quantification des cytokines dans les surnageants de 4 et 24 heures à l'état basal et stimulé est réalisée par la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay) sandwich. Cette technique repose sur une réaction immuno-enzymatique faisant intervenir un anticorps spécifique fixé sur un support (anticorps capteur), un prélèvement biologique

contenant éventuellement l'antigène complémentaire et un deuxième anticorps spécifique marqué par une enzyme transformant le substrat en produit coloré. La densité optique de cette coloration sera proportionnelle à la quantité de l'antigène à doser. Les dosages de TNF- α , IL-8 et MIP-1 β ont été effectués à partir des Kits Human DuoSet, selon le protocole standard décrit par le fournisseur : un anticorps capture est fixé au fond d'une plaque de microtitration de 96 puits une nuit à température ambiante. Les puits sont ensuite bloqués à raison de 300 μ l avec la sérum albumine bovine (BSA) 1% dans le PBS, pH 7.2-7.4, pendant une heure à température ambiante. A la suite de cette étape, les échantillons après dilutions appropriées sont ajoutés et incubés pendant deux heures à température ambiante. Le complexe anticorps-antigène est détecté par la suite avec un deuxième anticorps spécifique de la cytokine à doser, biotinylé reconnu par la streptavidine conjuguée à la peroxydase pendant deux heures à température ambiante. La révélation du complexe formé est réalisée par l'ajout de deux substrats, le peroxyde d'hydrogène et le tetramethylbenzidine. La transformation catalytique de ces substrats, pendant 20 minutes, développe une coloration bleue et vire au jaune après l'arrêt de la réaction par 50 μ l de solution de H₂SO₄ à 2N. La densité optique est mesurée à 450 nm avec un lecteur ELISA (Labsystems Multiskan RD). Une courbe standard est incorporée dans l'essai d'ELISA sandwich en faisant une série de gamme de la cytokine standard de concentrations connues. Il est à noter que chaque étape expérimentale est suivie par trois lavages avec PBS-Tween20. La conversion de la densité optique en concentration correspondante est effectuée par le logiciel Prism à partir d'une courbe de régression de la gamme standard.

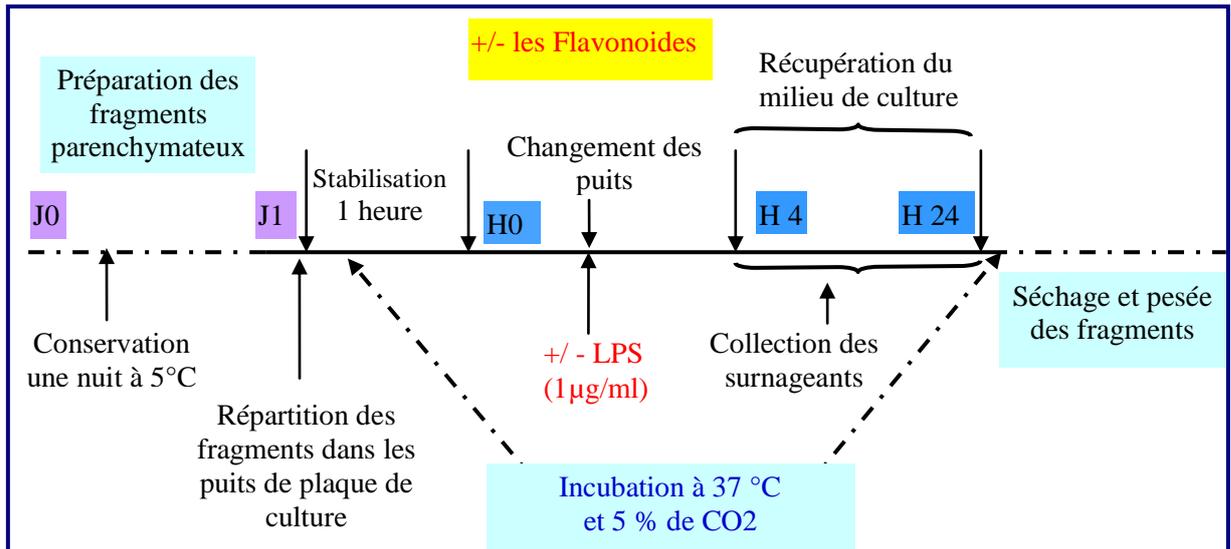


Figure 25: Protocole de l'étude de l'activité anti-inflammatoire des Flavonoïdes.

5.3. Etudes fonctionnelles de bronche humaine

5.3.1. Technique des cuves à organes isolés

Après résection, les bronches humaines ont été disséquées et séparées du parenchyme sous-jacent puis découpées en anneaux de diamètre compris entre de 0,5 à 1 mm. Les anneaux bronchiques étaient alors utilisés immédiatement pour les études fonctionnelles ou conservés une nuit à 4°C dans une solution de Krebs aérée et de composition en mM : 118 NaCl, 5,4 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,2 KH₂PO₄, 1,2MgSO₄, 25 NaHCO₃, 11,7 glucose. Aucune différence fonctionnelle n'a été trouvée entre les bronches étudiées immédiatement et celles conservés une nuit à 4 °C.

Les anneaux de bronches humaines ont été suspendus dans des cuves à organes isolés contenant 5 ml de la solution de Krebs à 37 °C et oxygénée par du carbogène (95% O₂, 5 % CO₂). La tension était mesurée isométriquement par une jauge de contrainte (Gould UC3) connectée à un amplificateur (EMKA technologie) permettant un enregistrement à l'aide d'un logiciel informatique (IOX, EMKA). La tension était initialement fixée à 2 g et après 3 rinçages séparés de 15 minutes, les segments de bronches étaient laissés au repos pour une période d'équilibration d'une heure. Chaque étude fonctionnelle de contractilité a été réalisée sur des segments provenant du même patient.

Le protocole standard utilisé pour la plupart des expériences sur la réactivité bronchique est le suivant : après une première période de stabilisation d'une heure durant laquelle les segments de bronche sont lavés de manière répétitive, les segments sont précontractés avec une concentration supra-maximale de 3 mM d'un agoniste contractile, l'acétylcholine (ACh). Après atteinte du plateau de la contraction maximale, les segments de bronche humaine sont de nouveaux lavés 3 fois à 10 minutes d'intervalle afin d'induire la relaxation des bronches jus qu'au tonus basal avant une deuxième période induite avec une concentration supra-maximale de théophylline à 3 mM.

5.3.2. Etude de l'effet de flavonoides sur les bronches humaines précontractées

L'acétylcholine et l'histamine ont été choisies comme agents contractiles car ils sont non seulement classiquement utilisés en pharmacologie pulmonaire mais sont aussi deux agents broncho-constricteurs impliqués dans la contraction bronchique chez l'homme. Après la deuxième période d'équilibration, les courbes concentration-réponse aux flavonoides genisteine, daidzeine, quercetine et rutine, sont obtenues sur la bronche humaine precontractée de 50-60 % de la contraction maximale, par l'acétylcholine (10^{-6} M) ou l'histamine (10^{-5} M). Les expériences préliminaires ont montré que de tels niveaux de contraction sont obtenus avec de l'acétylcholine à 10^{-6} M et de l'histamine à 10^{-5} M. Quand le plateau de contraction était atteint, les flavonoides et le solvant (préparation contrôle) utilisé pour dissoudre ces derniers, le DMSO, ont été ajoutés de façon cumulative toutes les 30 minutes environ, après obtention d'une réponse stable (plateau) à la concentration précédente. La réponse à la théophylline (3mM) est prise comme valeur de référence d'une relaxation maximale (100 %). Une seule courbe concentration-relaxation est réalisée par préparation (**Figure 26**).

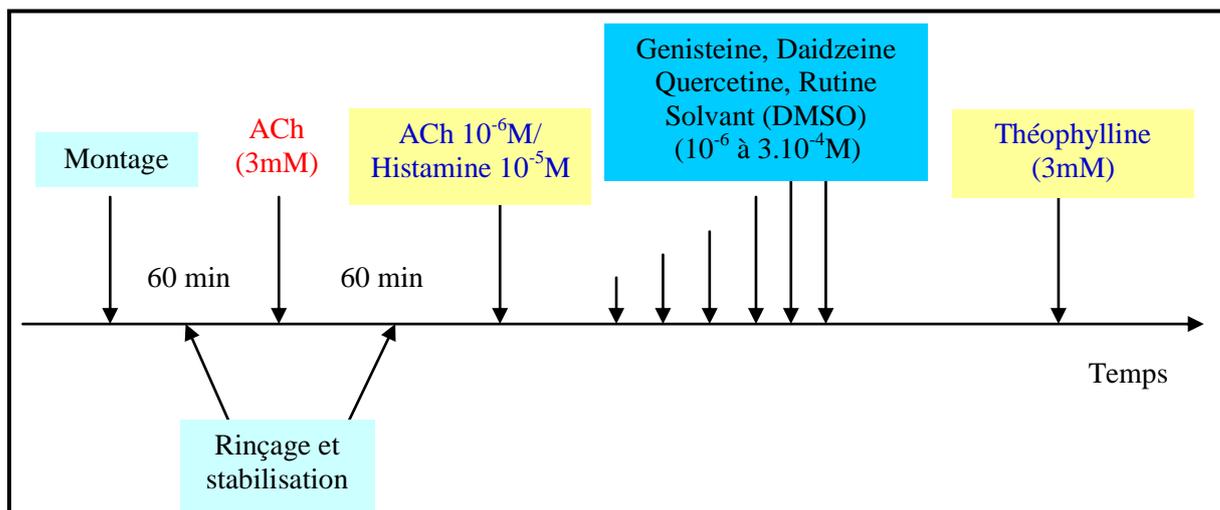


Figure 26: Protocole d'étude de l'effet bronchorelaxant de flavonoides sur les bronches humaines prè-contractées à l'histamine $10^{-5}M$ et à l'acétylcholine $10^{-6}M$.

5.3.3. Effet des flavonoides sur les courbes concentrations-réponses à l'isoprenaline, au formotérol et au nitroprussiate de sodium

Ce protocole suit la procédure décrite précédemment (section 5.3.1), après une précontraction à l'acétylcholine ($10^{-6} M$) et l'histamine ($10^{-5} M$), des concentrations croissantes d'agonistes bêta-adrénergiques, isoprenaline (ISO) ou formotérol (For) ou de nitroprussiate de sodium (SNP), un activateur de la voie GMPc, allant de 3×10^{-9} à $3 \times 10^{-7} M$, 10^{-11} à $10^{-7} M$ et 10^{-8} à $3 \times 10^{-4} M$ respectivement, ont été ajoutées au bain de façon cumulative pour obtenir une première courbe concentration-réponse. Après lavage et stabilisation comme précédemment décrits, une deuxième courbe concentration-réponse à l'isoprenaline ou formotérol ou au sodium nitroprusside a été effectuée 30 min après incubation en présence des flavonoides, genisteine, daidzeine, quercetine, rutine ou un volume équivalent en solvant (DMSO) à des concentrations fixées de $10^{-6}M$ et $3 \times 10^{-5}M$ (**Figure 27**).

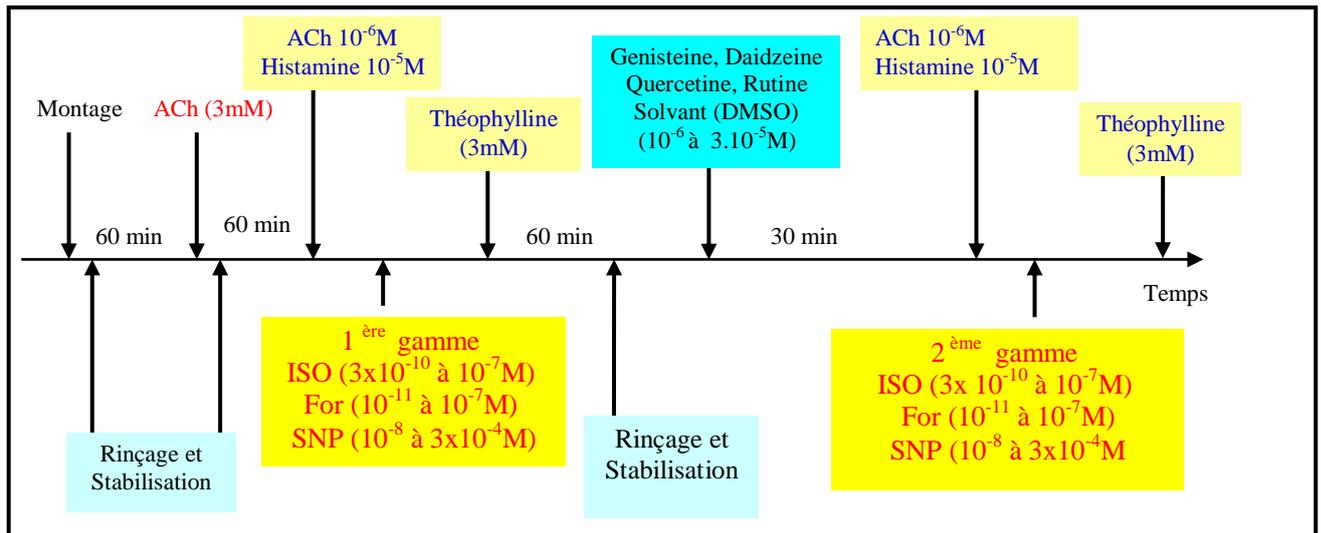


Figure 27 : Protocole d'étude de l'effet potentiel des flavonoïdes sur les courbes concentration-réponse à l'isoprenaline, au formotérol et au nitroprussiate de sodium sur les bronches humaines precontractées

5.3.4. Effets des flavonoïdes sur la contraction des bronches humaines induites par KCl/CaCl₂

Afin de tester l'effet antagoniste calcique des flavonoïdes, l'effet inhibiteur de ces composés a été étudié sur la contraction induite par KCl (Foster *et al*, 1983) et sur la contraction causée directement par le calcium extracellulaire (CaCl₂) ajouté dans un milieu dépolarisant. Ces protocoles suivent également la procédure décrite dans la section 5.3.1. Après la période d'équilibration, les bronches humaines sont incubées pendant 30 minutes en absence ou en présence de la genisteine, daidzeine, quercetine, rutine ou un volume équivalent de DMSO à des concentrations fixées de 10⁻⁶ à 3x10⁻⁵ M avant l'ajout cumulative de KCl (3,75 à 75 mM).

Les courbes concentration-réponse pour la contraction induite par CaCl₂ ont été construites selon la procédure décrite par Advenier et collaborateurs (1984). Brièvement, la solution de Krebs normale est remplacée après la contraction maximale à l'ACh (3 mM) avec une solution de Krebs sans CaCl₂ et les segments de bronche humaine sont lavés de manières répétitives et équilibrés pendant une heure. Une incubation pendant 15 min en présence de 1mM de l'acide ethylenediaminetetraacétique (EDTA) permet d'épuiser le milieu intracellulaire en calcium. Après de nouveaux lavages et équilibration pendant 1

heure avec la solution de Krebs sans CaCl_2 , les préparations bronchiques sont incubées dans une solution du Krebs sans CaCl_2 contenant 30 mM de KCl. Ces nouvelles conditions sont nécessaires pour provoquer la dépolarisation des membranes et par conséquent l'ouverture des canaux calcique voltage dépendants (les canaux de type L ou VOC). Juste après cette étape, les anneaux de bronche humaine sont incubés pendant 30 min en absence ou en présence de la genisteine, daidzeine, quercetine, rutine ou un volume équivalent de DMSO à des concentrations fixes de 10^{-6} à 10^{-4} M. Après cette incubation, des concentrations croissantes (10^{-5} à 3×10^{-3} M) de CaCl_2 ont été ajoutées au bain de façon cumulative et l'acétylcholine à 10^{-6} M est utilisée comme la dose finale dans cette gamme (Figure 28).

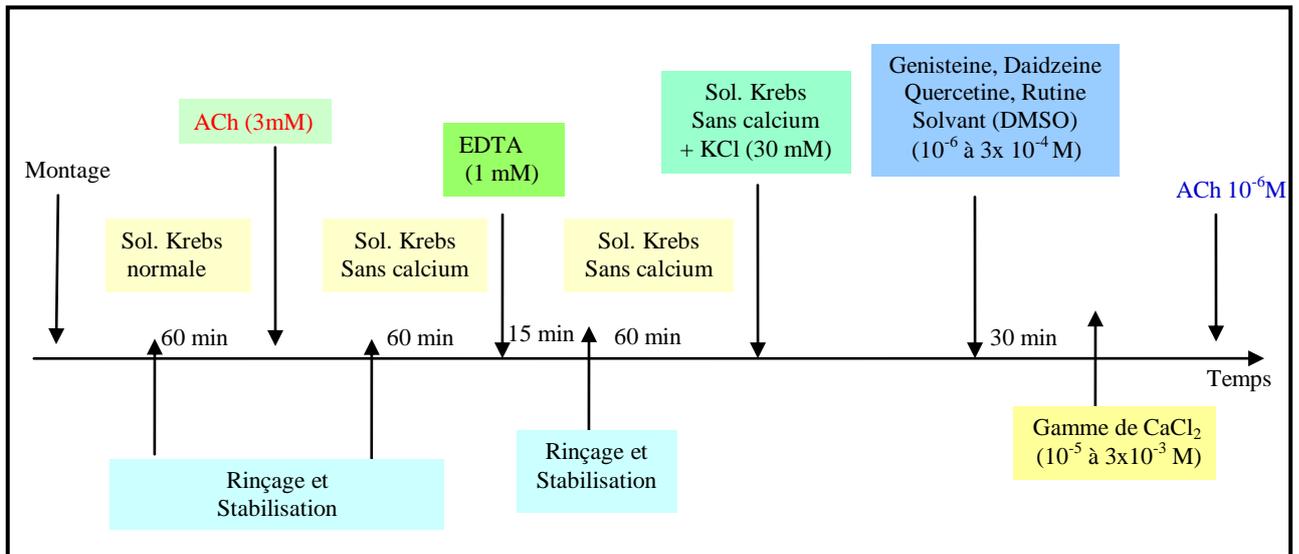


Figure 28 : Protocole d'étude de l'effet antagoniste des flavonoides sur les contractions CaCl_2 -induites sur les bronches humaines isolées.

6. ANALYSES DE RESULTATS

La luminescence totale émise est déterminée comme intégrale pour 10 s après l'ajout du NaOCl et exprimée comme unité de luminescence relative/s (Relative Luminescence Unit/s : RLU/s). Les réponses de relaxation sont exprimées comme pourcentages par rapport à la relaxation maximale induite par la théophylline (3 mM). Les médiateurs inflammatoires dans les surnageants de culture sont exprimés en pg ou ng pour 100 mg de tissu pulmonaire.

Les paramètres pharmacologiques, efficacité maximale (E_{max}), concentration efficace (EC_{50}), et puissance (pD_2 ou $-\text{Log } EC_{50}$) sont déterminés à partir des courbes dose-réponse. L'activité inhibitrice des substances pharmacologiques sur les contractions au KCl et au $CaCl_2$ est exprimée comme pourcentage relatif à la contraction maximale induite sur les préparations témoins par le KCl (75mM) et l'acétylcholine ($10^{-6}M$), respectivement. La concentration inhibitrice IC_{50} , la dose à laquelle 50% de la réponse luminescence, contractile ou production de cytokines est inhibée, est estimé en utilisant une analyse par régression linéaire.

Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne (s.e.m). Les études comparatives entre les préparations témoins et traitées ont été réalisées à l'aide de t -test de Student. La présence d'une différence significative entre les différentes sécrétions de tissu pulmonaire a été analysée par ANOVA à un seul facteur et avec un test de comparaison multiple post-hoc de Dunnett (le logiciel GraphPad Prism). Lorsque la probabilité est inférieure à 0.05 ($P < 0.05$), les différences sont considérées comme statistiquement significatives.

Résultats

7. EVALUATION DE L'EFFET SCAVENGER DE LA QUERCÉTINE SUR L'HOCl

L'effet scavenger (piégeage) de la quercétine sur l'HOCl est étudié par chimiluminescence luminol-dépendante. Il a été bien rapporté que l'injection du NaOCl dans la solution du luminol est accompagnée d'une émission brusque de la lumière (Arnhold *et al*, 1993). Le mécanisme par lequel, la lumière est émise par cette réaction est complexe. Le luminol est tout d'abord oxydé par l'HOCl en diazaquinone. Ce dernier est instable en solution aqueuse et en présence de trace de l'H₂O₂, il est converti en anion aminophthalate excité. Le retour de cet anion à son état stable émis une luminescence (Merenyi *et al*, 1986). Dans cette partie de travail, l'intensité lumineuse émise par l'oxydation de luminol par l'HOCl est mesurée en absence et en présence de la quercétine. La position, le nombre et la substitution des groupes hydroxyles (OH) du cycle B et la saturation de la liaison C₂-C₃ sont des facteurs importants affectant la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres (Rice-Evans *et al*, 1996 ; Cos *et al*, 1998). A cet effet, la capacité de la quercétine à piéger l'HOCl est comparé à son dérivé glycosylé, rutine et aux deux autres flavonols, myricétine et kaempférol. L'activité scavenger de la quercétine est comparée aux autres substances connues pour leur activité anti-oxydante telles que N-acétyl-L-Cysteine (NAC), vitamine C et taurine.

7.1. Effet de la quercétine sur la cinétique de luminescence du luminol HOCl-induite

La cinétique de luminescence est suivie en présence de la quercétine, rutine et la taurine en comparaison avec le témoin sans inhibiteur (**Figure 29**). Les résultats cinétiques illustrés dans la figure 29 ont montré que l'injection de NaOCl dans la solution de luminol produit brusquement une luminescence. L'intensité de luminescence maximale est atteinte dès les premières secondes. Ainsi, le déclin de la lumière émise à zéro est observé après 2 seconds environs. A une concentration finale de 1µM, la rutine abolie complètement la luminescence. En comparaison avec la cinétique témoin, la chimiluminescence de luminol HOCl-induite est réduite plus de moitié en présence de la quercétine à une concentration de 1µM. La taurine inhibe aussi à une concentration de 1µM la chimiluminescence de luminol HOCl-induite dont elle montre un effet moins prononcé.

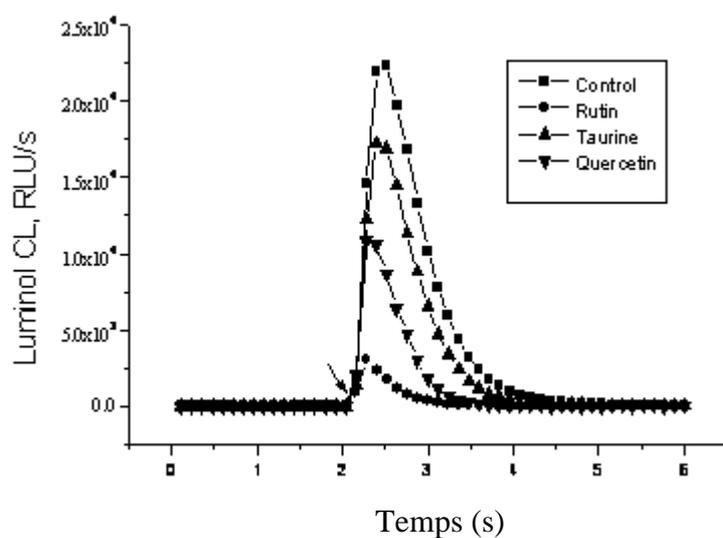


Figure 29 : Cinétique de la luminescence du luminol HOCl-induite en absence (■) et en présence de la quercétine (▼), de la rutine (●) et de la taurine (▲). Les substances inhibitrices, à une concentration de 1µM, sont incubées en présence de luminol (10µM) dans PBS pendant deux seconds avant l'injection du NaOCl (2,5µM) indiqué par une flèche. Les cinétiques de luminescence sont suivies pour plus de 8 seconds. Les traces de cinétique sont sélectionnées à partir de quatre mesures.

7.2. Effet inhibiteur de la quercétine sur la luminescence de luminol HOCl-induite

Dans une première étude, nous avons étudiés l'effet scavenger de la quercétine et des autres substances inhibitrices, indiquées ci-dessus, sur l'oxydation de luminol HOCl-induite. Les résultats de cette partie ont montré que toutes les substances testées, à des concentrations comprises entre 0,1 à 10 μM , réduisent de façon concentration-dépendante la luminescence de luminol HOCl-induite. La figure 29 illustre un exemple du profil d'inhibition de la chimiluminescence par la quercétine et la rutine. Ce tracé montre que la quercétine et la rutine exercent un puissant effet inhibiteur sur l'oxydation du luminol HOCl-induite. L'effet de la rutine sur la luminescence du luminol est déjà observé à une concentration de 0,1 μM et au-delà de 2,5 μM , l'inhibition est presque totale. Cette concentration de 2,5 μM correspond à la concentration finale de l'HOCl utilisée dans ces expériences. Ainsi, ces expériences révèlent une compétition très efficace entre la rutine et luminol vis-à-vis de l'HOCl. Le décalage du profil d'inhibition exercé par la quercétine vers la droite par rapport à celui de la rutine sur l'oxydation du luminol l'HOCl-induite confirme clairement l'efficacité inhibitrice de la rutine sur la cinétique de luminescence (**Figure 30**).

Nos résultats montrent que tous les flavonols testés affectent l'oxydation du luminol induite par l'injection du NaOCl (**Figure 31**). A une concentration de 1 μM , la rutine est l'inhibiteur le plus puissant avec une inhibition de $91,4 \pm 3,2$ % comparé au témoin de 100%. L'inhibition de la chimiluminescence luminol-dépendante est également prononcée en présence de la quercétine avec une inhibition de $75,9 \pm 3,4$ %. En comparaison avec la rutine, l'effet inhibiteur de la quercétine est moins important : à 5 μM , l'activité scavenger de la quercétine atteint son maximum. L'inhibition de l'oxydation du luminol est moins prononcée en présence kaempférol et myricétine avec des pourcentages d'inhibition de $57,7 \pm 5,3$ %, et $43,3 \pm 3,5$ %, respectivement. Ces résultats indiquent que tous les flavonols, particulièrement la rutine, sont capable de piéger l'HOCl.

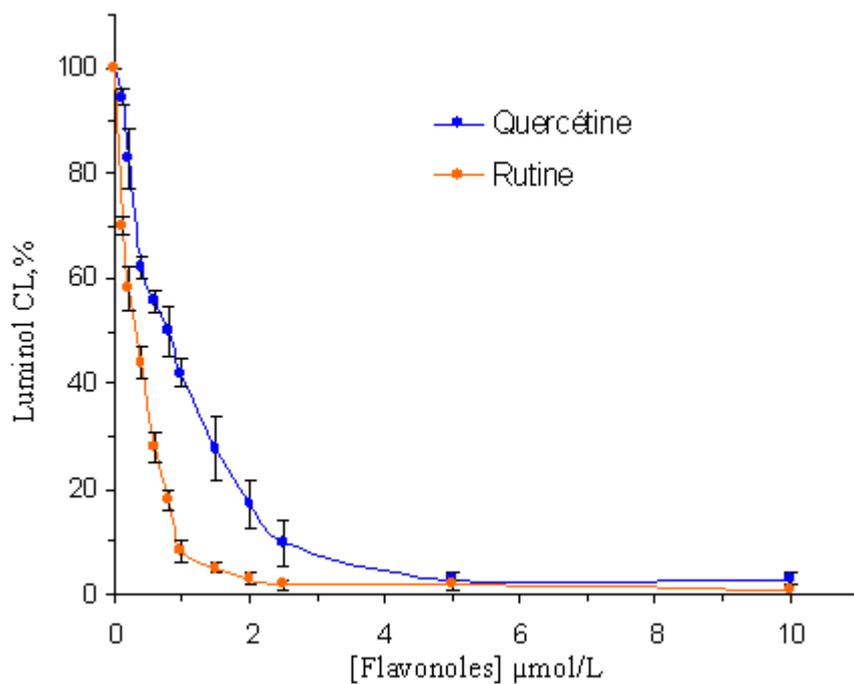


Figure 30: Profil d'inhibition de la quercétine et de la rutine sur la chimiluminescence luminol-dépendante induite par HOCl. Cette expérience est effectuée dans les mêmes conditions expérimentales indiquées dans la figure 29. Chaque point représente la moyenne \pm SD d'au moins 3 mesures indépendantes (n = 3).

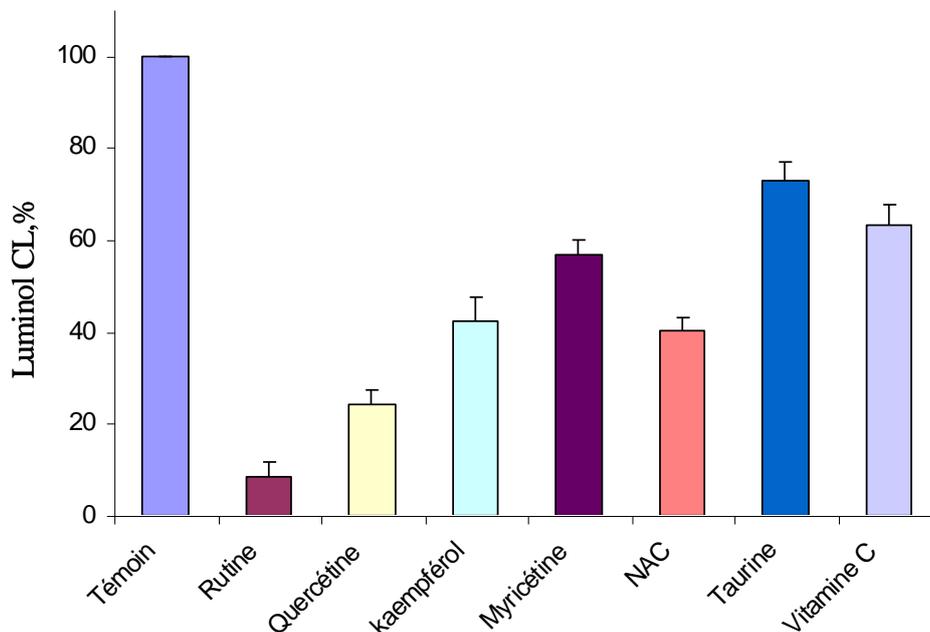


Figure 31 : Effet des flavonols, NAC, Vitamine C et Taurine sur la chimiluminescence du luminol HOCl-induite. Cette expérience est effectuée dans les mêmes conditions expérimentales indiquées dans la figure 29. Chaque point représente la moyenne \pm SD d'au moins 3 mesures indépendantes ($n = 3$) et chaque expérience est répétée deux fois.

En utilisant les mêmes conditions expérimentales, l'activité scavenger de la quercétine vis-à-vis de l'HOCl est comparée avec celle des composés connus depuis longtemps comme des anti-oxydants. Les résultats de la figure 31 montrent qu'à une concentration de $1\mu\text{M}$, le NAC, une substance ayant un groupement thiol libre, taurine, substance avec un groupement amine libre et la vitamine C, ayant une fonction ène-diol hautement réductrice, sont moins efficace que la quercétine sur l'inhibition de l'oxydation du luminol après injection de NaOCl. Les pourcentages d'inhibition de l'oxydation du luminol par le NAC, taurine et vitamine C sont respectivement de $59,6 \pm 2,7 \%$, $27,2 \pm 4 \%$, et $36,7 \pm 4,5 \%$.

Afin, d'évaluer le degré de l'effet scavenger de différentes substances testées sur l'HOCl, la concentration inhibitrice 50 (IC₅₀) a été estimée en utilisant la droite de régression pour chaque substance. D'après le tableau 2 nous constatons que parmi la série de molécules choisies, la rutine est la plus active. Une concentration de 0,3µM seulement de la rutine est nécessaire pour inhiber 50% l'oxydation de luminol HOCl-induite. Cette concentration est inférieure de huit fois celle du NaOCl utilisée dans cette partie expérimentale. Toutes les autres substances donnent une inhibition de 50% la réponse chimiluminescence à des concentrations aux environs de 1 µM. Ainsi, la valeur des IC₅₀ de NAC, de quercétine et de kaempférol sont de 0,8, 0,85 et 0,9 µM respectivement. Myricétine avec trois groupes OH sur le cycle aromatique B avait une IC₅₀ la plus élevée de 1,1 µM en comparaison avec les autres flavonols testés dans cette étude. Finalement, la valeur d' IC₅₀ de la vitamine C et de la taurine est de 1,3 et 3,0 µM respectivement.

Tableau 2 : Les valeurs d'IC₅₀ des différentes substances sur l'oxydation du luminol induite par l'HOCl.

Substance inhibitrice	IC ₅₀ µM
Quercétine	0,85
Rutine	0,3
Kaempférol	0,9
Myricétine	1,1
NAC	0,8
Vitamine C	1,3
Taurine	3,0

A l'issue de ces résultats nous avons constaté que la capacité de la quercétine à piéger l'HOCl est moins efficace que son dérivé glycosyl, la rutine. Ce constat peut évoquer un rôle possible de résidu *O*-rhamnoglucosyl de rehausser l'activité scavenger sur l'HOCl. Pour confirmer hypothèse de la responsabilité de cette structure vis-à-vis de l'effet scavenger, nous avons traité la rutine par une enzyme la naringinase pour la convertir à

son dérivé aglycone, quercétine. Comme illustré par la figure 32, à une concentration de 0,6 μM , la rutine traitée a exercé uniquement une légère inhibition sur la cinétique de la génération lumineuse durant l'oxydation du luminol par le NaOCl comparée avec la rutine non traitée, qui a inhibé la cinétique de la luminescence puissamment.

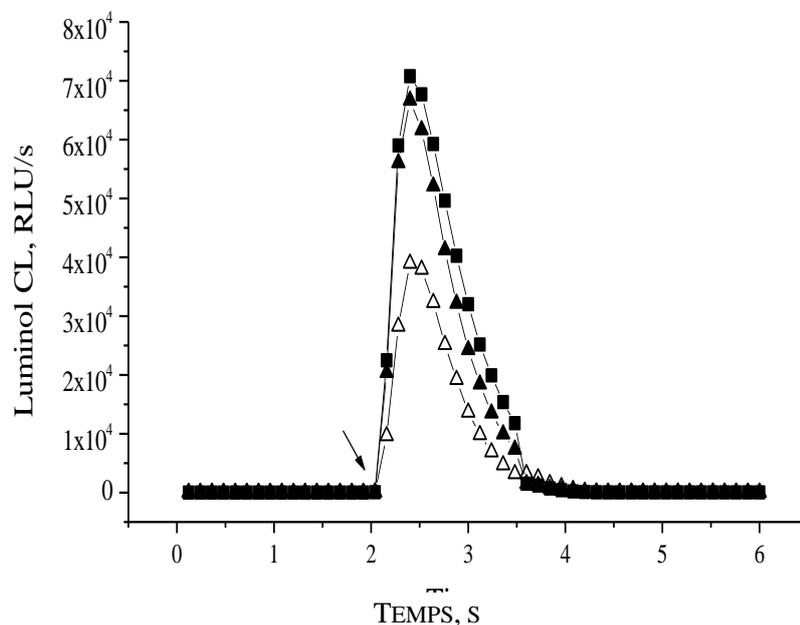


Figure 32 : Influence de résidu *O*-rhamnoglucosyl de la rutine sur la cinétique de luminescence du luminol induite par l' HOCl . L'expérience est effectuée en présence de la rutine traitée (▲) et non traitée (△) avec naringinase. L'échantillon sans rutine est aussi indiqué (■). La luminescence est enregistrée comme décrits dans la figure 29.

8. Activité anti-Inflammatoire de la génistéine et de la quercétine

Les travaux antérieurs menés dans le Laboratoire de pharmacologie respiratoire de l'unité de recherche UPRES EA 220, Paris V, France, ont permis de mettre au point un modèle de culture à court terme des fragments du parenchyme pulmonaire humain. Le modèle ainsi développé reproduit certains aspects de l'inflammation de la BPCO (Risse, 2006). Sur ce modèle *in vitro* des fragments du parenchyme pulmonaire humain, l'activité anti-inflammatoire de la quercétine et de la génistéine a été évaluée sur les productions, spontanées ou stimulées par LPS, des cytokines inflammatoires tels que le TNF- α , l'IL-8 et MIP-1 β .

8.1. Dosage de cytokines produites par le parenchyme pulmonaire humain

Les surnageants des explants de parenchyme pulmonaire, cultivés durant 4 et 24 heures en absence ou en présence du LPS (1 μ g /ml), sont utilisés pour doser le TNF- α , l'IL-8 et le MIP-1 β par la technique ELISA sandwich (limite de quantification d'ELISA est de 10pg/100ml). Les résultats obtenus, illustrés dans la **Figure 33**, montrent que dans les conditions basales, parmi les cytokines quantifiés, la concentration de MIP-1 β dans les surnageants de 4 et 24 heures est presque négligeable, elle correspond respectivement à 52 ± 14 pg / 100 mg et à 81 ± 27 pg / 100 mg de tissu, respectivement. La concentration de TNF- α était très faible dans les surnageants de 4 et 24 heures avec des concentrations respectives de 153 ± 37 pg / 100 mg et de 452 ± 46 pg / 100 mg de tissu. Les productions spontanées d'IL-8 étaient les plus élevées. Dans les surnageants d'explants du parenchyme pulmonaire humain, la concentration d'IL-8 était de 1896 ± 720 pg /100 mg de tissu à 4 heures et 56768 ± 20565 pg /100 mg de tissu à 24 heures.

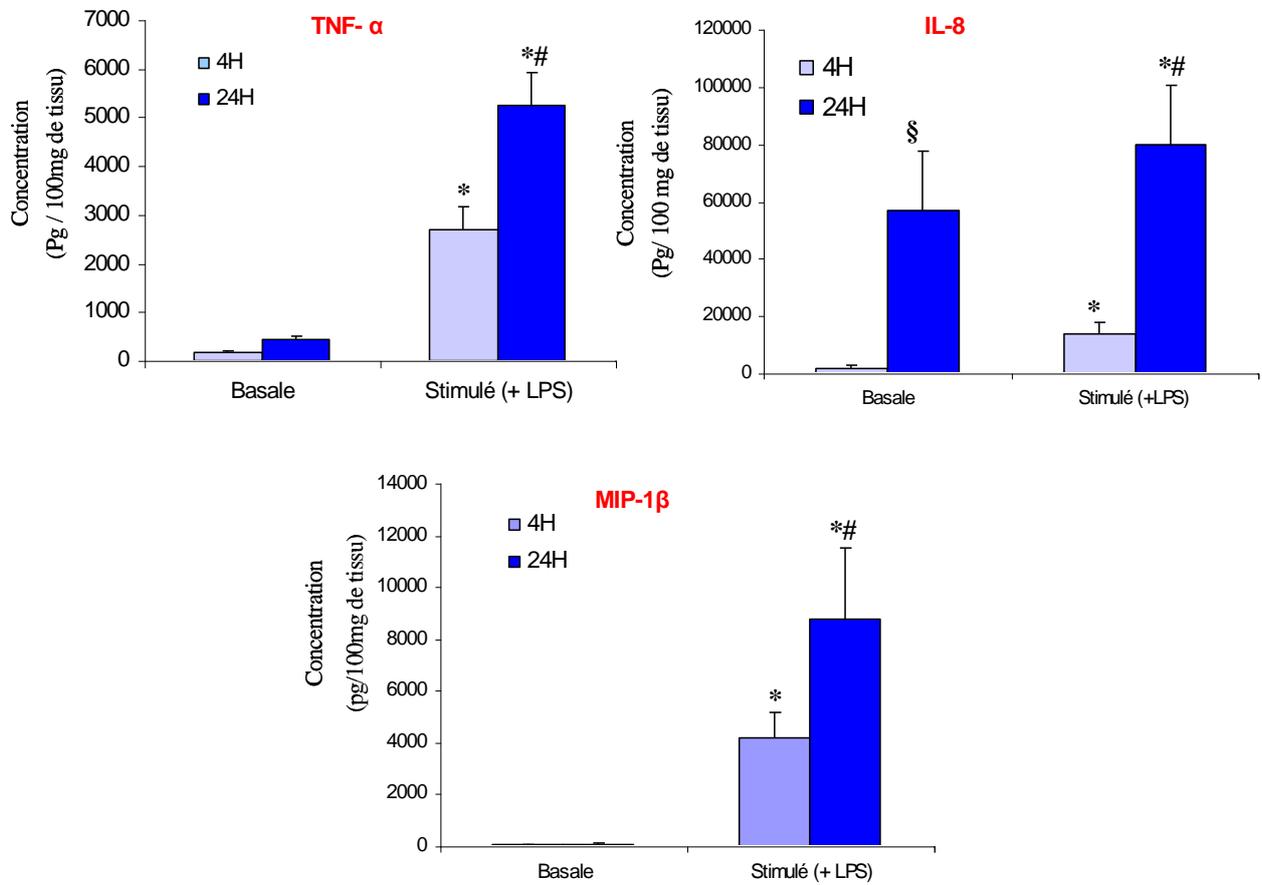


Figure 33 : Concentrations basales et en présence de LPS (1µg/ml) des cytokines inflammatoires dans les surnageants de parenchyme pulmonaire humain cultivés pendant 4 et 24 heures à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les valeurs sont exprimées en moyenne (pg/ 100 mg de tissu) ± s.e.m (n = 6). La différence statistique est considérée significative pour p < 0,05 : * Entre les préparations basales et stimulées ; # Entre les préparations stimulées de 4 et 24 heures ; § Entre les préparations basales de 4 et 24 heures.

L'exposition au LPS, sur les 6 tissus expérimentés, a induit une augmentation significative des cytokines ($p < 0,05$) (**Figure 33**). En comparaison avec les productions spontanées, les concentrations de TNF- α ont augmenté respectivement d'un facteur 17 et 11 dans les surnageants de 4 et 24 heures. Par ailleurs, on note une augmentation prononcée des concentrations du MIP-1 β avec un facteur d'environ 80 et de 100 dans les surnageants de 4 et 24 heures, respectivement. Les concentrations d'IL-8 mesurées dans les surnageants de 4 heures ont augmenté 7 fois en présence du LPS par rapport aux productions spontanées. Par contre, on note une élévation mais non significative entre les productions spontanées et stimulées au LPS d'IL-8 dans les surnageants de 24 heures. De même, les concentrations de ces cytokines produites en réponse au LPS sont augmentées en fonction du temps. Ainsi, dans les échantillons de 24 heures, les concentrations de TNF- α et de MIP-1 β mesurées dans les surnageants ont augmenté d'environ deux fois et celles de l'IL-8 de cinq fois en comparaison avec celles détectées dans les surnageants de 4 heures d'incubation (**Figure 33**).

8.2. Modulation des productions spontanées de TNF- α , d'IL-8 et de MIP-1 β par la génistéine et la quercétine

La modulation des productions de TNF- α , d'IL-8 et de MIP-1 β en présence de la génistéine et de quercétine, dans une gamme de concentrations allant de 3.10^{-6} à 3.10^{-5} M, a été évaluée dans les surnageants de parenchyme pulmonaire humain cultivé pendant 4 et 24 heures. Du fait que les productions spontanées de TNF- α et de MIP-1 β étaient faibles, l'effet de la génistéine et de la quercétine n'a pas été mise en évidence (**Figure 34**).

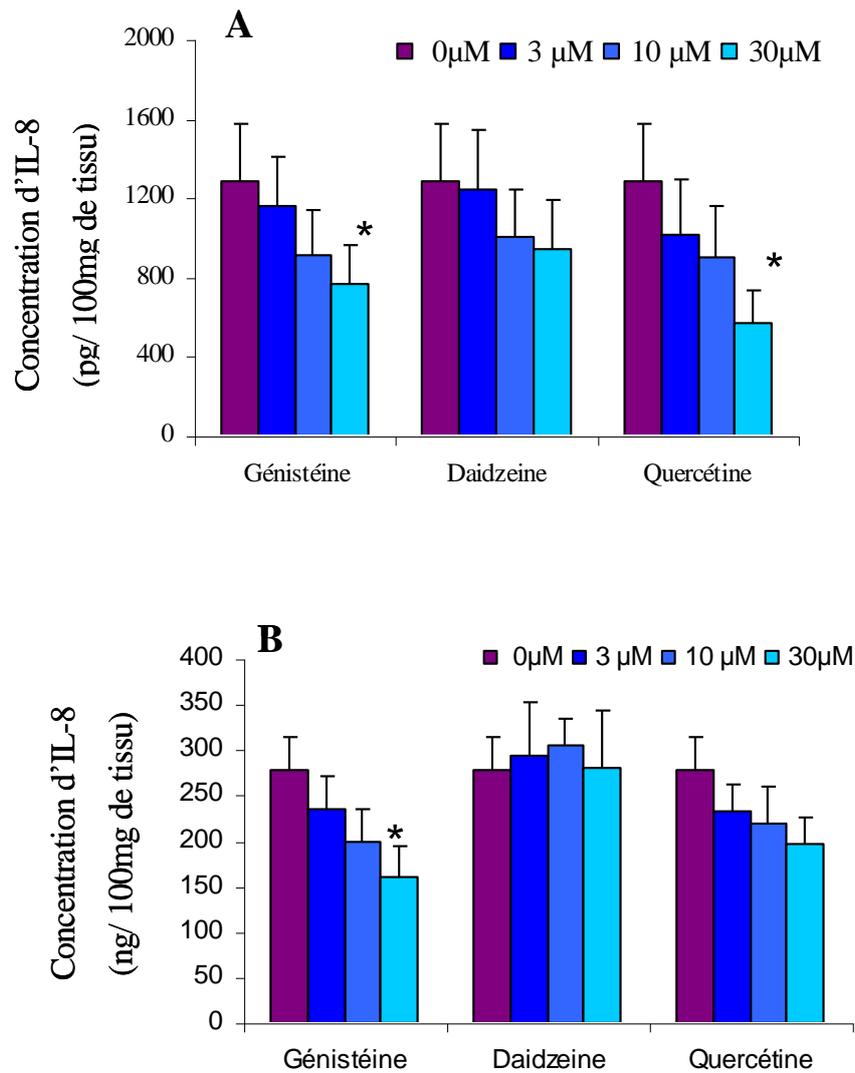


Figure 34: Effet des flavonoïdes sur les productions d'IL-8 dans les surnageants des fragments du parenchyme pulmonaire humain cultivés pendant 4 heures (A) et 24 heures (B) en absence de LPS. Les valeurs sont exprimées en moyenne (pg ou ng/100 mg de tissu) \pm s.e.m. Chaque point représente la moyenne \pm s.e.m de 5-6 expériences indépendantes. *La différence statistique est considérée significative pour $P < 0,05$.

Comme illustré dans la **Figure 34**, la génistéine et la quercétine réduisent de manière concentration-dépendante les productions spontanées d'IL-8. L'effet de la génistéine est près que comparable sur la production d'IL-8 dans les surnageants de 4 et 24 heures dont on note une inhibition maximale de $43 \pm 5 \%$ ($p < 0,05$). La quercétine est plus efficace sur les productions de 4 heures avec un effet maximal significatif de $57 \pm 4 \%$ ($p < 0,05$) contre $27 \pm 6 \%$ d'inhibition sur les productions d'IL-8 pendant 24 heures. Par contre, La daidzeine est sans effet apparent sur les productions spontanées d'IL-8 et aucun effet n'a été observé en présence de la rutine (résultats non présentés).

8.3. Effet inhibiteur de la génistéine sur les productions LPS-induites de TNF- α , IL-8 et de MIP-1 β

L'activité inhibitrice de la génistéine est concentration-dépendante, sur les productions de TNF- α , d'IL-8 et de MIP-1 β par le parenchyme pulmonaire humain cultivé pendant 4 et 24 heures (**Figures 35, 36 et 37**). Dans les surnageants d'explants de parenchyme pulmonaire cultivé durant 4 heures, les inhibitions maximales obtenues en présence de la génistéine sur les productions LPS-induites atteignent $69 \pm 8 \%$ pour le TNF- α , $53 \pm 10 \%$ pour le MIP-1 β et $57 \pm 7\%$ pour l'IL-8. Une réduction significative de la production des cytokines en présence de la génistéine est observée à partir de 10^{-5} M dont le pourcentage d'inhibition est de $63 \pm 4 \%$ ($p < 0,01$) pour le TNF- α , de $41 \pm 11 \%$ ($p < 0,05$) pour le MIP-1 β , et de $43 \pm 7 \%$ ($p < 0,05$) pour l'IL-8 (**Figures 35A, 36A et 37A**).

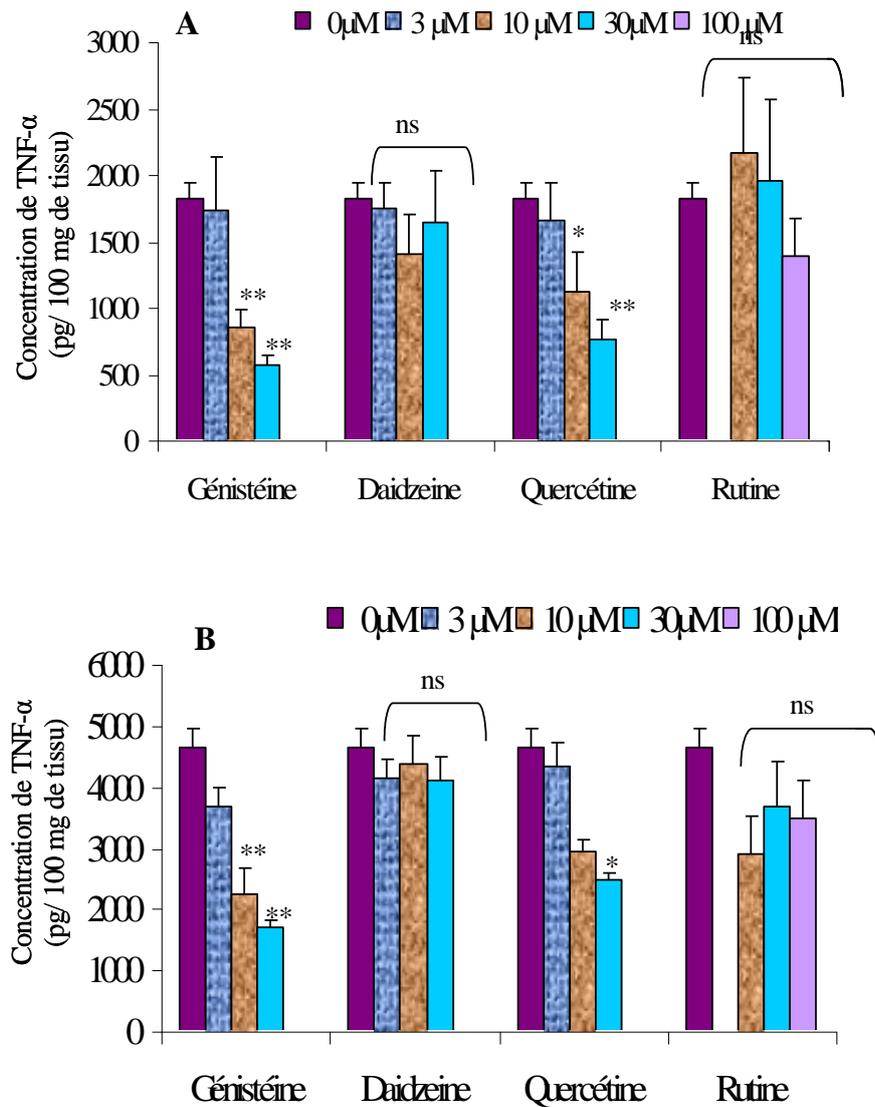


Figure 35 : Effet des flavonoïdes sur les productions de TNF- α dans les surnageants des fragments du parenchyme pulmonaire humain cultivés pendant 4 heures (A) et 24 heures (B) en présence de LPS. Les valeurs sont exprimées en moyenne (pg/100 mg de tissu) \pm s.e.m. Chaque point représente la moyenne de 6-7 expériences indépendantes. La différence statistique significative est indiquée par rapport au témoin LPS (*P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ns. non significatif).

Par ailleurs, l'activité anti-inflammatoire de la daidzeine a été également étudiée sur ce modèle d'explants de parenchyme humain. Les résultats présentés dans la **Figure 35A** ont montré que la daidzeine, aux concentrations utilisées de 3.10^{-6} M à 3.10^{-5} M, inhibe les productions de TNF- α mais l'effet n'est pas significatif. L'effet inhibiteur maximal a été obtenu à la concentration de 10^{-5} M (37 ± 6 %). Cependant les productions d'IL-8 sont légèrement modifiées en présence de la daidzeine dont l'effet inhibiteur maximal a été obtenu à la concentration de 10^{-5} M (33 ± 11 %) (**Figure 36A**). En revanche, la daidzeine n'a aucun effet apparent sur les productions de MIP-1 β / 4 heures (**Figure 37A**).

Dans les surnageants d'explants de parenchyme pulmonaire cultivés durant 24 heures, les inhibitions maximales obtenues en présence de la génisteine sur les productions LPS-induites atteignent 63 ± 1 %, 52 ± 8 % et 39 ± 4 % pour le TNF- α , le MIP-1 β et l'IL-8 respectivement. Selon les résultats, on observe une réduction significative des productions à partir de 10^{-5} M pour le TNF- α (**Figure 35B**) et à partir de 3.10^{-5} M pour le MIP-1 β (**Figures 37B**). En outre, la daidzeine, aux concentrations utilisées, n'a entraîné aucune modification sensible sur les productions des cytokines (**Figures 35B, 36B et 37B**).

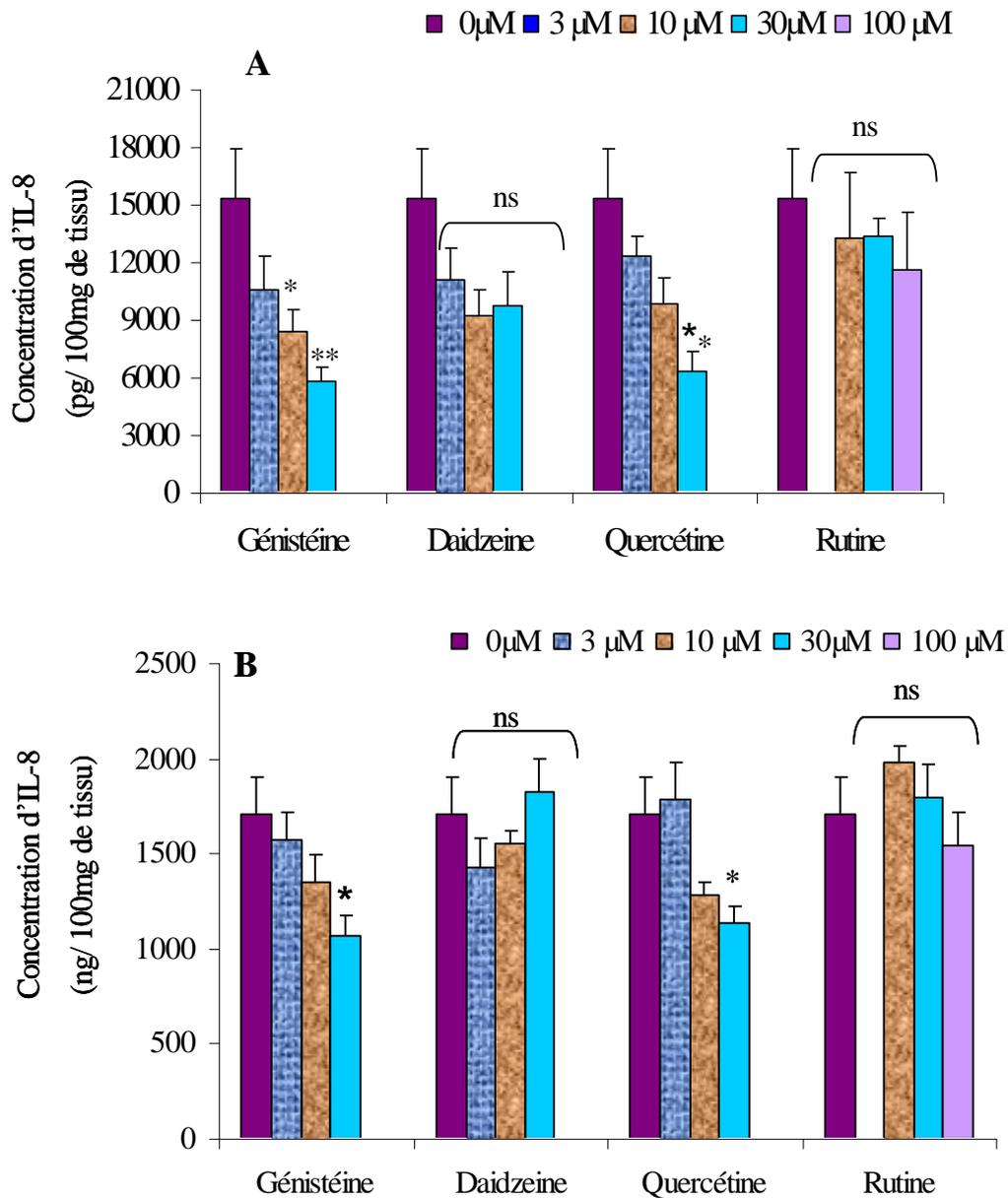


Figure 36 : Effet des flavonoïdes sur les productions d'IL-8 dans les surnageants des fragments du parenchyme pulmonaire humain cultivés pendant 4 heures (A) et 24 heures (B) en présence de LPS. Les valeurs sont exprimées en moyenne (pg ou ng/100 mg de tissu) \pm s.e.m. Chaque point représente la moyenne de 6-7 expériences indépendantes. La différence statistique significative est indiquée par rapport au témoin LPS (*P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ns. non significatif).

8.4. Effet inhibiteur de la quercétine sur les productions LPS-induites de TNF- α , d'IL-8 et de MIP-1 β

Dans les surnageants d'explants de parenchyme pulmonaire cultivés pendant 4 et 24 heures, la quercétine exerce un effet inhibiteur concentration-dépendante sur les productions de TNF- α , d'IL-8 et de MIP-1 β (**Figures 35, 36 et 37**). Les inhibitions maximales obtenues en présence de la quercétine sur les productions LPS-induites pendant 4 heures atteignent $71 \pm 5 \%$, $71 \pm 7 \%$ et $60 \pm 4\%$ pour le TNF- α , le MIP-1 β et l'IL-8, respectivement. En présence de ce flavonol, la réduction significative des productions est observée à partir 10^{-5} M dont le pourcentage d'inhibition est de $53 \pm 5 \%$ ($p < 0,05$) pour le TNF- α , de $49 \pm 8 \%$ ($p < 0,05$) pour le MIP-1 β et de $42 \pm 5 \%$ ($p < 0,05$) pour l'IL-8. Par ailleurs, l'activité anti-inflammatoire de la rutine a été également étudiée sur ce modèle d'explants de parenchyme pulmonaire humain. Les résultats présentés dans la **Figure 35A** ont montré que la rutine, aux concentrations utilisées de 10^{-5} M à 10^{-4} M, modifie les productions du TNF- α de façon non significative avec des grandes différences entre les 6 tissus expérimentés. A la concentration de 10^{-4} M, la rutine entraîne une inhibition moins apparente de 34% et de 24% sur les productions de TNF- α et d'IL-8 respectivement (**Figures 35A et 36A**).

Dans les surnageants d'explants de parenchyme pulmonaire cultivés durant 24 heures, les inhibitions maximales obtenues en présence de la quercétine sur les productions LPS-induites atteignent $43 \pm 4 \%$ pour le TNF- α , $61 \pm 13 \%$ pour le MIP-1 β et $27 \pm 6 \%$ pour l'IL-8, (**Figures 35B, 36B et 37B**). Selon, les résultats présentés dans les **figures 35B et 37B**, une réduction significative des productions est notée à une concentration de $3 \cdot 10^{-5}$ M pour le TNF- α et le MIP-1 β . Cependant, dans la gamme de concentration de la quercétine, aucune concentration n'a entraîné une réduction significative sur les productions d'IL-8. En outre, la rutine, aux concentrations utilisées, n'a entraîné aucune modification sensible sur les productions des cytokines (**Figures 35B, 36B et 37B**)

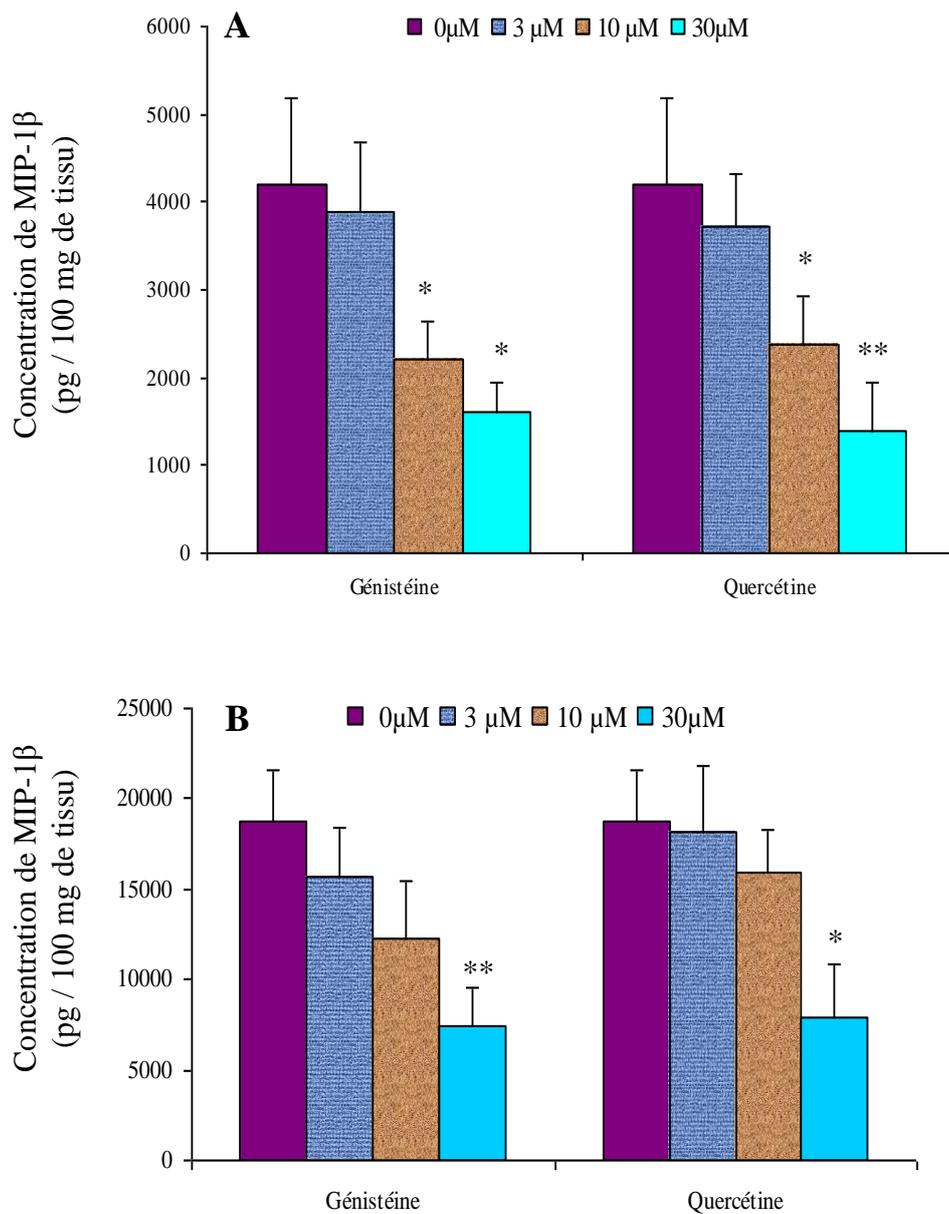


Figure 37 : Effet des flavonoïdes sur les productions de MIP-1 β dans les surnageants des fragments du parenchyme pulmonaire humain cultivés pendant 4 heures en présence de LPS. Les valeurs sont exprimées en moyenne (pg/100 mg de tissu) \pm s.e.m. Chaque point représente la moyenne de 6-7 expériences indépendantes. La différence statistique significative est indiquée par rapport au témoin LPS (*P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ns. non significatif).

A l'issue de ces résultats, on constate que les concentrations de la génistéine inhibant 50 % la production des cytokines (IC_{50}) sont : 6 μM pour le TNF- α , 25 μM pour l'IL-8 et 18 μM pour le MIP-1 β (**Tableau 3**). En comparaison avec les productions de 4 heures, l'activité inhibitrice de la génistéine sur les productions de 24 heures est deux fois moins faible avec une IC_{50} de 12 μM pour le TNF- α , de 30 μM pour le MIP-1 β et trois fois moins faible avec une IC_{50} de 79 μM pour l'IL-8 (**Tableau 3**). D'après ces résultats, on constate que l'effet inhibiteur de la génistéine est plus puissant sur les productions de TNF- α , relativement active sur le MIP-1 β et faiblement efficace sur les productions d'IL-8. Les concentrations de la quercétine induisant une inhibition de 50 % la production des cytokines (IC_{50}) sont : 10 μM pour le TNF- α , 15 μM pour l'IL-8 et 10 μM pour le MIP-1 β (**Tableau 3**). En comparaison avec les productions de 4 heures, l'activité inhibitrice de la quercétine est faiblement efficace sur les productions de 24 heures avec des IC_{50} : 40 μM pour le TNF- α , 16 μM pour le MIP-1 β et > 100 μM pour l'IL-8 (**Tableau 3**). Ainsi, ces résultats ont montré que l'activité anti-inflammatoire de la quercétine après 4 heures d'incubation est puissante sur les productions de TNF- α et le MIP-1 β et relativement efficace sur les productions d'IL-8.

Tableau 3 : Puissance d'inhibition de la génistéine et de la quercétine sur la sécrétion des médiateurs inflammatoires par le parenchyme pulmonaire humain cultivé en présence de LPS pendant 4 et 24 heures.

Cytokines	Parenchyme pulmonaire humain cultivé en présence de LPS (1µg/ml)							
	4heures (n=6)				24 heures (n=6)			
	Génistéine		Quercétine		Génistéine		Quercétine	
	pIC ₅₀	IC ₅₀ (µM)	pIC ₅₀	IC ₅₀ (µM)	pIC ₅₀	IC ₅₀ (µM)	pIC ₅₀	IC ₅₀ (µM)
TNF-α	5,1 ±0,2	6	5 ±0,05	10	4,9±0,04	12	4,4±0,1	40
IL-8	4,6±0,3	25	4,8±0,2	15	4,1±0,2	79	3,9±0,2	125
MIP-1β	4,7 ±0,3	18	5±0,2	10	4,5±0,2	30	4,78±0,4	16

Les pIC₅₀ (-logIC₅₀), concentration de la génistéine ou de la quercétine qui inhibe de 50% la production des cytokines inflammatoires, indiqués dans le tableau ci-dessus sont déterminés graphiquement en utilisant la droite de régression représentant le pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme décimal de la concentration de flavonoïde. n : nombre d'expérience

9. ETUDES FONCTIONNELLES SUR LES BRONCHES HUMAINES ISOLEES

Avec la technique de cuve à organe isolé précédemment décrite, il nous a été possible d'étudier l'effet de la génisteine et de la quercetine ainsi que leur mode d'action sur la réponse contractile des bronches humaines intactes. Afin d'évaluer les potentialités bronchorelaxantes de la génisteine et de la quercetine, des courbes de relaxation concentration-dépendante ont été réalisées sur des préparations bronchiques humaines isolées precontractées par deux agonistes contractiles : l'histamine (10^{-5}M) et l'acétylcholine (10^{-6}M). Par ailleurs, l'intérêt clinique et le mécanisme d'action de l'effet relaxant de la génisteine et de la quercetine ont été mis au point en présence des modulateurs relaxants connus d'interférer avec la voie de relaxation.

9.1. Effet anti-spasmodique de la génisteine et de la quercetine sur les bronches humaines isolées

La relaxation des bronches humaines est nettement observée en présence de la génisteine et de la quercetine dans une manière concentration-dépendante (**Figure 38 A et B**). Dans la première série d'expérience, la comparaison de l'effet relaxant de la génisteine et de la quercetine est effectuée sur les anneaux de bronches humaines precontractés avec l'acétylcholine et l'histamine (**Tableau 4**). La génisteine et la quercetine exercent un effet relaxant presque similaire sur les préparations bronchiques precontractées à l'histamine et l'acétylcholine. Ce résultat est illustré sur les courbes de la figure 38 A et B, où on note un faible décalage entre les courbes établies en présence de l'histamine et de l'acétylcholine. De plus, à fortes concentrations de génisteine et de quercetine, ces deux courbes se chevauchent. A des concentrations relativement élevées ($> 3 \cdot 10^{-5}\text{M}$) de génisteine et de quercetine, la relaxation des bronches en réponse aux deux agonistes contractiles est abolie (**Figure 38 A et B, Tableau 4**). Les concentrations $\leq 3 \cdot 10^{-5}\text{M}$ ont été sélectionnées pour étudier les modalités d'action de la quercetine et de la génisteine sur la relaxation de la bronche humaine.

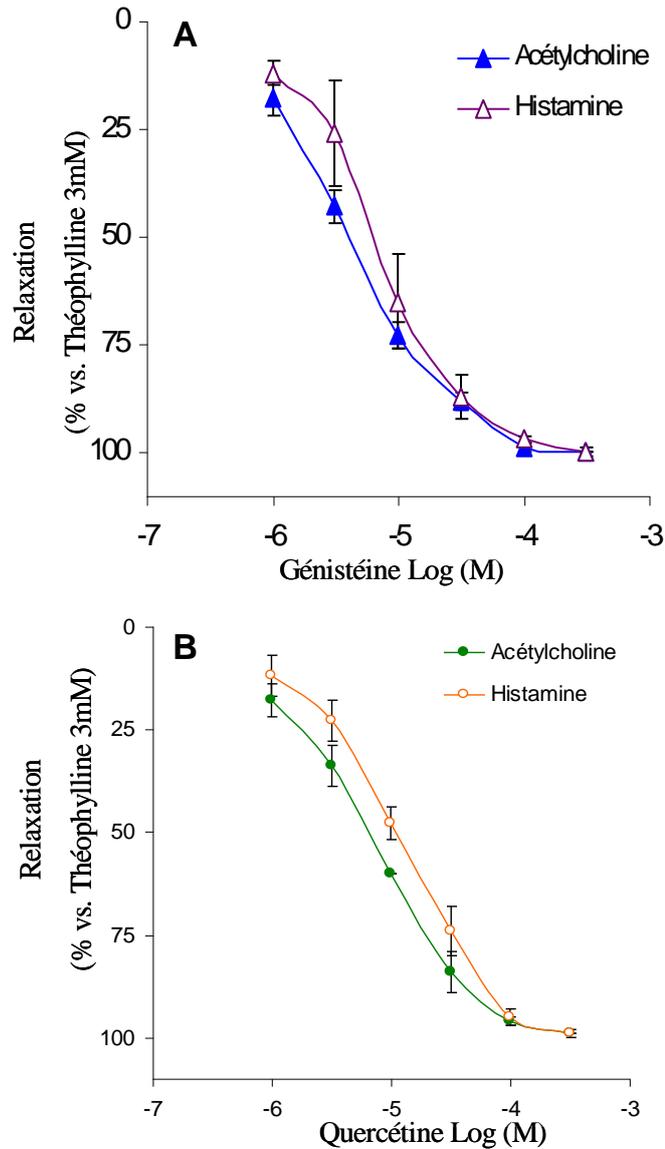


Figure 38 : Effet anti-spasmodique de la génisteine (A) et de la quercétine (B) sur les anneaux des bronches humaines precontractées avec l’histamine (10^{-5} M) et l’acétylcholine (10^{-6} M). Les valeurs sont exprimées en pourcentages de relaxation maximale obtenue avec $3 \cdot 10^{-3}$ M de théophylline. Chaque point représente la moyenne \pm s.e.m d'au moins 5 expériences indépendantes.

Tableau 4 : Les paramètres pharmacologiques Emax et pD2 de l'effet anti-spasmodique des flavonoïdes sur les bronches humaines precontractées à l'histamine et l'acétylcholine.

Flavonoïdes	Bronche humaine precontractée à							
	Histamine ⁽¹⁾ 10 ⁻⁵ M				Acétylcholine ⁽²⁾ 10 ⁻⁶ M			
	n	pD2 (-log EC ₅₀)	EC ₅₀ (μM)	Emax %	n	pD2 (-log EC ₅₀)	EC ₅₀ (μM)	Emax %
Genisteine	5	5,2 ± 0,2	6	100 ± 0	6	5,4 ± 0,1	4	100 ± 1
Daidzeine	5	4,5 ± 0,2	32	66 ± 11	5	4,9 ± 0,2	13	51 ± 3
Quercetine	5	5,0 ± 0,1	8	99 ± 0	6	5,2 ± 0,1	6	99 ± 0
Rutine	5	4,6 ± 0,03	27	64 ± 3	5	5,0 ± 0,2	10	58 ± 9

Les valeurs Emax (effet relaxant maximale à 3.10⁻⁴M) et pD2 (concentration à laquelle 50% de l'effet maximal est atteint) sont calculées à partir des courbes concentration-réponse des flavonoïdes sur les bronches humaines precontractées à l'histamine et l'acétylcholine.⁽¹⁾ et ⁽²⁾ durant ces expériences, l'histamine (10⁻⁵ M) et acétylcholine (10⁻⁶ M) ont induit une contraction correspondant à 51 ± 5 % et 38 ± 5 % respectivement, de la contraction maximale obtenue avec l'acétylcholine (3.10⁻³M). n : nombre d'expérience.

Par ailleurs, une relaxation concentration-dépendante est observée avec l'augmentation cumulative des concentrations de daidzeine dans les préparations de bronches humaines precontractées soit avec l'histamine ou l'acétylcholine (**Figure 39 A et C**). En comparaison avec la génisteine, la daidzeine ($3.10^{-4}M$) est faiblement relaxante avec une relaxation maximale (E_{max}) de $66 \pm 11\%$ et $51 \pm 3\%$ de la précontraction des bronches humaines à l'histamine et l'acétylcholine, respectivement. À la même concentration, la génisteine exerce une relaxation maximale (E_{max}) de 100% sur les bronches humaines precontractées avec les deux agonistes contractiles (**Tableau 4**). Sur les préparations bronchiques précontractées à l'histamine et l'acétylcholine, les concentrations de génisteine induisant 50 % de la relaxation maximale sont respectivement de 6 μM et 4 μM . Ces EC_{50} sont 5 et 3 plus faibles de celles de la daidzeine (**Tableau 4**). Cela signifie que la génisteine est plus puissante sur l'inhibition de la réponse contractile obtenue avec les deux spasmogènes que son analogue inactif sur les tyrosines kinases, daidzeine. Aux concentrations utilisées, la rutine ($10^{-6} M$ à $3.10^{-4} M$) exerce un effet relaxant moins prononcé sur les préparations bronchiques en comparaison avec son analogue aglycone la quercétine (**Figures 39 B et D**). Cette relaxation est dépendante de la dose dont les relaxations maximales atteignent $64 \pm 3 \%$ et $58 \pm 9 \%$ de la précontraction provoquée avec l'histamine et l'acétylcholine respectivement. La quercétine est plus efficace sur les précontractions obtenues avec les deux agonistes puisqu'elle induit des relaxations dépassant les 90% de la précontraction (**Tableau 4**). La quercétine est aussi plus puissante sur la précontraction des bronches humaines avec l'histamine ou l'acétylcholine dont les EC_{50} sont respectivement de 8 μM et de 6 μM . Par contre, les concentrations de rutine nécessaires pour induire 50 % de la relaxation maximale sur la précontraction avec l'histamine et l'acétylcholine sont respectivement de 27 μM et de 10 μM (**Tableau 4**).

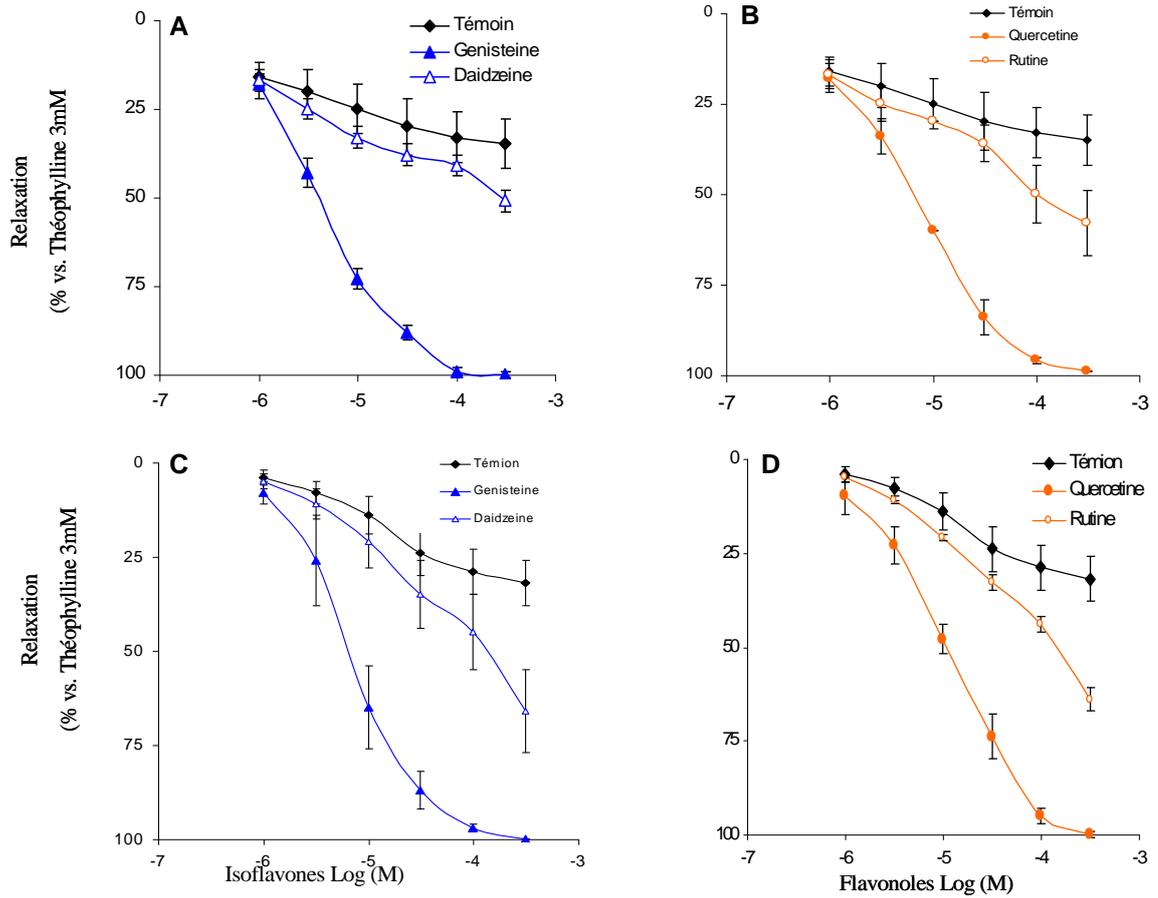


Figure 39: Courbes concentration-réponse aux flavonoides sur les anneaux des bronches humaines precontractées avec 10^{-6} M d'acétylcholine (A et B) et avec 10^{-5} M d'histamine (C et D). Les valeurs sont exprimées en pourcentages de relaxation maximale obtenue avec 3.10^{-3} M de théophylline. Chaque point représente la moyenne \pm s.e.m de 5-7 expériences indépendantes.

Dans cette étude, le DMSO utilisé pour la préparation des flavonoides est sans effet apparent sur la précontraction des bronches à l'histamine et l'acétylcholine.

Sur la base de ces observations, la génistéine et la quercétine, exercent une action relaxante prononcée sur la bronche humaine isolée, tant au niveau de la concentration requise pour induire 50% de la réponse maximale qu'au niveau de la réponse maximale elle-même. Ainsi, l'ordre d'efficacité et de puissance des flavonoides testés est le suivant : génistéine \approx quercétine \gggg rutine \approx daidzéine.

A la vue de ces résultats, une série d'expériences complémentaires a été effectuée pour déterminer le mode d'action de la génistéine et de la quercétine au niveau de la voie de signalisation impliquée dans la relaxation du muscle lisse bronchique.

9.2. Effet de la génistéine et de la quercétine sur la relaxation induite par les agonistes β 2 adrénergiques

Afin de vérifier la possibilité que les relaxations induites par les flavonoides, particulièrement la génistéine et la quercétine, soient médiées par les cibles de la voie AMPc, l'action relaxante des flavonoides est étudiée en association avec les β 2 mimétiques. Les agonistes β 2 adrénergiques, tels que l'isoprénaline et le formotérol, sont des relaxants de référence sur les muscles lisses des bronches humaines. La stimulation de récepteurs β 2 passe par l'activation des protéines kinases via l'augmentation du taux intracellulaire de l'AMPc dont la conséquence est la phosphorylation des protéines impliquées dans le tonus musculaire lisse. Ces effets sont mis à profit notamment dans le traitement de l'obstruction bronchique. L'effet bronchorelaxant de l'isoprénaline (ISO) est étudié en absence et en présence des quatre flavonoides testés sur les préparations bronchiques contractées à l'histamine (10^{-5} M) et l'acétylcholine (10^{-6} M). Les résultats (**Figures 40 et 41**) montrent la potentialisation de l'effet relaxant de l'isoprénaline sur les bronches humaines en présence de la génistéine et la quercétine. Sur les préparations bronchiques précontractées à l'acétylcholine, la génistéine, aux concentrations utilisées de 10^{-5} M et 3.10^{-5} M, a permis un déplacement des courbes concentration-réponses à l'isoprénaline vers la gauche (**Figure 40 A**). Pour les deux concentrations de génistéine testées, le décalage a été significatif à partir de 10^{-9} M ($p < 0,05$). Dans les préparations bronchiques témoins, la relaxation maximale a été obtenue à 3.10^{-7} M ($93 \pm 4\%$) et le pD2 était de $8,1 \pm 0,2$ soit donc une EC_{50} de 7,4 nM. En présence de la génistéine, l' EC_{50} est significativement diminuée d'environ 5 fois ($p < 0,05$) et la relaxation est complète (**Tableau 5**).

L'efficacité (E_{max}) et la puissance (pD_2) de l'effet relaxant d'isoprénaline sont significativement plus prononcées en présence de la genisteine en comparaison avec son analogue inactif sur les tyrosines kinases, daidzeine (**Tableau 5**). En présence de la daidzeine, les courbes concentration-réponse d'isoprénaline sont faiblement déplacées vers la gauche. Ce décalage s'observe beaucoup plus à fortes concentrations d'isoprénaline en association avec la daidzeine à $3 \cdot 10^{-5}$ M (**Figure 40 C**). En présence de quercétine à une concentration de 10^{-5} M, on note un décalage non significatif de la courbe concentration-réponse à l'isoprénaline vers la gauche. Ce déplacement de la courbe est nettement significatif ($p < 0,05$) si la concentration de quercétine est portée à $3 \cdot 10^{-5}$ M (**Figure 40B**). Dans les préparations préincubées avec la quercétine à une concentration de $3 \cdot 10^{-5}$ M, la relaxation maximale est de 98 ± 3 % et l' EC_{50} était de 1,8 nM soit donc 4 fois inférieur par rapport à celle de la préparation bronchique témoin (**Tableau 5**). Cependant, la rutine à une concentration de 10^{-4} M n'a aucun effet apparent sur la courbe concentration-réponse à l'isoprénaline (**Figure 40D**).

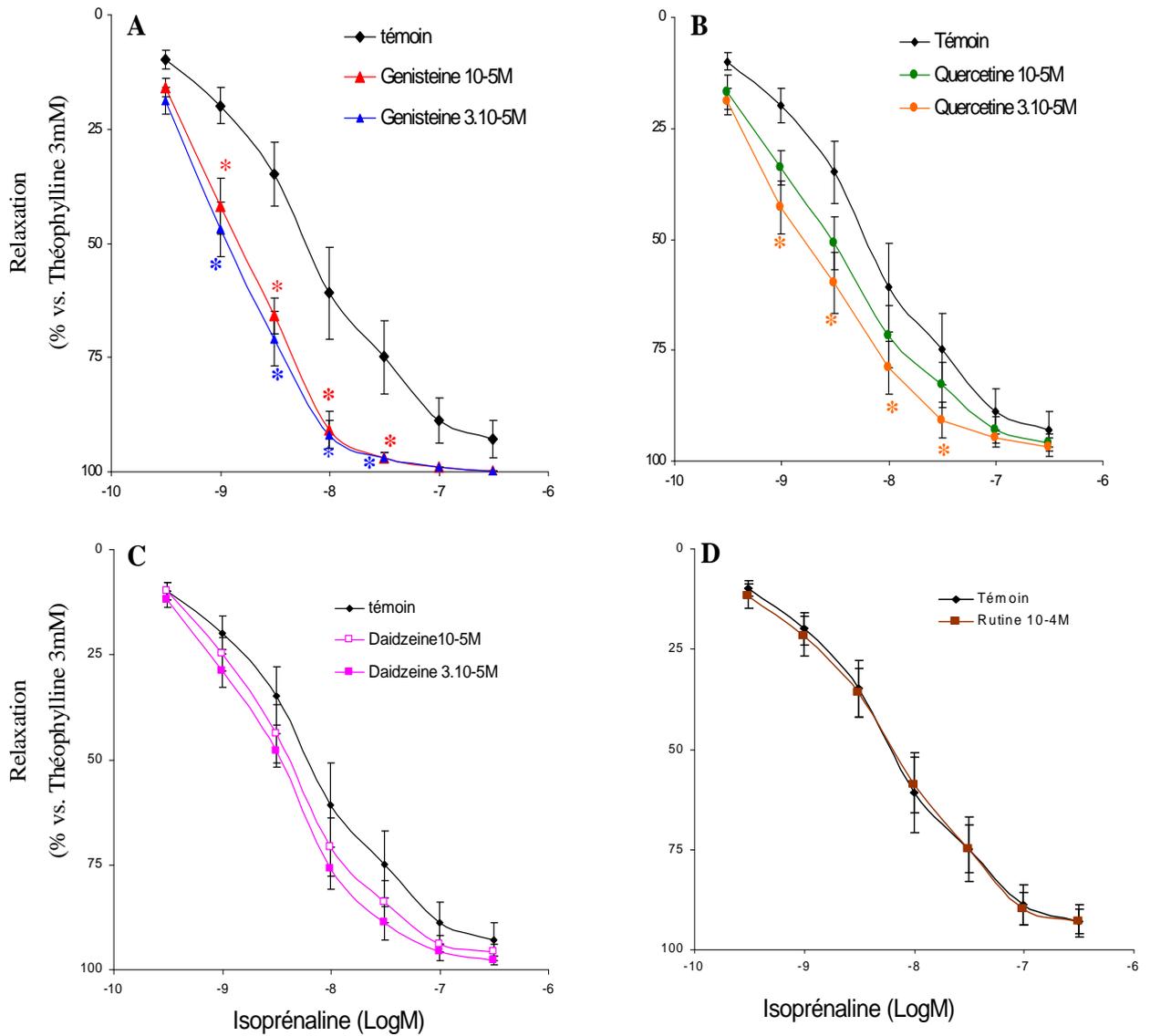


Figure 40 : Courbes concentration-réponses de l’isoprénaline seul (témoin) et en présence de la genisteine (A), quercetine (B), daidzeine (C) et rutine (D) sur les bronches humaines precontractées à l’acétylcholine ($10^{-6}M$). Les valeurs sont exprimées en pourcentages de la relaxation maximale obtenue avec $3.10^{-3}M$ de théophylline. Chaque point représente la moyenne \pm s.e.m de 5-7 expériences indépendantes. * La différence statistique significative pour $p < 0,05$ est indiquée par rapport à la courbe concentration-réponse témoin.

Tableau 5 : L'effet des flavonoïdes sur les valeurs Emax et pD2 de l'isoprénaline sur les bronches humaines précontractées à l'histamine et l'acétylcholine.

Flavonoïdes	Bronche humaine précontractée à							
	Histamine 10 ⁻⁵ M				Acétylcholine 10 ⁻⁶ M			
	n	pD2 (-log EC ₅₀)	EC ₅₀ (nM)	Emax %	n	pD2 (-log EC ₅₀)	EC ₅₀ (M)	Emax %
Témoin (Isoprénaline seul)	7	8,2 ± 0,1	5,6	98 ± 1	7	8,1 ± 0,2	7,4	93 ± 4
+ Genisteine (10 ⁻⁵ M)	7	8,7 ± 0,1*	1,8	99 ± 1	7	8,8 ± 0,1*	1,5	100 ± 0
+ Genisteine (3 .10 ⁻⁵ M)	7	9,0 ± 0,1*	1,0	100 ± 1	7	8,9 ± 0,1*	1,2	100 ± 1
+ Daidzeine (10 ⁻⁵ M)	7	8,5 ± 0,2	3,2	96 ± 1	7	8,4 ± 0,1	4,1	96 ± 2
+ Daidzeine (3.10 ⁻⁵ M)	5	8,5 ± 0,2	3	99 ± 1	6	8,5 ± 0,1	3,2	98 ± 1
+ Quercetine (10 ⁻⁵ M)	6	8,7 ± 0,1*	2,1	99 ± 0	5	8,5 ± 0,1	2,8	92 ± 4
+ Quercetine (3.10 ⁻⁵ M)	7	8,7 ± 0,1*	1,8	99 ± 0	7	8,7 ± 0,1*	1,8	97 ± 2
+ Rutine (10 ⁻⁴ M)	7	8,2 ± 0,1	6	99 ± 0	7	8,2 ± 0,2	1,9	93 ± 3

Les valeurs Emax (effet relaxant maximale à 3.10⁻⁴M) et pD2 (concentration à laquelle 50% de l'effet maximal est atteint) sont calculées à partir des courbes concentration-réponses à l'isoprénaline seul ou associée à chacun des flavonoïdes sur les bronches humaines précontractées à l'histamine et l'acétylcholine. * La différence statistique est considérée significative pour p < 0,05 des préparations bronchiales prétraitées par rapport au témoin (isoprénaline seul). n : nombre d'expérience.

Si la même expérience est répétée sur les préparations bronchiques précontractées à l'histamine (10^{-5} M), aux concentrations testées (10^{-5} M et 3.10^{-5} M), la genisteine et la quercétine ont permis un déplacement des courbes concentration-réponses à l'isoprénaline vers la gauche (**Figures 41 A et B**). Ce déplacement des courbes est significatif à partir de 3.10^{-9} M d'isoprénaline. La contraction des préparations bronchiques témoins ou traitées est complète; la relaxation maximale dépasse les 98% (**Tableau 5**). Cependant, la puissance (pD₂) de l'isoprénaline est significativement augmentée ($p < 0,05$) en présence de la génistéine ou de quercétine en comparaison avec la préparation témoin (Tableau 5). La daidzeine ne semble pas avoir un effet significatif sur les relaxations induites par l'isoprénaline. En présence de la daidzeine, aux concentrations utilisées de 10^{-5} M et de 3.10^{-5} M, les courbes concentration-réponses à l'isoprénaline sont légèrement déplacées vers la gauche. Ce décalage est plus ou moins net aux faibles concentrations d'isoprénaline (**Figure 41 C**). Ainsi la génistéine est plus puissante sur les relaxations induites par l'isoprénaline que son analogue inactif sur les tyrosines kinases, la daidzeine. La concentration d'isoprénaline nécessaire pour induire 50% de la relaxation maximale (EC₅₀) de la préparation témoin est de 5,63 nM. Cette EC₅₀ est diminuée d'un facteur 3 et 1,74 en présence de 10^{-5} M de génisteine et de daidzeine, respectivement. Cette diminution est nettement plus marquée si la concentration de la génisteine et de la daidzeine est portée à 3.10^{-5} M. L'effet maximal de l'isoprénaline ne peut être augmenté en présence de la génistéine et de quercétine car l'isoprénaline induit une relaxation déjà complète en l'absence de ces flavonoïdes (Tableau 5). En absence et en présence de 10^{-4} M de la rutine, l'isoprénaline relaxe de façon équivalente les préparations bronchiques (**Figure 41D**). Par comparaison, on constate que l'isoprénaline est légèrement plus efficace et plus puissant sur les préparations précontractées à l'histamine qu'avec l'acétylcholine (**Tableau 5**). A l'issue de ces résultats, nous avons étendu nos analyses en utilisant un autre β -2 mimétique plus sélectif, le formotérol. Une gamme de concentration de formotérol allant de 10^{-11} à 10^{-7} M est testée sur les préparations bronchiques humaines précontractées à l'histamine (10^{-5} M) en absence ou en présence de la genisteine et de la quercétine. Les résultats présentés dans la **figure 42** ont montré que la genisteine et la quercétine renforcent l'action relaxante du formotérol. Aux deux concentrations testées de 3.10^{-6} M et de 10^{-5} M, la génisteine et la quercétine ont permis un déplacement significatif de la courbe concentration-réponse au formotérol vers la gauche ($p < 0,05$). La génistéine et la quercétine potentialisent avec la même efficacité les relaxations induites par le formotérol (**Tableau 6**).

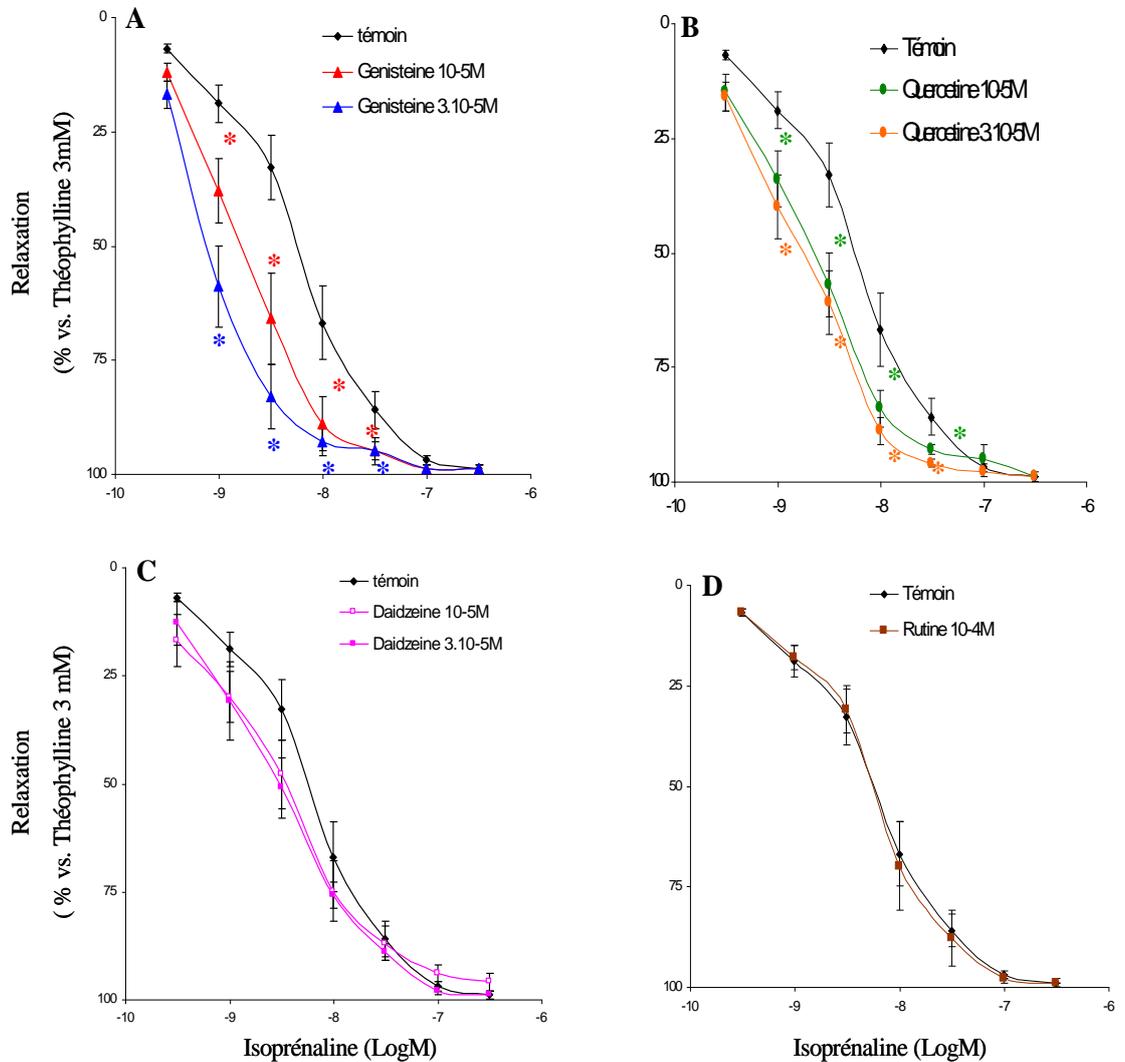


Figure 41: Courbes concentration-réponses de l'isoprénaline seul (témoin) et en présence de la genisteine (A), quercetine (B), daidzeine (C) et rutine (D) sur les bronches humaines precontractées à l'histamine ($10^{-5}M$). Les valeurs sont exprimées en pourcentages de la relaxation maximale obtenue avec $3.10^{-3}M$ de théophylline. Chaque point représente la moyenne \pm s.e.m de 5-7 expériences indépendantes. * La différence statistique significative pour $p < 0,05$ est indiquée par rapport à la courbe concentration-réponse témoin.

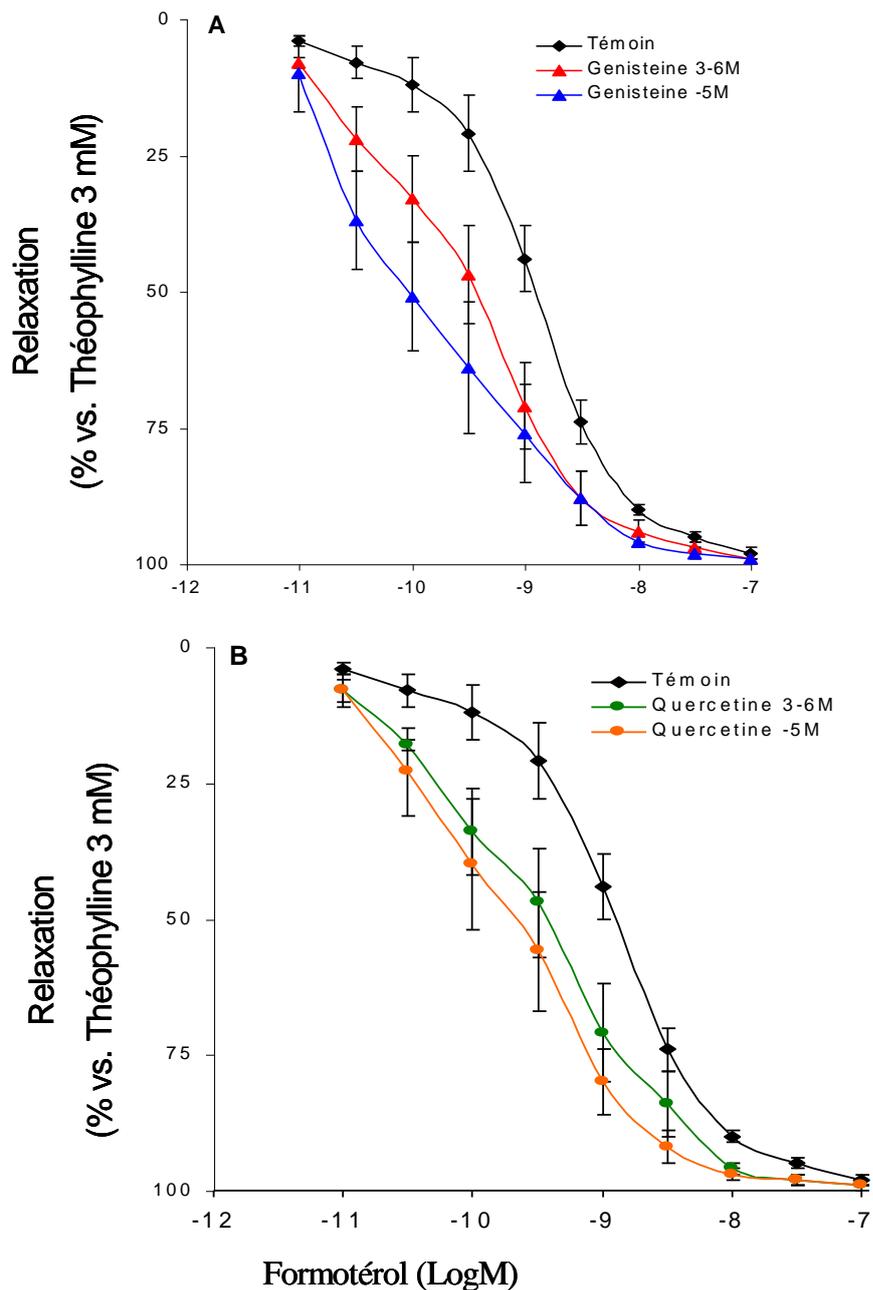


Figure 42: Courbes concentration-réponse de formotérol seul (témoin) et en présence de la genisteine (A) et quercetine (B) sur les bronches humaines precontractées à l’histamine (10^{-5}M). Les valeurs sont exprimées en pourcentages de la relaxation maximale obtenue avec 3.10^{-3}M de théophylline. Chaque point représente la moyenne \pm s.e.m de 5-8 expériences indépendantes.* $p < 0,05$ indique que la valeur diffère significativement de la valeur témoin équivalente.

Tableau 6 : Les valeurs Emax et pD2 de l'effet relaxant du formotérol en absence et en présence de la genisteine et de la quercétine sur les bronches humaines precontractées à l'histamine.

Flavonoïdes	Bronche humaine precontractée à			
	Histamine 10 ⁻⁵ M			
	n	pD2 (-LogEC ₅₀)	EC ₅₀ (nM)	Emax (%)
Témoin (Formotérol seul)	8	8,9 ± 0,1	1,2	98 ± 1
+ Genisteine (3x10 ⁻⁶ M)	7	9,5 ± 0,2*	0,2	99 ± 1
+ Genisteine (10 ⁻⁵ M)	7	10,0 ± 0,3*	0,1	99 ± 1
Témoin (Formotérol seul)	5	9,9 ± 0,1	1,2	98 ± 0
+ Quercétine (3x10 ⁻⁶ M)	5	9,5 ± 0,2*	0,3	98 ± 1
+ Quercétine (10 ⁻⁵ M)	5	9,7 ± 0,2*	0,2	100 ± 0

Les valeurs Emax et pD2 sont calculées à partir des courbes concentration-réponses de formotérol seul ou présence de la genisteine ou de la quercétine sur les bronches humaines precontractées à l'histamine. * La différence statistique est considérée significative par rapport au témoin (Formotérol seul); pour p < 0,05. n : nombre d'expérience.

9.3. Effet de la génisteine et de la quercétine sur la relaxation induite par les activateurs de la voie GMPc

Afin de mieux cerner les modalités d'action des relaxations induites par les flavonoides, nous avons étendu nos analyses en utilisant un activateur de la voie GMPc, le nitroprussiate de sodium (SNP). Sur les préparations bronchiques humaines precontractées à l'acétylcholine (10^{-6} M), le SNP (10^{-8}   3.10^{-4} M) a induit une relaxation concentration-dépendante (**Figure 43**). La relaxation maximale (E_{max}) a été obtenue à une concentration de 3.10^{-4} M est de 62 ± 5 % et la concentration induisant 50% de la relaxation maximale (EC_{50}) est de 10^{-6} M. En présence de la génisteine et de la quercétine (10^{-5} M), ces deux paramètres pharmacologiques, E_{max} et pD_2 , sont augmentés de façon importante (**Tableau 7**). Ainsi, la courbe concentration-réponse au SNP est déplacée vers la gauche et de façon significative ($p < 0,05$)   partir de la concentration de 10^{-6} M (**Figure 43**). A la même concentration de 10^{-5} M, la daidzeine est sans effet apparent sur les relaxations induites par le SNP (**Figure 43, Tableau 7**).

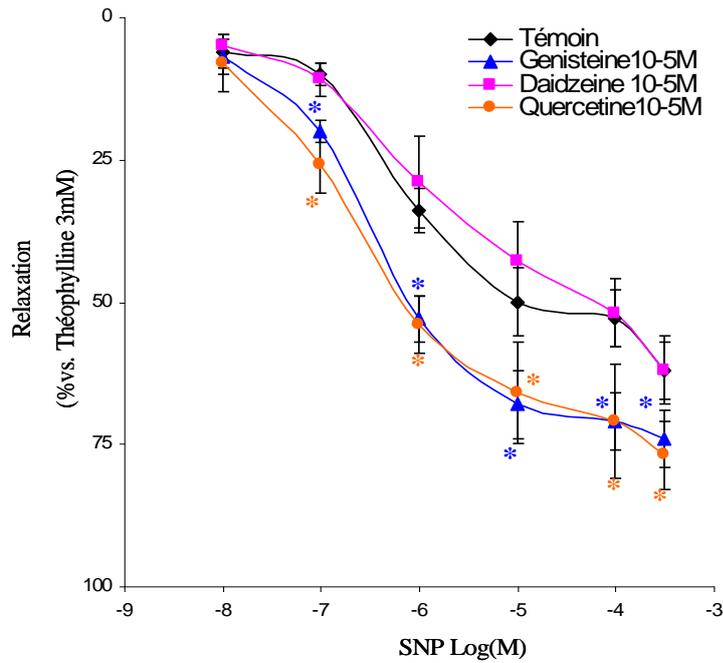


Figure 43: Courbes concentration-réponse de SNP seul (témoin) et en présence de la genisteine ($10^{-5}M$) daidzeine ($10^{-5}M$) et quercétine ($10^{-5}M$) sur les bronches humaines precontractées avec l'acétylcholine ($10^{-6}M$). Les valeurs sont exprimées en pourcentages de la relaxation maximale obtenue avec $3 \cdot 10^{-3} M$ de théophylline. Chaque point représente la moyenne \pm s.e.m de 5-8 expériences indépendantes. * $p < 0,05$ indique que la valeur diffère significativement de la valeur témoin équivalente.

Tableau 7: Les valeurs Emax et pD2 de l'effet relaxant du nitroprussiate de sodium (SNP) en absence et en présence de la genisteine et de la quercetine sur les bronches humaines precontractées avec l'acétylcholine.

Flavonoïdes	Bronche humaine precontractée à			
	Acétylcholine 10 ⁻⁶ M			
	n	pD2 (-LogEC ₅₀)	EC ₅₀ (μM)	Emax %
Témoin (SNP seul)	6	6,1 ± 0,2	1	62 ± 5
+ Genisteine (10 ⁻⁵ M)	6	6,5 ± 0,1*	0,28	74 ± 4
+ Daidzeine (10 ⁻⁵ M)	5	5,7 ± 0,4	2	62 ± 6
+ Quercetine (10 ⁻⁵ M)	7	6,6 ± 0, 1*	0,25	77 ± 6

Les valeurs Emax et pD2 sont calculées à partir des courbes concentration-réponses au nitroprussiate de sodium (SNP) seul ou présence de la génistéine, daidzeine ou de la quercétine sur les bronches humaines precontractées avec l'acétylcholine. *La différence statistique est considérée significative par rapport au témoin (SNP seul); pour p < 0,05. n : nombre d'expérience.

9.4. Effet de la génistéine et de la quercétine sur les contractions induites par le KCl et le CaCl₂ sur les bronches humaines isolées

Parmi les canaux calcique voltage-dépendants identifiés (T, L, M, R et P/Q), Les canaux de type L (VOC, voltage-operated channels) sont les plus réponsus au niveau du muscle lisse. L'ouverture des ces canaux VOC s'effectue à la suite de variations de la polarisation cellulaire. L'augmentation de la concentration extracellulaire des ions potassium induit une dépolarisation des membranes et l'ouverture des canaux VOC dont la conséquence est l'augmentation du calcium intracellulaire qui déclenche la contraction. Ainsi, un antagoniste du calcium peut diminuer le tonus vasculaire en bloquant, par exemple, l'entrée du calcium extracellulaire via les canaux VOC. Dans cette partie de travail, il s'est avéré nécessaire avant de mettre en évidence l'effet antagoniste de la génistéine et de la quercétine sur les canaux VOC, d'étudier d'abord leur effet inhibiteur sur les contractions KCl-induites. Aux concentrations utilisées, KCl (3,75 à 75 mM) induit des contractions concentration-dépendantes sur les préparations isolées de bronches humaines (**Figure 44**). L'effet inhibiteur de la génistéine et de la quercétine sur les contractions KCl-induites est illustré sur la figure 44A et B. En présence de la génistéine à la concentration de 10^{-5} M, on observe un déplacement significatif ($p < 0,05$) de la courbe concentration-réponse du KCl vers la droite (**Figure 44 A**). Aux concentrations de 10^{-6} M et 3.10^{-6} M, la génistéine est sans effet apparent sur la contraction KCl-induite. L'effet inhibiteur de la quercétine est plus important sur la contraction maximale KCl-induite que la génistéine. Aux concentrations de 3.10^{-6} M et 10^{-5} M, l'effet inhibiteur de la quercétine est significativement plus marqué sur la contraction KCl-induite (**Figure 44 B**).

Dans la gamme de concentration de génistéine et de quercétine étudiées, sur les préparations isolées de bronches humaines contractées avec 30 mM de KCl, la concentration inhibitrice 50 (IC₅₀) a été respectivement de 5 μ M et 7 μ M (Tableau 8). La daidzeine (10^{-5} M) et la rutine (10^{-4} M) n'ont entraîné aucune modification sensible sur les contractions KCl-induites (**Figure 44 C et D**). Afin de vérifier si l'effet inhibiteur de la génistéine et de la quercétine sur les contractions KCl-induites résulte du blocage des canaux calcique VOC, l'effet antagoniste de la génistéine et de la quercétine sur les contractions CaCl₂-induites a été étudié. Sur les préparations isolées de bronches humaines témoins, CaCl₂ (10^{-5} M à 3.10^{-3} M) induit des réponses contractiles dépendantes de la concentration (**Figure 45**). La génistéine et la quercétine exercent un effet antagoniste à 10^{-5} M et les courbes concentration-réponses aux contractions CaCl₂-induites sont

significativement ($p < 0,05$) déplacées vers la droite avec diminution de l'effet maximum (**Figure 45A et B**).

Dans la gamme de concentrations de génistéine et de quercétine étudiées, sur les préparations isolées de bronches humaines contractées avec 10^{-3}M de CaCl_2 , la concentration inhibitrice 50 (IC_{50}) a été respectivement de $3\mu\text{M}$ et $4\mu\text{M}$ (**Tableau 8**). Aucune modification sensible sur les contractions CaCl_2 -induites n'a été observée en présence de la daidzeine (10^{-5}M) et de la rutine (10^{-4}M) (**Figure 45 C et D**).

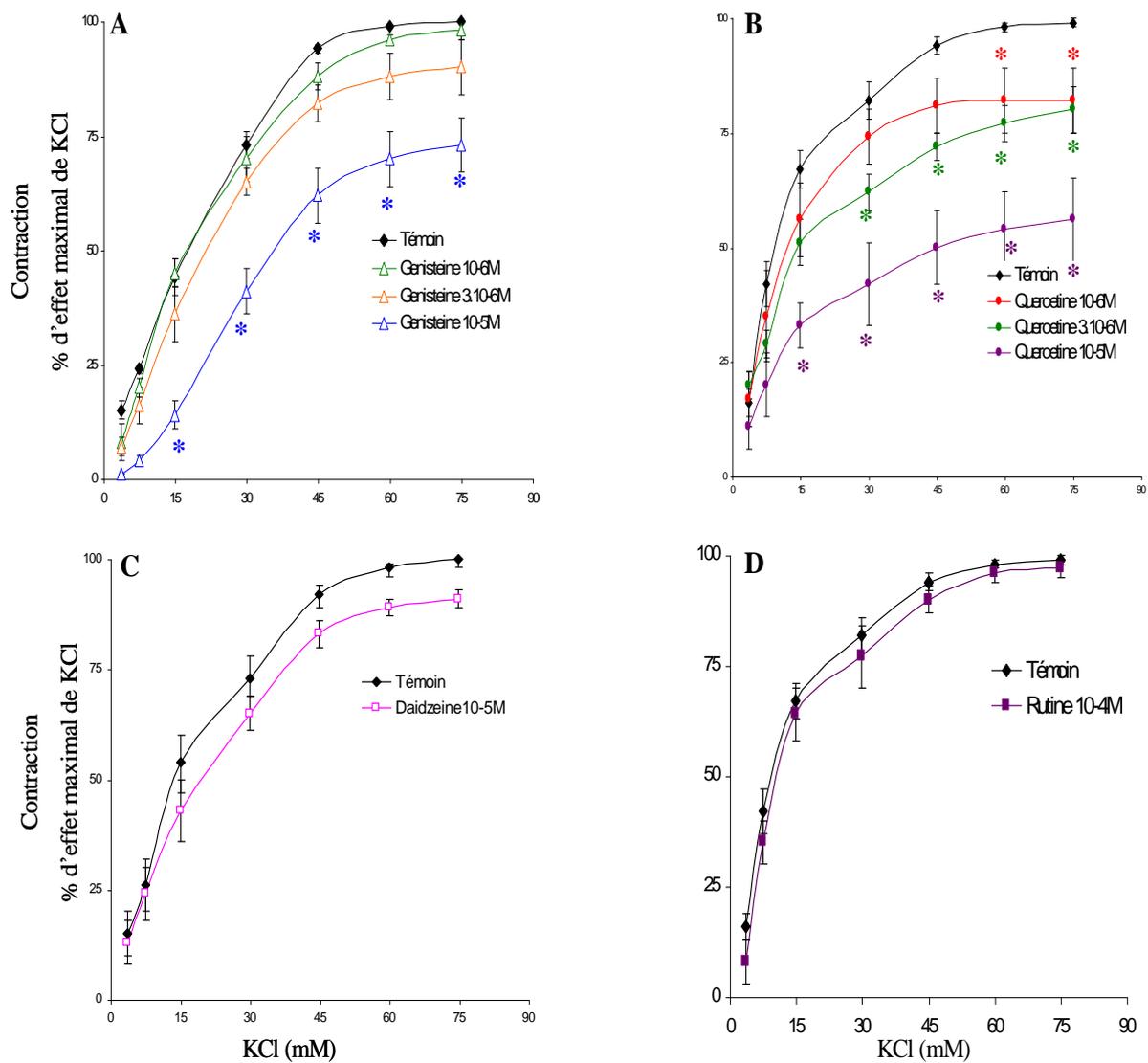


Figure 44 : Effet de la genisteine (A), quercétine (B), daidzéine (C) et rutine (D) sur les anneaux des bronches humaines contractées avec KCl. Les valeurs sont exprimées en pourcentages de contraction par rapport à la contraction obtenue avec KCl (75mM) de la courbe concentration-réponse témoin. Chaque point représente la moyenne \pm s.e.m, n = 6. * La différence statistique significative pour $p < 0,05$ est indiquée par rapport à la courbe concentration-réponse témoin.

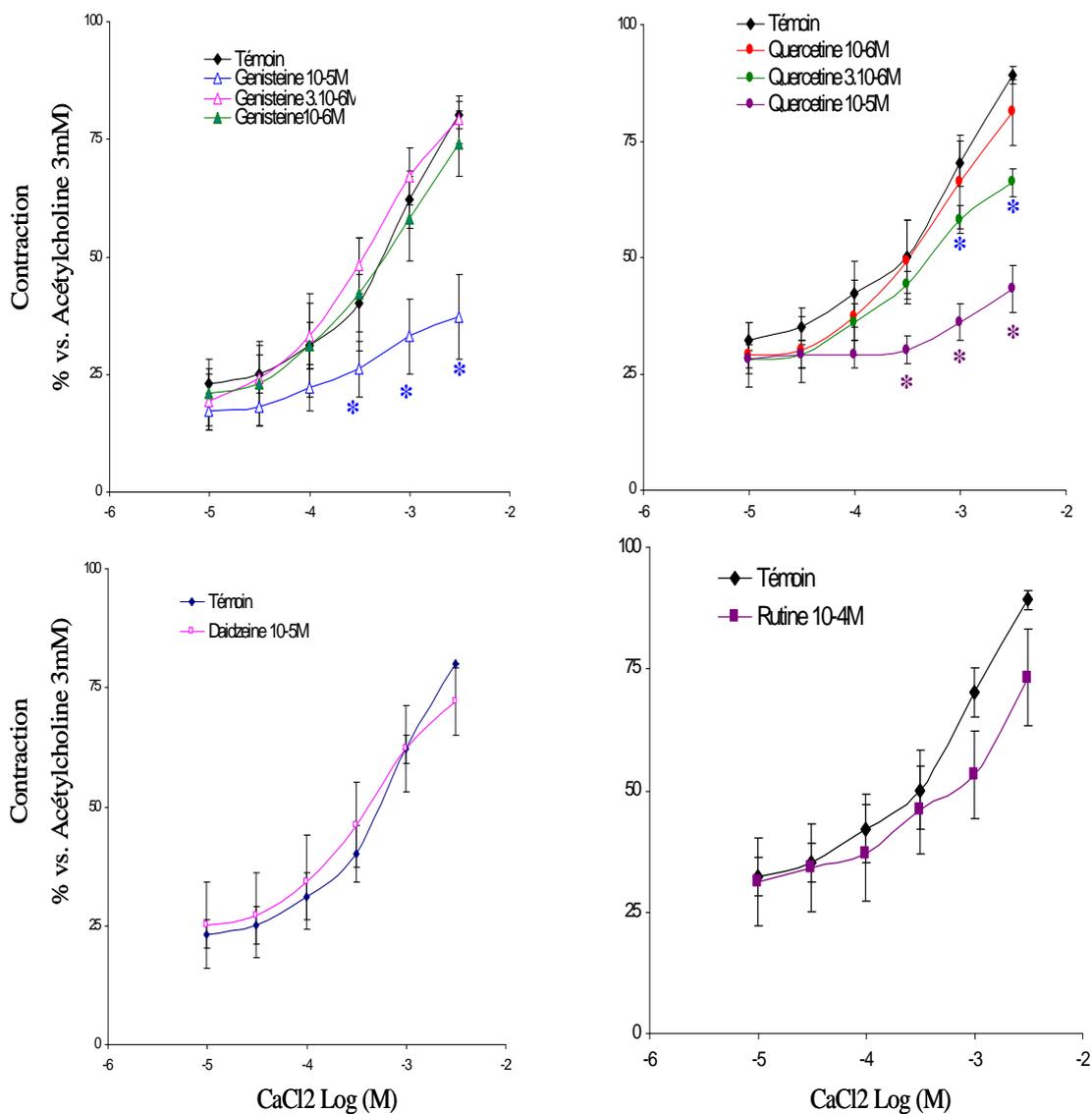


Figure 45 : Effet de la genisteine (A), quercetine (B), daidzeine (C) et rutine (C) sur les anneaux des bronches humaines contractées avec CaCl₂. Les valeurs sont exprimées en pourcentages de contraction par rapport à la contraction obtenue avec l'acétylcholine (10⁻⁶M) de la courbe concentration-réponse de témoin. Chaque point représente la moyenne ± s.e.m ; n = 6. * La différence statistique significative pour p < 0,05 est indiquée par rapport à la courbe concentration-réponse témoin.

Tableau 8 : Les valeurs pIC_{50} de l'effet de la genisteine et de la quercétine sur la réponse contractile induite par le $CaCl_2$ ou le KCl sur les bronches humaines.

Flavonoïdes	Bronche humaine contractée avec					
	KCl ($3 \cdot 10^{-2}M$)			$CaCl_2$ ($10^{-3}M$)		
	n	pIC_{50} ($-\text{Log}IC_{50}$)	IC_{50} (μM)	n	pIC_{50} ($-\text{Log}IC_{50}$)	IC_{50} (μM)
Genisteine	5	$5,3 \pm 4$	5	6	$5,5 \pm 0,5$	3
Quercétine	6	$5,1 \pm 0,4$	7	6	$5,4 \pm 1,8$	4

pIC_{50} , concentration de la genisteine ou de la quercétine qui inhibe la réponse contractile de 50%, est calculé à partir des courbes concentration-réponse par l'analyse de régression linéaire.
n : nombre d'expérience

Discussion

De nos jours, les flavonoïdes, sont largement étudiés pour leurs effets biologiques et activités antioxydantes et anti-inflammatoires (Arts et Hollman, 2005). Dans ce contexte, les flavonoides peuvent avoir une influence significative sur les maladies inflammatoires chroniques telles l'asthme et la BPCO. Des études épidémiologiques ont montré une corrélation négative entre l'incidence de l'asthme et de la BPCO et la consommation des composés polyphénoliques d'origine naturelle (Walda *et al*, 2002 ; Smith *et al*, 2004 ; Santus *et al*, 2005). Les effets bénéfiques puissants des flavonoides ont particulièrement été attribués à la génistéine et à la quercétine. En considérant ces résultats, la recherche des effets pharmacologiques pulmonaires de la génistéine et de la quercétine a été explorée *in vitro* sur des modèles tissulaires humains provenant des bronches (effet bronchorelaxant) et de parenchyme (effet anti-inflammatoire) et celui de la quercétine sur un système acellulaire (piégeage de l'HOCl).

10. ACTIVITE ANTI-OXYDANTE DE LA QUERCETINE SUR L'HOCl

En vertu de son contact direct et continu avec l'environnement (cigarette, polluant, infections, etc.) l'épithélium pulmonaire est parmi les tissus de l'organisme le plus exposé aux agressions oxydatives. De nombreuses études ont pu mettre en évidence les effets délétères associées à l'augmentation du stress oxydatif dans les différents secteurs des poumons (MacNee, 2005 ; Kirkham et Rahman, 2006). Ainsi, chez les fumeurs et les patients BPCO surtout en période d'exacerbation, les macrophages et les neutrophiles circulants libèrent le radical superoxyde ($O_2\cdot^-$) en quantité considérable (Barnes *et al*, 2003). Ce radical est dismuté soit spontanément ou en présence du superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette espèce oxygénée représente le précurseur central dans la production du radical $\cdot OH$ et de l'HOCl. Ce dernier réagit avec l' H_2O_2 et avec les NO_2^- , et même avec l' $ONOO^-$, pour donner des espèces nitrantes (Radi *et al*, 2001). Il réagirait également avec l' $O_2\cdot^-$ pour former le radical $\cdot OH$. Par cette voie réactionnelle, l'HOCl serait responsable de la majorité des lésions oxydatives siégeant au niveau de tractus respiratoire. Ainsi, la recherche de molécules capables d'inhiber sa génération et / ou à effet scavenger directement sur l'HOCl est d'un grand intérêt. La quercétine, un membre de la famille des flavonols, est un puissant antioxydant offrant toute une batterie de fonctions biochimiques particulièrement intéressantes pour notre santé. Les résultats du présent travail ont montré, en utilisant la technique de la chimiluminescence amplifiée par le luminol, que la

quercétine possède une forte capacité de piéger et de manière concentrations-dépendantes l'HOCl : à 5µM, l'activité scavenger atteint son maximum (99%). Afin d'établir la relation entre la structure chimique de la quercétine et sa capacité à piéger l'HOCl, la capacité de piégeage des autres flavonols, myricétine et kaempférol, à été également testée. Les trois flavonols aglycones testés, quercétine, myricétine et kaempférol, partagent la même structure chimique du cycle A et C mais diffèrent au niveau du degré d'hydroxylation du cycle B. En effet, nous avons observés qu'à une faible concentration de 1µM, la capacité de ces flavonols à piéger l'HOCl est différente (**Figure 31**). Le puissant scavenger sur l'HOCl est la quercétine avec un groupement catéchol sur le cycle B (3', 4'-OH), suivie par le kaempférol monohydroxylé (4'-OH) tandis que la myricétine avec un groupement pyrogallol (3',4',5'-OH) était moins active. Les valeurs IC₅₀ sont respectivement de 0,85, 0,9 et 1,1 µM pour la quercétine, kaempférol et myricétine (**Tableau 2**).

Une autre propriété importante du pouvoir antioxydant des flavonoides est la présence du groupement hydroxyle en position C₃ sur le cycle C avec une double liaison adjacente en C₂-C₃. Tous les flavonols testés présentent cette double liaison en position C₂-C₃ sur le cycle C, il parait que cette double liaison ne contribue pas suffisamment à l'amélioration de l'activité scavenger envers l'HOCl. Contrairement, nos résultats ont montré que la substitution du groupement hydroxyle en position C₃ par le résidu *O*-rhamnoglucosyle, potentialise l'activité scavenger du flavonol vis-à-vis de l'HOCl. En effet, la rutine exerce un effet scavenger sur l'HOCl hautement puissant (IC₅₀ = 0,3 µM) que son dérivé aglycone, quercétine. Sous d'autres conditions expérimentales, Zielińska et collaborateurs (2001) ont rapporté que la quercétine 3-*O*-galloylglucoside exprime une activité oxydante prononcée comparable à celle de la quercétine, mesurée sur l' O₂•, H₂O₂ et HOCl engendrés par les neutrophiles activés par le zymosan.

Les résultats observés avec la rutine peuvent s'expliquer par son caractère hydrophile, due au résidu *O*-rhamnoglucosyl en position 3, qui rend la molécule plus active dans le milieu aqueux ou par le rôle possible de ce résidu dans la potentialisation de l'activité scavenger de l'HOCl. En effet, le traitement de la rutine par la naringinase conduit à une légère inhibition de la cinétique de la génération lumineuse durant l'oxydation du luminol par le NaOCl comparée avec la rutine non traitée. La réaction de la quercétine et de la rutine avec l'HOCl est connue de générer des dérivés mono- et dichlorés stables en position C₆ et/ou C₈ sur le cycle A. La réaction de la rutine avec l'HOCl forme plus de dérivés monochlorés que la quercétine. Cette formation accrue des

dérivés chlorés est attribuée à l'aptitude du groupement disaccharide d'améliorer la vitesse de turnover durant la réaction de chloration (Binsack *et al*, 2001). Les résultats obtenus avec la rutine traitée avec la naringinase soutiennent l'idée que la présence du groupement glycosyl peut accentuer l'activité scavenger des flavonols envers l'HOCl (**Figure 32**).

Le piégeage de l'HOCl pourrait en partie minimiser les dégâts oxydatifs menant au développement de plusieurs pathologies notamment l'inflammation pulmonaire. De nombreux travaux ont montré l'impact de l'HOCl sur les défenses anti-oxydantes et anti-protéases (Suter *et al*, 1992 ; Winterbourn et Brennan, 1997). Par ailleurs, chez les fumeurs avec la bronchite chronique, la réduction de la CVF est en corrélation avec la diminution du taux GSH dans les lavages pulmonaires (Repine *et al*, 1997). Chez les cochons d'indes, la stimulation des cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires inactive l' α 1-antitrypsine en présence de la myéloperoxydase (Wallaert *et al*, 1993). En outre, dans les lavages pulmonaires des fumeurs et des patients BPCO, l'activité inhibitrice de l' α 1-antitrypsine est à moitié inactive (Carp *et al*, 1982 ; Maier *et al*, 1992). L'HOCl agit encore au site inflammatoire en activant les précurseurs des enzymes comme la progélatinase et la procollagénase, activation qui conduit à la fragilisation du squelette protéique et à la destruction des tissus connectifs (Weiss *et al*, 1985 ; Peppin et Weiss, 1986, Hawkins et Davies, 1998). L'HOCl active le facteur nucléaire NF- κ B (Schoonbroodt *et al*, 1997 ; Nys *et al*, 2002), augmentant ainsi l'expression de médiateurs de l'inflammation, avec un effet bénéfique ou néfaste selon l'endroit et le moment où se produit la réaction inflammatoire. L'activité du NF- κ B est augmentée dans les cellules épithéliales bronchiques des BPCO et corrélée avec la sévérité de la maladie (Di Stefano *et al*, 2002).

Il était toutefois important de comparer la capacité de piégeage de la quercétine et de son dérivé glycosyl avec celles des substances antioxydantes connues dans la littérature. Dans cette étude, les effet scavenger de N-acétyl-L-Cysteine (NAC), vitamine C et taurine étaient testés en parallèle. Dans le tractus respiratoire, le GSH, la vitamine C et la mucine constituent une des principales défenses antioxydantes à la fois intra- et extra-cellulaire (MacNee *et al*, 1991, Cross *et al*, 1994)). De nombreuses études épidémiologiques ont montré une corrélation inverse entre le risque d'obstruction des débits aériens et la consommation de la vitamine C (Gilliland *et al*, 2003 ; Santos *et al*, 2004 ; Rubin *et al*, 2004). La taurine, présente en quantité importante dans les neutrophiles, agit physiologiquement pour capter probablement l'HOCl (Learn *et al*, 1990).

La prise du NAC est associée avec l'amélioration de l'état clinique des patients

BPCO (Gerrits *et al*, 2003). Les résultats présentés dans cette étude ont montré que le NAC est capable de piéger l'HOCl. Des observations similaires ont été obtenues par Gressier et collaborateurs (1994). Les valeurs d'IC₅₀ obtenues avec la vitamine C, le NAC, et la taurine sont en accord avec celles rapportées par Arnhold et collaborateurs (1993). En comparant ces différentes structures, nous pouvons conclure que la quercétine et la rutine sont plus efficaces sur le piégeage de l'HOCl.

11. ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DE LA GENISTEINE ET DE LA QUERCETINE

La bronchoconstriction /l'obstruction des voies respiratoires ainsi que l'hyperréactivité bronchique sont présumées être une conséquence directe du processus inflammatoire. Sur le modèle de culture tissulaire à court terme de fragments de parenchyme pulmonaire humains cultivés en présence de LPS de l'*E. coli*, nous avons montré que la génistéine et la quercétine ont la capacité de réduire et de manière concentration-dépendante la production des médiateurs, TNF- α , IL-8 et MIP-1 β . De nombreux travaux ont cependant souligné le caractère pro-inflammatoire de la fumée de cigarette dont il est lié en partie à la présence de LPS (Tracey *et al*, 1994, Hasday, 1999 Yang *et al*, 2006). La sécrétion des médiateurs TNF- α , IL-8 et MIP-1 β , par le parenchyme pulmonaire humain cultivé, était significativement plus marquée en présence de LPS qu'à l'état basal (**Figure 33**). La réponse inflammatoire aigüe du parenchyme pulmonaire en réponse au LPS est proche de celle observée pendant les périodes d'exacerbations de la BPCO (Risse, 2006). La puissance anti-inflammatoire de la quercétine est relativement réduite après 24 heures d'incubation (**Figures 35B, 36B, et 37B**). Ce résultat peut s'expliquer par la métabolisation rapide de la quercétine intracellulaire en ses métabolites biologiquement inactives en fonction du temps (Wätjen *et al*, 2004). Nos résultats confirment les observations des autres auteurs montrant que la quercétine et la génistéine sont efficaces en bloquant la production de TNF- α , IL-8, IL-6 induite en présence du LPS (Xagorari *et al*, 2001 ; Liu *et al*, 2005 ; Rao *et al*, 2005). La différence de puissance observée, peut refléter la possibilité de différence au niveau du modèle d'étude. A présent les données disponibles sur l'action anti-inflammatoire de flavonoïdes, sont obtenues sur des modèles de cellules en culture. A notre connaissance, notre étude est la première à avoir exploré l'activité anti-inflammatoire de la génistéine et de la quercétine sur un modèle tissulaire. De nombreux travaux ont cependant souligné que la libération des médiateurs inflammatoire est plus importante dans des co-cultures cellulaires que dans des

monocultures (Standiford *et al*, 1990; Lee et al, 2004; Ishii *et al*, 2005). Les inhibiteurs de TNF- α et des chimiokines plus particulièrement l'IL-8, sous forme d'anticorps monoclonaux ou d'antagonistes de leurs récepteurs, ont déjà fait preuve comme des outils thérapeutiques bénéfiques dans certaines situations inflammatoires (Traves et al, 2002 ; Reimold, 2002 ; Barnes, 2003; Mahler *et al*, 2004). Le TNF- α , l'IL-8 et le MIP-1 β , puissants chimioattractants des monocytes et des neutrophiles, sont impliqués dans la pathogénèse de la BPCO (Barnes, 2004) et seront dans ce cas des cibles thérapeutiques adéquates dans le traitement de la BPCO. Les flavonoïdes, comme la génistéine et la quercétine sont largement indiqués dans plusieurs situations inflammatoires. Cependant, peu d'informations sont actuellement disponibles concernant l'impact direct des flavonoïdes sur les manifestations inflammatoires de la BPCO (Culpitt *et al*, 2003 ; Kumar *et al*, 2003).

Aucune inhibition sensible n'est observée en présence de la rutine sur la production des médiateurs TNF- α , IL-8 et MIP-1 β , par le parenchyme pulmonaire humain cultivé pendant 4 et 24 heures en présence du LPS. Ce résultat peut s'interpréter, par l'incapacité des flavonoïdes glycosylés à traverser la membrane plasmique en raison de leur caractère hydrophile ou volumineux du au résidu glycosyl (Fusi *et al*, 2003). En effet, l'efficacité de resveratrol et de quercétine est significativement réduite par la substitution des groupements OH par un résidu glycosyl (Matsuda *et al*, 2000 ; Wätjen *et al*, 2004 ; Hämäläinen *et al*, 2007).

Le mécanisme responsable de l'effet inhibiteur de la génistéine et de la quercétine sur la transduction du signal LPS n'a pas été caractérisé dans cette étude, mais il paraît que ces flavonoïdes agissent sur plusieurs cibles moléculaires. La signalisation intracellulaire initiée par le LPS implique la voie de tyrosines kinases (Han *et al*, 1993 ; Stefanova *et al*, 1993). Ces événements sont prévenus après un prétraitement par la génistéine et la quercétine, connues comme des inhibiteurs de tyrosine kinases (Kang et al, 2001 ; Casagrande et al, 2001). Il est devenu de plus en plus évident que le LPS induit l'activation du facteur de transcription nucléaire NF- κ B associée avec la neutrophilie pulmonaire, perméabilité épithéliale et avec la peroxydation des lipides (Blackwell et al, 1996, Liu et al, 1999). L'effet inhibiteur de la quercétine et d'autres flavonoïdes a été déjà rapporté sur les tyrosines kinases solubles et liées à la membrane (Graziani *et al*, 1983 ; Cunningham *et al*, 1992 ; Huang *et al*, 1999). En effet, de nombreux rapports ont rapporté que dans les macrophages RAW 264.7, la quercétine et la génistéine inhibent l'activation du facteur

NF- κ B ainsi que la phosphorylation de la protéine inhibitrice I κ B (Kang *et al*, 2001 ; Nair *et al*, 2006).

L'effet moins apparent de la daidzeine, un isoflavone inactif sur tyrosine kinase, sur la production de TNF- α , l'IL-8 et MIP-1 β (**Figures 35, 36**), par le parenchyme humain cultivé, soutient l'hypothèse que l'action anti-inflammatoire de la génisteine pourrait être en partie gouvernée *via* la voie de tyrosine kinase. De plus, les flavonoïdes ont la capacité d'inhiber les sérine/ thréonine kinases, telles que la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) et la PKC (Gamet-Payrastre *et al*, 1999). Le lien entre la PI3-K et le facteur NF- κ B est médié par l'activation de sérine/ thréonine kinase Akt (Ozes *et al*, 1999 ; Xagorari *et al*, 2001). Nanua et collaborateurs (2006) ont montré que le prétraitement des cellules épithéliales bronchiques humaines-16HBE14o avec de la quercétine bloque l'expression d'IL-8 et MCP-1 en réduisant la voie de signalisation médiée par la PI3-kinase/ l'Akt/ NF- κ B.

Par ailleurs, il semble que l'effet inhibiteur des flavonoides sur la production des médiateurs proinflammatoires pourrait résulter de leurs propriétés antioxydantes. Les EOA augmentent l'expression des gènes des médiateurs inflammatoires *via* l'activation des facteurs de transcription redox-sensibles tels que le NF- κ B et l'AP-1 (Activator Protein-1) (Rahman et MacNee, 1998 ; Anto *et al*, 2002 ; Barnes *et al*, 2005). L'effet inhibiteur de la quercétine et de la génistéine sur l'activation du facteur NF- κ B est associé avec l'augmentation du taux de GSH, et des enzymes glutathion- cystéine synthétase, SOD et la catalase (Martinez-Flórrrez *et al*, 2005 ; Choi *et al*, 2003).

Il paraît maintenant évident que les enzymes histone deacétylase (HDAC) jouent un rôle primordial dans l'inhibition de l'expression des médiateurs proinflammatoires en réponse aux corticostéroïdes (Sambucetti *et al*, 1999; Ito *et al*, 2000). Toute altération ou modification de l'enzyme HDCA par un stress oxydatif/ fumée de cigarette peut rendre les corticostéroïdes inefficaces, comme observé chez les patients BPCO (Rahman et MacNee, 1998 ; Rahman, 2005). Récemment ils ont observé que les flavonoides comme la curcumine inhibe l'inflammation et restaure l'efficacité des corticostéroïdes en réponse au stress oxydatif, *via* la sur-régulation/restauration de l'activité HDCA-2 dans les cellules U937 et Monomac6 (Kirkham et Rahman, 2006). Il a été également suggéré que les actions anti-inflammatoires des flavonoides peuvent s'étendre en inhibant l'activité de l'enzyme histone acétyltransférase (HAT) et préviennent ainsi l'acétylation de la chromatine médiée par le facteur NF- κ B (Kang *et al*, 2005). Toutefois, le pouvoir antioxydant de la quercétine

peut lui attribuer la capacité d'améliorer l'efficacité anti-inflammatoire des corticostéroïdes chez les patients BPCO.

12. ACTIVITE RELAXANTE DE LA GENISTEINE ET DE LA QUERCETINE SUR LA BRONCHE HUMAINE

Dans la BPCO, la constriction muscarinique des voies aériennes résulte de l'augmentation de l'activité parasympathique. La perte du contrôle parasympathique du muscle lisse bronchique et les modifications structurales qui résultent de l'inflammation pourraient contribuer au développement et à la persistance de l'hyperréactivité bronchique. L'hyperréactivité bronchique au méthacholine ou à l'histamine a été déjà rapportée chez les patients BPCO (Willemse *et al*, 2004). De nombreux travaux ont suggéré que la voie des tyrosine kinases peut avoir un rôle important dans la régulation de la transduction du signal associé aux récepteurs responsables de la contraction du muscle lisse (Hollenberg, 1994 ; Srivastava et St Louis, 1997). Dans les préparations du muscle lisse viscérale et vasculaire, les inhibiteurs de la tyrosine kinase inhibent la contraction induite par carbachole, prostaglandine F_{2α}, norepinephrine, phényléphrine, angiotensine II et UK14304, un agoniste α₂-adrenocepteur (Yang *et al*, 1993 ; Steusloff *et al*, 1995 ; Savineau *et al*, 1996; Jin *et al*, 1996, Watts *et al*, 1996). Bien que l'effet des inhibiteurs de la tyrosine kinase a été étudié sur diverses préparations de muscle lisse, peu de travaux ont étudié leurs effets sur les préparations du muscle lisse de voies aériennes (Iwagoe *et al*, 1996, Chopra *et al*, 1997, Wong *et al*, 1997). En se basant sur ces observations, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la génistéine et la quercétine et nous avons montré qu'à faibles concentrations ces molécules ont la capacité d'induire une relaxation sur les bronches humaines précontractées avec l'acétylcholine et l'histamine. Les résultats obtenus sont comparables avec les données sur l'effet relaxant de 3-O- methylquercétine (Ko *et al*, 2002) et de la génistéine (Lin *et al*, 2007) étudié sur la trachée des cochons d'inde. Toutefois, plusieurs études ont montré l'effet vasorelaxant de la quercétine sur les anneaux d'aorte de rat (Duarte *et al*, 1993 ; Fusi *et al*, 2003) et de la génistéine sur les anneaux d'aorte de rat et les petits artères humains (Mishra *et al*, 2000, Cruz *et al*, 2006). Dans nos expériences, la génistéine et la quercétine relaxent de manière concentration-dépendante et avec un même degré les contractions induites avec les deux agonistes contractiles l'histamine et l'acétylcholine. Cette dernière observation est en accord avec les résultats rapportés récemment que la génistéine et la quercétine abolies d'une manière similaire la relaxation de trachée de cochon d'inde précontractée par l'histamine,

carbachole et KCl (Ko *et al*, 2003, Lin *et al*, 2007). Ce constat nous permet de présumer que la même voie de signalisation est affectée par ces deux flavonoïdes en réponse à l'acétylcholine et l'histamine.

La genisteine est un inhibiteur spécifique de la tyrosine kinase uniquement à des concentrations > 10 μ M (Akiyama *et al*, 1987). A des concentrations élevées, la génistéine exerce un effet relaxant potentiel. On peut alors suggérer qu'à une concentration élevée, la génistéine induit la relaxation au moins en partie par l'inhibition de l'activité de la tyrosine kinase mais à faible concentration, la génistéine affecterait la relaxation des voies aériennes par d'autres mécanismes. Plusieurs approches sont utilisées par cette étude afin de mettre au point le mécanisme sous-jacent l'effet relaxant de la génistéine sur les voies aériennes. Une des approches la plus employée par la majorité des travaux implique l'utilisation de la daidzeine, un analogue structurale de la génistéine inactive sur les tyrosine kinases. Notre étude *in vitro* a montré que la daidzeine exerce un effet relaxant moins efficace sur les bronches humaines que la génistéine. Ceci peut être liée à une certaine similitude entre ces deux isoflavones d'agir sur d'autres molécules de signalisation, telles que les isoformes de la PDE, avec différents degrés d'inhibition (Ko *et al*, 2004). Il est concevable aussi que la faible puissance de la daidzeine puisse s'expliquer au moins en partie par sa faible solubilité, ce qui réduit la quantité effective de ce composé dans la solution.

Par ailleurs, nous avons évalué l'effet relaxant de la génistéine et de la quercétine en association avec les β 2-adrénergiques à courte durée d'action, isoprénaline et à longue durée d'action, le formotérol, puisque ces molécules sont largement utilisées pour contrôler le tonus musculaire lisse bronchique. Nos résultats confirment que les réponses relaxantes en présence des β 2-mimétiques sont moins importantes sur les précontractions par l'acétylcholine qu'à l'histamine. Ce constat est interprété que les agonistes muscariniques exercent un antagonisme fonctionnel sur les β 2-adrénergiques en diminuant l'AMPC dont le mécanisme est encore mal élucidé (Sarria *et al*, 2002). Nous avons montré que la génistéine potentialise significativement l'effet bronchorelaxant du formotérol et d'isoprénaline. Le même effet de la génistéine est obtenu sur la trachée de cochon d'inde mise en présence de forskoline, un activateur direct de l'adénylate cyclase (Lin *et al*, 2007). L'effet relaxant de la génistéine *via* l'inhibition de l'AMPC-PDE a été montré sur les anneaux aortiques de rat (Sataka *et al*, 2000) et sur la trachée de cochon d'inde (Lin *et al*, 2007). De plus, l'AMPC-PDE type IV a été directement inhibée en présence de la

génistéine avec une $IC_{50} = 9,5 \mu M$ (Ko *et al*, 2004). Ces résultats suggèrent que l'effet potentiel de la génistéine, sur l'accumulation de l'AMPc induite par les $\beta 2$ -mimétiques, est probablement médié par l'AMPc-PDE.

D'autres part, l'activité relaxante du SNP, un nitrovasodilatateur provoque une relaxation sur les voies aériennes *via* un mécanisme médié par la GMPc, est rehaussée en présence de la génistéine ($10^{-5} M$ et $3.10^{-5}M$). Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Lin et collaborateurs (2007). Cet effet potentiel de la génistéine sur l'activité relaxante du SNP ne pourrait être du à son effet inhibiteur sur l'activité de la PDEV, puisque la génistéine est moins efficace sur l'inhibition de la PDEV avec IC_{50} de $73,9\mu M$ (Ko *et al*, 2004). Cependant la génistéine est plus puissante en inhibant la PDEIII et IV avec IC_{50} de $12.9 \mu M$ et $9.5\mu M$, respectivement (Ko *et al*, 2004). Ainsi, nos données suggèrent que la potentialisation de l'activité relaxante du SNP en présence de la génistéine peut s'expliquer par un mécanisme empêchant l'hydrolyse de l'AMPc. A concentration élevée, le SNP augmente le taux de l'AMPc dans la trachée de chien (Torphy *et al*, 1985). Maurice et Haslam (1990) ont rapporté que l'accumulation de l'AMPc isoprénaline-induite est accentuée en présence du SNP *via* un mécanisme à présent méconnu. En effet, la daidzeine a échoué d'exercer un effet potentiel sur les réponses relaxantes à l'isoprénaline et au SNP. Ceci peut être attribué à la faible concentration de la daidzeine utilisée dans cette étude. De plus et comme précédemment signalé, la faible solubilité de la daidzeine réduit probablement son efficacité aux concentrations choisies dans cette étude.

L'effet relaxant exercé par la quercétine est presque de même ordre d'efficacité et de puissance que la génistéine. Cependant, la rutine exerce un effet moins apparent sur les précontractions histamine et acétylcholine induites sur les bronches humaines. L'influence négative de la glycosylation des flavonoïdes a été aussi rapportée sur la production de monoxyde d'azote par les macrophages (Kim *et al*, 1999), sur l'effet relaxant de la trachée de cobaye (Ko *et al*, 2003) et sur les contractions KCl-induites et l'activation des canaux calcique de type L des anneaux d'aorte (Fusi *et al*, 2002).

Tout comme la génistéine, les réponses relaxantes à l'isoprénaline, au formotérol et au SNP sont significativement amplifiées en présence de la quercétine (**Figures 41B, 42B et 43B**). Dans l'aorte de rat, la quercétine, à des concentrations élevées $10^{-5}M$ et $5.10^{-5}M$, augmente le taux de l'AMPc (Duarte *et al*, 1993). En effet le 3-O- methylquercétine, un métabolite de la quercétine, potentialise l'effet relaxant de la forskoline et du SNP sur la

trachée de cochon d'inde et inhibe significativement les activités de l'AMPC- et GMPc-PDE (Ko *et al*, 2001). L'inhibition de l'AMPC-PDE a été déjà impliquée dans l'effet relaxant de la quercétine sur le muscle lisse vasculaire et intestinal (Beretz *et al*, 1980, Nikaido *et al*, 1982). Cela semble évident du fait que les valeurs EC_{50} de l'effet relaxant de la quercétine sur les préparations bronchiques humaines précontractées à l'histamine et l'acétylcholine (Tableau 4) correspondes aux IC_{50} de l'effet inhibiteur direct de la quercétine sur l'AMPC-PDE de type III et IV de $5,6.10^{-6}$ M et $9,9.10^{-6}$ M, respectivement (Ko *et al*, 2004). Nos résultats révèlent que l'effet relaxant de la génistéine et de la quercétine peut être médié par l'inhibition de l'AMPC- et GMPc-PDE en augmentant le taux de l'AMPC. Cette dernière active ultérieurement la protéine kinase AMPC-dépendante et inhibe la kinase de la chaîne légère de la myosine par phosphorylation en atténuant dans ce cas la contraction (Westfall, 1998). Le mécanisme par lequel la relaxation est produite par la voie AMPC n'est pas encore clair, mais elle peut résulter de la diminution intracellulaire en Ca^{2+} . Cette diminution peut être due à la réduction de l'afflux de Ca^{2+} en améliorant son accumulation dans le réticulum sarcoplasmique, ou son extrusion à travers la membrane plasmique (Westfall, 1998).

Dans cette étude la génistéine et la quercétine (10^{-6} to 10^{-5} M) exercent un effet inhibiteur potentiel et de manière concentration-dépendante sur les contractions KCl- et Ca^{2+} - induites sur les bronches humaines. La contraction KCl-induite est le résultat de l'augmentation de l'afflux de Ca^{2+} *via* les canaux de Ca^{2+} de type L (VOC, voltage-operated channels) et elle est spécifiquement inhibée par les antagonistes de Ca^{2+} (Ahmed et Abraham, 1985). Donc, l'inhibition des contractions induites par le KCl et Ca^{2+} en présence de la génistéine et la quercétine peut être interprété comme conséquence du blocage des canaux VOC comme suggéré par d'autres études (Duarte *et al*, 1993b ; Figtree *et al*, 2000 ; Ko *et al*, 2001 ; Belevych *et al*, 2002). Dans notre étude, les valeurs EC_{50} de la quercétine et de la génistéine contre les précontractions à l'histamine et l'acétylcholine ne sont pas significativement différente l'une de l'autre. Ce résultat soutient en plus l'hypothèse que la quercétine et la génistéine ont la capacité d'inhiber l'entrée du calcium extracellulaire. L'augmentation dans la $[Ca^{2+}]_i$ et l'activation ultérieure de la calmoduline Ca^{2+} -dépendante est le déterminant principal de la contraction de muscle lisse vasculaire (Somlyo et Somlyo ,2000). Cependant, plusieurs études ont montré que les agonistes contractiles peuvent aussi moduler la force contractile en augmentant la sensibilité des myofilaments vis-à-vis du Ca^{2+} ou *via* la voie indépendante du Ca^{2+} (Somlyo et

Somlyo ,2000). L'implication des protéines kinases telles que la protéine kinase C et ou Rho kinase ont été déjà rapportées dans la cascade de signalisation Ca^{2+} - sensible (Martinez *et al*, 2000 ; Somlyo et Somlyo, 2000). Une étude sur les artères a montré que l'effet vasodilatateur potentiel de la quercétine est indépendant de la modification de la $[Ca^{2+}]_i$ suggérant une interaction directe avec les protéines contractiles telles que la chaîne légère de la myosine kinase et la PKC (Middleton *et al*, 2000, Pérez-Vizcaíno *et al*, 2002). A partir de ces observations, l'effet bronchorelaxant de la quercétine peut résulter de l'inhibition des mécanismes sensibles au Ca^{2+} y compris l'effet antagoniste sur les canaux VOC aussi bien l'inhibition des protéines kinases telle que la chaîne légère de myosine et la PKC. Bien que ces dernières cibles ne soient pas étudiées dans ce présent travail, néanmoins l'inefficacité de la rutine sur les contractions KCl- et Ca^{2+} - induites soutient cette hypothèse.

La daidzeine est dépourvue d'effet inhibiteur sur les contractions KCl-induites soutenant l'hypothèse que la génistéine bloque l'entrée du calcium *via* les canaux Ca^{2+} de type L en inhibant l'activité de la tyrosine kinase. Nos résultats sont compatibles avec les précédents rapports sur les inhibiteurs de la tyrosine kinase, ST638 et tyrphostin A47, sur les bronchioles de rat (Chopra *et al*, 1997). L'influence de la génistéine et des autres inhibiteurs de la tyrosine kinase sur les contractions KCl-induites a également été examinée sur le muscle lisse vasculaire et elles ont montré des effets inhibiteurs potentiels (Toma *et al*, 1995, Filipeanu *et al*, 1995). Sur les cellules musculaires lisses respiratoires de rat en culture, l'inhibition de la réponse contractile Ca^{2+} -induite en présence de la génistéine fait attribuer aux tyrosine kinases le rôle dans la modulation de l'activité de la PLC donc de la libération du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (Tolloczko *et al*, 2000). En revanche, d'autres travaux ont montré que l'inhibition des canaux Ca^{2+} type L des myocytes intacts par la génistéine est due à un blocage direct indépendant de la tyrosine kinase (Belevych *et al*, 2002). Un tel effet n'est pas restreint aux canaux Ca^{2+} type L (Huang et Dillon, 2000; Zhang et Wang, 2000). Dans les artères mésentériques (Toma *et al*, 1995), la génistéine réduit les contractions KCl-induites sans aucun effet apparent sur la concentration de calcium libre dans le cytoplasme, tandis qu'elle réduit à la fois les contractions norepinephrine-induites et l'élévation du calcium cytoplasmique. Ce dernier résultat suggère que la génistéine peut perturber la sensibilité de l'appareil contractile au calcium comme suggéré dans l'étude de Steusloff *et al* (1995). La génistéine a été aussi rapporté d'inhiber la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (Jin *et al*, 1996) au

moins en partie par l'inhibition directe de la calmoduline dépendante de la chaîne légère de la myosine kinase (Wang *et al*, 1997). Ces résultats suggèrent que la génistéine peut inhiber les mécanismes du maniement calcique ; l'entrée du Ca^{2+} et la modulation de la sensibilité au Ca^{2+} , aussi bien elle peut inhiber l'appareil contractile au niveau de la chaîne légère de myosine. Ces derniers effets ne sont pas tous médiés par l'inhibition de la tyrosine kinase.

13. CONSIDERATIONS CLINIQUES DE LA QUERCÉTINE ET DE LA GENISTEINE

Comme toute substance thérapeutique, la bioactivité de la quercétine et de la génistéine dépend de leur biodisponibilité qui varie largement en fonction des sources dont elle est extraite ou, plus précisément, selon les caractéristiques de la chaîne sucrée de sa molécule. Dans les matrices végétales, les flavonols et les isoflavones se trouvent généralement sous formes des glucosides suggérés biologiquement inactifs (Manach *et al*, 2004). Ils acquièrent leur bioactivité à la suite d'une transformation métabolique par la flore bactérienne intestinale (Brown 1988, Day *et al* 1998). C'est sous leurs formes aglycones, à caractère peu hydrophile, qu'elles traversent facilement les membranes cellulaires, et assurent alors une meilleure biodisponibilité (Brown 1988, Day *et al*, 1998).

Les concentrations en quercétine rapportées efficaces par notre étude, sont supérieures aux concentrations physiologiques observées chez l'homme. Chez les individus consommant entre 80-100 mg de quercétine, administré sous forme d'oignons, de pommes, ou de repas riche en légumes, le pic de la concentration plasmatique en quercétine atteint 0,3–0,75 $\mu\text{mol/L}$ (Manach *et al*, 1998; Graefe *et al*, 2001) . Ingérer sous forme de thé ou de cacao, la concentration plasmatique en quercétine se situe entre 0,1-0,7 $\mu\text{mol/L}$ et 0,25- 0,7 $\mu\text{mol/L}$, respectivement (Lee *et al*, 1995 ; Rein *et al*, 2000). Bien que la gamme de concentration testée par notre étude soit loin des concentrations physiologiques rapportées dans le plasma humain, mais elle peut atteindre le pic plasmatique avec des suppléments nutritionnels en quercétine. La concentration plasmatique atteint 1,5 $\mu\text{mol/L}$, après l'administration de la quercétine en forme de capsule de 250 mg / jour (Conquer *et al*, 1998). Ingérer sous forme d'oignons, les concentrations plasmatique en quercétine sont proportionnelles aux doses administrées : 0,05 $\mu\text{mol/L}$ après 15 mg (de Vries *et al*, 2001), 0,63 $\mu\text{mol} / \text{L}$ après 68-94 mg (Moon *et al*, 2000) et 7,65 $\mu\text{mol} / \text{L}$ après 100 mg (Graefe *et al*, 2001). Les données pharmacocinétiques sur la quercétine chez l'homme ont suggéré qu'un supplément nutritionnel de 1-2 g en quercétine peut fournir des concentrations plasmatiques entre 10 et 50 $\mu\text{mol/L}$ (Wätjen *et al*, 2005).

Du même, les concentrations en génistéine rapportées bioactives par ce présent travail sont également loin des concentrations classiques trouvées dans le plasma humain. Dans l'alimentation traditionnelle asiatique dont les apports moyenne en isoflavones aglycones allant 9-45 mg / jour, la concentration plasmatique en génistéine atteint environ 0,5 μM (Yamamoto *et al*, 2001 ; Morton *et al*, 2002), alors que dans les pays occidentaux, la consommation moyenne n'atteint pas 1 mg / jour (Bennetau-Teresa, 2001). Cependant, l'incorporation des aliments à base de soja dans le régime alimentaire peut produire des niveaux plasmatiques proches ou excèdes les concentrations biologiquement efficaces *in vitro*. Des concentrations plasmatiques en génistéine de 1,4-4 $\mu\text{mol} / \text{L}$ sont atteintes entre 6 et 8 heures chez divers groupes de population dont leurs apports alimentaires sont riches en isoflavones (King and Bursill, 1998). Toutefois, la concentrations en génistéine plus de 4,6 μM a été rapportée dans le plasma des individus consommant trois repas riches en dérivés de soja par jour et chez des femmes ménopausées recevant un traitement à base d'isoflavone sous forme de capsule d'extrait de soja de 50mg/jour (Xu *et al*, 1995, Bhatena et Velasquez, 2002). Les concentrations plasmatiques en isoflavone peuvent atteindre jusqu' à 7 $\mu\text{mol} / \text{L}$, chez les individus consommant l'extrait de la farine de soja (Kim et Bursill, 1998). De plus, chez les patients, souffrant du cancer de la prostate, alimentés par des doses élevées de NovaSoy (300-600 mg), les concentrations circulantes en génistéine atteignent plus de 27 $\mu\text{mol} / \text{L}$ (Miltyk *et al*, 2003). En comparaison, 5mg de génistéine / jour chez les souris résultent en des niveaux plasmatiques de 30 $\mu\text{mol} / \text{L}$, dose nécessaire pour réduire la croissance des tumeurs (Hillman *et al*, 2004).

Notons également que l'activité métabolique de l'organisme peut conférer à la substance absorbée une activité qui ne sera pas révélée par les tests utilisés *in vitro*. En outre, il existe une certaine spécificité tissulaire qui ne peut pas être reproduite par les modèles *in vitro* (Bennetau-Pelissero *et al*, 2004). Ainsi, une étude faite chez les femmes indiennes végétariennes a indiqué que la concentration plasmatique de génistéine atteint environ 315 pg/L après consommation d'une seule dose contenant 64,12 mg d'isoflavone et que cette dose est suffisante pour exercer des effets endocriniens bénéfiques chez ces femmes (Joshi et Parikh, 2007). Une faible mortalité du cancer de prostate est observée chez la population japonaise dont le niveau plasmatique en génistéine atteint 276 nmol/L (Adlecreutz *et al*, 1993). De plus les données issues des épreuves cliniques effectuées chez les asthmatiques ont montré une corrélation positive entre le VEM1 et la consommation

augmentée en génisteine. Ainsi, chez les consommateurs de la génisteine moins de 252  g/jour, le VEM1 est de 82,1 % en comparaison avec 76,2% chez les non consommateurs (Smith *et al*, 2004).

Par ailleurs, la vitesse d'élimination de la quercétine et de la génisteine est relativement faible (Watanabe *et al*, 1998). Les concentrations plasmatiques en quercétine peuvent rester significatives et mesurables dans les 10 et 30 heures après la prise (Hollman *et al*, 1995 ; Graefe *et al*, 2001), alors que la biodisponibilité sanguine d'isoflavones est maintenue constante pour des longues périodes allant jusqu'à deux à quatre semaines qui suivent la prise (Izumi *et al*, 2000). Ainsi, la consommation quotidienne des aliments riches en quercétine ou en génisteine peut entraîner leur accumulation à des niveaux plasmatiques proches ou équivalents aux concentrations trouvées actives par la présente étude.

Conclusion

Comme l'inflammation est une caractéristique de la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), la recherche des substances douées d'activité anti-inflammatoire peut avoir un impact positif sur le ralentissement de processus de progression de la maladie. Plusieurs programmes de recherche menés ces dernières années attestent les actions bénéfiques des flavonoïdes sur les affections inflammatoires. Cependant, les effets biologiques des flavonoïdes sont pour l'essentiel inexplorés dans le cadre des maladies respiratoires, particulièrement la BPCO. Notre étude a permis de mettre de nouveaux résultats suscitant un grand intérêt sur les bienfaits de la génistéine et de la quercétine qui pourraient être mises à profit des BPCO sur plusieurs fronts. En effet, on a démontré *in vitro*, que la quercétine est un puissant antioxydant ayant la capacité de piéger l'acide hypochloreux (HOCl). L'efficacité scavenger de la quercétine sur l'HOCl pourrait contribué au moins en partie à renforcer les défenses antioxydants naturelles et améliorer le profil thérapeutique des corticostéroïdes, inefficace chez les BPCO, en protégeant l'enzyme histone deacétylase (HDCA) des agressions oxydatives.

Par ailleurs, nos résultats ont confirmé que la quercétine et la génistéine ont la capacité de moduler la réponse inflammatoire de façon importante. Sur le modèle de parenchyme pulmonaire humain, la génistéine et la quercétine ont fait preuve d'inhiber la sécrétion de certains médiateurs proinflammatoires, particulièrement le TNF- α considérée comme une marque de la réponse inflammatoire. Cependant, le mécanisme d'action par lequel ces deux molécules exercent leurs effets anti-inflammatoires sur ce modèle pulmonaire reste encore à explorer. En effet, pour mieux confirmer la puissance et la sélectivité de l'action de la génistéine et de la quercétine sur la réponse inflammatoire, il faudrait, en particulier, explorer le rôle de NF- κ B, des PKC, des PI Kinases et des protéines tyrosines kinases.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont également apporté des informations nouvelles sur l'effet bronchodilatateur de la génistéine et de la quercétine. Ces deux flavonoïdes ont la potentialité d'induire une relaxation sur les bronches humaines precontractées soit à l'histamine ou à l'acétylcholine. L'ensemble des résultats obtenus, à présent dans la littérature, sur l'effet relaxant des flavonoïdes a permis d'identifier plusieurs mécanismes d'action. Cependant, plusieurs restent encore à identifier. Dans ce travail, il est postulé qu'un des mécanismes d'action bronchorelaxante de la génistéine et

de la quercétine pourrait être via l'inhibition de la voie AMPc-Phosphodiesterase et/ou blocage des canaux calciques VOC.

Les effets bénéfiques des flavonoïdes dans l'organisme humain sont conditionnés par leur biodisponibilité. Jus qu'à présent des inconnues persistent dans la biodisponibilité des flavonoïdes notamment sur la capacité de la flore colique à modifier leur métabolisme, et leur influence possible dans les différences observées concernant les taux circulants et tissulaires entre le rat et l'homme pour un même apport alimentaire. Ainsi pour assurer un effet biologique efficace, il est donc nécessaire d'avoir un profil alimentaire riche et varié en produits végétaux afin d'optimiser l'apport en flavonoïdes aussi bien sur le plan qualitatif et quantitatif.

Le problème majeur qui sera peut-être débattu ultérieurement est celui de savoir si les flavonoïdes peuvent et doivent devenir dans l'avenir des drogues de première intention.

Références

- Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Le Saux N, and Dales RE. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; **163**: 349-355.
- Abu-Niaaj L, Abu-Zarga M, Sabri S and Abdalla S. Isolation and biological effects of 7-O-methyleriodictyol, a flavanone isolated from *Artemisia monosperma*, on rat isolated smooth muscle. *Planta Med*. 1993; **59**:42-45.
- Adler KB and Li Y. Airway epithelium and mucus: intracellular signaling pathways for gene expression and secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; **25**: 397-400.
- Advenier C, Cerrina J, Duroux P, Floch A, and Renier A. Effects of five different organic calcium antagonists on guinea-pig isolated trachea. *Br J Pharmacol*. 1984; **82**:727-733.
- Ahmed T, and Abraham WM. Role of calcium-channel blockers in obstructive airway disease. *Chest*. 1985; **88**: 142-151.
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanaba S, Itoh N, Shibuya M, and Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*. 1987; **262**: 5592-5595.
- Adlercreutz H, Markkanen H, and Watanabe S. Plasma concentrations of phytoestrogens in Japanese men. *Lancet*. 1993; **342**:1209-1210.
- Aizawa H, Inoue H, Miyazaki N, and Hara N..Histamine-Induced Increase in Isometric Tension of Smooth Muscle Is Mediated by Local Vagus Nerve in Human Bronchus. *Respiration* 2000; **67**:652-656
- Aldonyte R, Jansson L, Piitulainen E, and Janciauskiene S. Circulating monocytes from healthy individuals and COPD patients. *Respir Res*. 2003; **4**:11.
- Anto RJ, Mukhopadhyay A, Shishodia S, Gairola CG, and Aggarwal BB. Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor- κ B through phosphorylation and degradation of I κ B α : correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis*. 2002; **23**: 1511-1518.
- Arnhold J, Mueller S, Arnhold K, and Sonntag K. Mechanisms of inhibition of chemiluminescence in the oxidation of luminol by sodium hypochlorite. *J Biolumin Chemilumin*. 1993; **6**: 307-313.
- Arts IC, and Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 2005; **81**: 317S-325S.
- Au BT, Teixeira MM, Collins PD, and Williams TJ. Effect of PDE4 inhibitors on zymosan-induced IL-8 from human neutrophils: synergism with prostanoids and salbutamol. *Br J Pharmacol*. 1998; **123**: 1260-1266.
- Bacakoglu F, Atsever A, Ozhan MH, Gurgun C, Ozkilib H, and Guzelant A. Plasma and bronchoalveolar lavage fluid levels of endothelin-1 in patients with chronic obstructive pulmonary hypertension. *Respiration*. 2003; **70**: 594-599.
- Balbi B, Bason C, Balleari E, Fiasella F, Pesci A, Ghio R, and Fibiano F. Increase bronchoalveolar granulocytes and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Respir J*. 1997; **10**: 846-850.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, and Palucka K. Immunology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000; **18**: 767-811.
- Barnes JP, Basbaum CB, and Nadel JA. Autoradiographic localization of autonomic receptors in airways in health and disease: smooth muscle: marked differences between large and small airways. *Am Rev Respir Dis*. 1983; **127**: 758-762.
- Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci*. 1993; **52**: 521-528.

- Barnes JP. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2000a; **343**: 269-280.
- Barnes JP. Mechanismes in COPD. *Chest* . 2000b ; **117**: 10S-14S.
- Barnes JP. Cytokine modulators as novel therapies for airway disease. *Eur Respir J Suppl*. 2001; **34**: 67s-77S.
- Barnes JP. New treatments for COPD. *Nat Rev Drug Discov*. 2002; **1**: 437-445.
- Barnes JP. New concepts in COPD. *Annu Rev Med*. 2003; **54**: 113-129.
- Barnes JP, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003; **22**: 672-688.
- Barnes JP. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev*. 2004a; **56**: 515-548.
- Barnes JP. Distribution of receptor targets in the lung. *Proc Am Thorac Soc*. 2004b; **1**: 345-351.
- Barnes PJ, Adcock IM and Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J*. 2005; **25**: 552-563.
- Basbaum C, Li D, Gensch E, Gallup M, and Lemjabbar H. Mechanisms by which gram-positive bacteria and tobacco smoke stimulate mucin induction through the epidermal growth factor receptor (EGFR). *Novartis Found Symp*. 2002; **248**: 171-176.
- Beckman JS, and Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996 ; **271**:C1424-C1437.
- Beeh KM, Kornmann O, and Buhl R, Culpitt SV, Giembycs MA, and Barnes PJ. Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B4. *Chest*. 2003a; **123**: 1240-1247.
- Beeh KM, Beier J, Kornmann O, and Buhl R. Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and with healthy subjects. *Respir Med*. 2003b; **97**: 634-639.
- Belevych A, Warriar S, and Harvey RD. Genistein inhibits cardiac L-type Ca²⁺ channel activity by a tyrosine kinase-independent mechanism. *Mol Pharmacol*. 2002; **62**: 554-565.
- Belmonte KE. Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am throc Soc*.2005; **2**: 297-304.
- Belvisi MG, and Bottomley KM. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res*. 2003; **52**: 95-100.
- Bennetau-Pelissero C, Latonnelle KG, Lamothe V, Shinkaruk-Poix S, and Kaushik SJ. Screening for oestrogenic activity of plant and food extracts using in vitro trout hepatocyte cultures. *Phytochem Anal*. 2004;**15**, 40-45.
- Beretz A, Stoclet J, and Anton R. Inhibition of isolated rat aorta contraction by flavonoids. Possible correlation with cyclic AMP-phosphodiesterase inhibition. *Planta Med*. 1980; **39**: 236-242.
- Bergeron C, and Boulet LP. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. *Chest*. 2006;**129**: 1068-1087.
- Bernheim L, Mathie A, and Hille B. Characterization of muscarinic receptor subtypes inhibiting Ca²⁺ current and M current in a rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; **89**: 9544-9548.
- Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Miyamoto K, and Kawakami Y. Decline in FEV₁ in community-based older volunteers with higher levels of neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid. *Respiration*. 2000; **67**: 1985-1991.

- Beutler B. "TLR4 as the mammalian endotoxin sensor." *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002 ;**270**: 109-120.
- Bhathena S J and Manuel Velasquez T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2002;**76**:1191–1201.
- Biernacki WA, Kharitonov SA, and Barnes PJ. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in axhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax.* 2003; **58**: 114-120.
- Binsack R, Boersma BJ, Patel RP, Kirk M, White CR, Darley-Usmar V, Barnes S, Zhou F, and parks D. enhanced antioxidant activity after chlorination of quercetin by hypochlous acid. *Alcoholism Clin Exp Res.* 2001; **25**: 434-443.
- Blackwell TS, Blackwell TR, Holden EP, Christman BW, and Christman JW. In vivo antioxidant treatment suppress nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation. *J Immunol.* 1996;**157**: 1630-1637.
- Bocchino V, Bertorelli G, Bertrand CP, Ponath PD, Newman W, Franco C, Marruchella A, Merlini S, Del Donno M, and Zhuo X. Eotaxin and CCR3 are up-regulated in exacerbations of chronic bronchitis. *Allergy.* 2002; **57**: 17-22.
- Borchers MT, Carty MP, and Leikauf GD. Regulation of human airway mucins by acrolein and inflammatory mediators. *Am J Physiol.* 1999; **276**: L549-L555.
- Brightling CE, Monteiro W, Ward R, Parker D, Morgan MD, Wardlaw AJ, and Pavord ID. Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2000; **356**: 1480-1485.
- Britton JR, Pavord ID, Richards KA, Knox AJ, Wisniewski AF, Lewis SA, Tattersfield AE, and Weiss ST. Dietary antioxidant vitamin intake and lung function in the general population. *Am J Respir Crit Cure Med.* 1995; **151**: 1383-1387.
- Brown JE, Khodr H, Hider RC, and Rice-Evans C. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* 1998; **330**, 1173-1178.
- Bruneton J. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, (3^{ème} éd.). Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec and Doc Lavoisier, 1999, 1120p.
- Brusasco V. Reducing cholinergic constriction: the major reversible mechanism in COPD. *Eur Respir Rev.* 2006; **15**: 32-36.
- Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L, and Barnes PJ. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respir Med.* 2003; **97**: 1299-1302.
- Cao G, Sofic E, and Prior R L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; **22**: 749-760.
- Capelli A, Di Stefano A, Gnemmi I, Balbo P, Cerutti CG, Balbi B, Lusuardi M, and Donner CF. Increased MCP-1 and MIP-1 β in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitis. *Eur Respir J.* 1999; **14**: 160-165.
- Caramori G, Romagnoli M, Casolari P, Bellettato C, Casoni G, Boschetto P, Fan CK, Barnes PJ, Adcock IM, and Ciaccia A. Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations. *Thorax.* 2003; **58**: 348-351.
- Carp H, Miller F, Hoidal JR, and Janoff A. Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;**79**:2041-2045.
- Carr AC, Hawkins CL, Thomas SR, Stocker RP, and Frei B. Relation reactivities of n-chloramines and hypochlorous acid with human plasma constituents. *Free Radic Biol Med.* 2001; **30**: 526-536.
- Casagrande F, and Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression

- of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol.* 2001;**61**: 1205-1215.
- Casolaro MA, Bernaudin JF, Saltini C, Ferrans VJ, and Crystal RG. Accumulation of Langerhans' cells on the epithelial surface of the lower respiratory tract in normal subjects in association with cigarette smoking. *Am Rev Respir Dis.* 1988; **137**: 406-411.
- Caulfield MP, and Birdsall NJM. International Union of pharmacology . XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 1998; **50**: 279-290.
- Chalmers GW, Macleod KJ, Sriram S, Thomson LJ, McSharry C, Stack BH, and Thomson NC. Sputum endothelin-1 is increased in cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 1999; **13**: 1288-1292.
- Chodosh S. Treatment of acute exacerbations of chronic bronchitis: state of the art. *Am J Med.* 1991; **91**: 87S.
- Choi C, Cho H, Park J, Cho C, and Song Y. Suppressive effects of g ϵ nistein on oxidative stress and NfkappaB activation in RAW 264.7 macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003; **67**: 1916-1922.
- Chopra LC, Hucks D, Twort CHC, and Ward JPT. Effects of protein tyrosine kinase inhibitors on contractility of isolated bronchioles of the rat. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1997; **16**:372-378.
- Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J suppl.* 2001; **34**: 50s-59s.
- Chung KF. The role of airway smooth muscle in pathogenesis of airway wall remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005; **2**: 347-354.
- Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, and Wright JL. Tumor necrosis factor- α drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; **170**: 492-498.
- Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH, and Loetscher P. Structure- function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 289-295.
- Cochran CG, Spragg RG, Revak SD, Cohen AB, and Mcgguire WW. The presence of neutrophil elastase and evidence of oxidation activity in bronchoalveolar lavage fluids of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1983;**127**: 525-527.
- Conquer JA, Maiani G, Azzini E, Raguzzini A, and Holub BJ. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *J Nutr.* 1998; **128**: 492-499.
- Cos P, Ying L, and Calomme M. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavenger. *J Nat Prod.* 1998; **6**: 71-76.
- Cosio MG, Majo J, and Cosio MG. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD; role of T cells. *Chest.* 2002; **121**: 160S-165S.
- Coulson FR, and Fryer AD. Muscarinic acetylcholine receptors and airway disease. *Pharmacol Ther.* 2003; **98**: 59-69.
- Creamer HR, Hunter N, Bullock WW, and Gabler WL. Concurrent lipopolysaccharide enhances chemotactic response of human polymorphonuclear leucocytes to bacterial chemotaxin. *Inflammation.* 1991; **15**: 201-211.
- Crooks SW, Bayley DL, Hill SL, and Stockley RA. Bronchial inflammation in acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis: the role of leukotriene B4. *Eur Respir J.* 2000; **15**: 274-280.
- Cross CF, vander Vliet A, O'Neill CA, Louie S, and Halliwell B. Oxidants, antioixidants, and respiratory tract lining fluids. *Environ Health Perspect.* 1994; **102**: 185-191.

- Crozier A, Jensen E, Lean MEJ, and McDonald MS. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography A*. 1997; **761**: 315-321.
- Cruz MN, Luksha L, Logman H, Poston L, Agewall S, and Kublickiene K. Acute responses to phytoestrogens in small arteries from men with coronary heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; **290**: H1969-H1975.
- Culpitt SV, Nightingale JA, and Barnes PJ. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; **160**: 1635-1639.
- Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, De Matos C, Russell RE, Donnelly LE, and Barnes PJ. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003a; **167**: 24-31.
- Culpitt SV, Rogers DF, Fenwick PS, Shah P, De Matos C, Russell RE, Barnes PJ, and Donnelly LE. Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. *Thorax*. 2003; **58**: 942-946.
- Cunningham BD, Threadgill MD, Groundwater PW, Dale IL, and Hickman JA. Synthesis and biological evaluation of a series of flavones designed as inhibitors of protein tyrosine kinases. *Anticancer Drug Des*. 1992; **7**: 365-384.
- Daheshia M. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Clin appl Immunol Rev*. 2005; **5**: 339-351.
- Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, and Bonewald LF. Proteolysis of latent transforming growth factor- β (TGF- β) binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF- β from bone matrix. *J Biol Chem*. 2002; **277**: 744-752.
- Damiano VV, Tsang A, Kucich U, Abrams WR, Rosenbloom J, Kimbel P, Fallahnejad M, and Weinbaum G. Immunolocalisation of elastase in human emphysematous lungs. *J Clin Investig*. 1986; **78**: 482-493.
- DaSilva EJA, Oliveira A B, and Lapa AJ. Pharmacological evaluation of the antiinflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and clausenquinone, in rats and mice. *J Pharm Pharmacol*. 1994; **46**: 118-22.
- Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes MJC, Morgan MRA, and Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Lett*. 1998; **436**: 71-75.
- De Boer WI, van Schadeewijk A, Sont JK, Sharma HS, Stolk J, Hiemstra PS, and van Krieken JH. Transforming growth factor β 1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; **158**: 1951-1957.
- DeMeo DL, and Silverman EK. Alpha-antitrypsin deficiency. 2: Genetic aspect of alpha (1)-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax*. 2004; **59**: 250-264.
- Deshpande DA, Dogan S, Walseth TF, Miller SM, Amrani Y, Panettieri RA, and Kannan MS. Modulation of calcium signaling by interleukin-13 in human airway smooth muscle: role of CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004; **31**: 36-42.
- Deshpande DA, White TA, Guedes AG, Milla C, Walseth TF, Lund FE, and Kannan MS. Altered airway responsiveness in CD38-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005; **32**: 149-156.
- Devalia JL, Rusznak C, and Davies RJ. Air pollution in the 1990s--cause of increased respiratory disease? *Respir Med*. 1994; **88**: 241-244.
- deVries JH, Hollman PC, van Amersfoort I, Olthof MR, and Katan MB. Red wine is a poor source of bioavailable flavonols in men. *J Nutr*. 2001; **131**: 745-748.

- D'Hulst A, Vermeulen KY, and Pauwels RA. Cigarette smoke exposure causes increase in pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;**164**: A604.
- Di Stefano A, Maestrelli P, Roggeri A, Turato G, Calabro S, Potena A, Mapp CE, Ciaccia A, Covacey L, and Fabbri LM. Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; **149**: 803-810.
- Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, and Saetta M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; **158**: 1277-1285.
- Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, Ioli F, Chung KF, Donner CF, Barnes PJ, and Adcock IM. Increased expression of NF- κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J*. 2002; **20**: 556-563.
- Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, Gnemmi I, Ricciardolo F, Oates T, Donner CF, Chung KF, Barnes PJ, and Adcock IM. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2004; **24**: 78-85.
- Duarte J, Perez-Vizcaino F, Utrilla P, Jiménez J, Tamargo J, and Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aorta smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol*. 1993a; **24**:857-862.
- Duarte J, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Jiménez J, and Tamargo J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 1993b; **239**: 1-7.
- Eiserich JP, Patel RP, and O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med*. 1998 ;**19**:221-357.
- Figtree G, Griffiths H, Lu YQ, Webb C, MacLeod K, and Collins P. Plant-derived estrogens relax coronary arteries in vitro by a calcium antagonist mechanism. *J Am Coll Cardiol*. 2000; **35**: 1977-1985.
- Filipeanu CM, Brailoiu E, Huhurez G, Slatineanu S, Baltatu O, and Branisteanu DD. Multiple effects of tyrosine kinase inhibitors on vascular smooth muscle contraction. *Eur J Pharmacol*.1995; **281**, 29-35.
- Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzeo H, and Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; **152**: 1666-1672.
- Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, and O'Connor CM. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; **156**: 240-247.
- Fiorini G, Crespi S, Rinaldi M, Oberti E, Vigorelli R, and Palmieri G. Serum ECP and MPO are increased during exacerbations of chronic bronchitis with airway obstruction. *Biomed Pharmacother*. 2000; **54**: 274-278.
- Foster RW, Small RC, and Weston AH. The spasmogenic action of potassium chloride in guinea-pig trachealis. *Br J Pharmacol*. 1983; **80**:553-559.
- Franklin WA, Veve R, Hirsch FR, Helfrich BA, and Bunn Jr PA. Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Semin Oncol*. 2002; **29**: 3-14.
- Freyer AM, Billington CK, Penn RB, and Hall IP. Extracellular matrix modulates beta2-adrenergic receptor signaling in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 ;**31**:440-445.
- Fryer AD, and Jacoby DB. Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; **158**: S154-S160.
- Fusi F, Saponara S, Sgaragli G, Cargnelli G, and Bova S. Ca⁽²⁺⁾ entry blocking and contractility promoting actions of norbormide in single rat caudal artery myocytes. *Br J Pharmacol*. 2002 ;**137**:323-328.

- Fusi F, Saponara S, Pessina F, Gorelli B, and Sgaragli G. Effects of quercetin and rutin on vascular preparations: A comparison between mechanical and electrophysiological phenomena. *Eur J Nutr*. 2003; **42**: 10-17.
- Galati E M, Monforte M T, Kirjavainen S, Forestieri A M, Trovato A, and Tripodo M M. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco*. 1994; **40** : 709-12.
- Gamet-Payrastre L, Manenti S, Gratacap M-P, Tulliez J, Chap H, and Payrastre B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI3-kinase. *Gen Pharmacol*. 1999; **32**: 279-286.
- Geiser T, Dewald B, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, and Baggiolini M. The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO α , GRO β and GRO γ activate human neutrophil and basophil leukocytes. *J Biol Chem*. 1993; **268**: 15419-15424.
- Gerrits CM, Herings RM, Leufkens HG, and Lammers JW. N-Acetylcysteine reduces the risk of re-hospitalisation among patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003;**21**:795-798.
- Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib M, Kimura S, Masaki T, Duguid W, and Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1993; **328**: 1732-1739.
- Gilliland FD, Berhane KT, Li Y F, Gauderman WJ, McConnell R, and Peters J. Children's lung function and antioxidant vitamin, fruit, juice, and vegetable intake. *Am J Epidemiol*. 2003;**158**:576-584.
- Gold Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. www.goldcopd.com2005. Data last accessed: September 25, 2006.
- Gompertz S, O'Brien C, Bayley DL, Hill SL, and Stockley RA. Changes in bronchial inflammation during acute exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Respir J*. 2001; **17**: 1112-1119.
- Gosens R, , Zaagsma J, Grootte Bromhaar M, Nelemans A, and Meurs H. Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodeling? *Eur J Pharmacol*. 2004a; **500**: 193-201.
- Gosens R, Schaafsma D, Meurs H, Zaagsma J, and Nelemans A. Role of Rho-kinase in maintaining airway smooth muscle contractile phenotype. *Eur J Pharmacol*. 2004b; **483**:71-78.
- Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, and halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res*. 2006;**7**: 73-88.
- Gottfried DJ, Stone PJ, Sparrow D, Gale ME, Weiss ST, Snider GL, and O'Connor GT. Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative aging Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; **154**: 1290-1295.
- Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobash G, derendorf H, and Veit M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*. 2001; **41**: 492-499.
- Grashoff WF, Sont JK, Sterk PJ, Hiemstr PS, de Boer WI, Stolk J, Han J, and van Krieken JM. Chronic obstructive pulmonary disease: role of bronchiolar mast cells and macrophages. *Am J Pathol*. 1997; **151**: 1785-1790.
- Graziani Y, Erikson E, and Erikson RL. The effect of quercetin on the phosphorylation of the Rous sarcoma virus transforming gene product in vitro and in vivo. *Eur J Biochem*. 1983; **135**: 583-589.
- Gressier B, Cabanis A, Lebegue S, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Cazin M, and Cazin C. Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils: comparison in vitro of some thiol-containing drugs. *Meth Find Exp Clin Pharmacol*. 1994; **16**: 9-13.
- Gross NJ, and Skorodin MS. Role of the parasympathetic system in airway obstruction due to emphysema. *N Engl J Med*. 1984; **311**: 421-425.

- Guillot L, Medjane S, Le-Barillec K, Balloy V, Danel C, and Chignard M. Responses of human pulmonary epithelial cells to liposaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for intracellular compartmentalization of TLR4. *J Biol Chem.* 2004; **279**: 2712-2718.
- Gursel G, Turktas H, Gokcora N. Comparison of sputum and serum eosinophil cationic protein (ECP) levels in nonatopic asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Asthma.* 1997; **34**: 313-319.
- Haddad JJ, and Fahlman CS. Nuclear factor- κ B-independent regulation of lipopolysaccharide-mediated interleukin-6 biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; **291**: 1045-1051.
- Hakonarson H, Herrick DJ, Serrano PG, and Grunstein M M. Mechanism of Cytokine-induced Modulation of β -Adrenoceptor Responsiveness in Airway Smooth Muscle. *J. Clin. Invest.* 1996; **97**:2593-2600.
- Hall IP. Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. *Eur Respir J.* 2000; **15**: 1120-1127.
- Halliwell, Barry; Cross, Carroll E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Persp.* 1994; **102**: 5-12.
- Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, and Moilanen E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflamm.* 2007; **2007**:45673-45683.
- Han J, Lee JD, Tobias PS, and Ulevitch RJ. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J Biol Chem.* 1993; **268**: 25009-25014.
- Hansel TT, Barnes PJ, and Cell BR. Introduction: definitions, burden and causation. In: *An Atlas of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (Eds: Hansel, T.T., Barnes, P.J. Cell, B.R.), the Parthenon Publishing Group, 2004, pp. 1-19.
- Harborne JB, and Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 2000; **55**:481-504.
- Hasday JD, Bascom R, Costa JJ, Fitzgerald T, and Dubin W. Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest,* 1999; **115**: 829-835.
- Hashimoto S, Kobayashi A, Kooguchi K, Kitamura Y, Onodera H, and Nakajima H. upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in septic acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; **161**: 237-243.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002; **96**: 67-202.
- Hawkins CL , and Davies MJ. Hypochlorite-induced damage to proteins : formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem J.* 1998; **332**:617-625.
- Hay DWP, and Sarau HM. Interleukin-8 receptor antagonists in pulmonary diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2001; **1**: 242-247.
- Hazen SL, Hsuf F, D'avignon A, and Heinecke JW. Human neutrophils employ myeloperoxidase to convert alpha-amino acids to a battery of reactive aldehydes: a pathway for aldehyde generation at sites of inflammation. *Biochemistry,* 1998; **37** :6864-6873.
- Hellermann RD, Nagy SB, Kong X, Lockey RF, and Mohapatra SS. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir Res.* 2002; **3**: 22-28.

- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, and Kromhout D.** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993; **342**:1007-1011.
- Hillman GG, Wang Y, Kucuk O, Che M, Doerge DR, Yudelev M, Joiner MC, Marples B, Forman JD, and Sarkar FH.** Genistein potentiates inhibition of tumor growth by radiation in a prostate cancer orthotopic model. *Mol Cancer Ther*. 2004 ;**3**:1271-1279.
- Hodge SJ, Hodge GL, Reynolds PN, Scicchitano R, and Holmes M.** Increased production of TGF- β and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD. *Am J Physiol lung Cell Mol Physiol*. 2003; **285**: L492-L499.
- Hokuto I, Perl AK, and Whitsett JA.** Prenatal, but not postnatal, inhibition of fibroblast growth factor receptor signaling causes emphysema. *J Biol Chem*. 2003; **278**: 415-421.
- Hollenberg M.D.** Tyrosine kinase pathways and the regulation of smooth muscle contractility. *Trends Pharmacol. Sci*. 1994; **15**: 108-114.
- Hollman PC, deVries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, et al.** Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*. 1995; **62**: 1276-1282.
- Hollman PC, Van Trijp JMP, Gaag MVD, Mengelers MJB, and Katan MB.** Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett*. 1997; **418**:152-156.
- Hollman PC, and Katan MB.** Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch Toxicol*. 1998; **25**:237-239.
- Holt PG, and Stumbles PA.** Regulation of immunologic homeostasis in peripheral tissues by dendritic cells: the respiratory tract as a paradigm. *J Allerg Clin Immunol*. 2000; **105**: 421-429.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo T, Ogawa Y, Takeda Y, Takeda K, and Akira S.** Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol*. 1999, **162**: 3749-3752.
- Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Huang JH, Huang CJ, Kandaswami C, Middleton EJ, and Lee MT.** Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor. *Br J Pharmacol*. 1999; **128**: 999-1010.
- Huang RQ, and Dillon GH.** Direct inhibition of glycine receptors by genistein, a tyrosine kinase inhibitor. *Neuropharmacology*. 2000; **39**: 2195-2204.
- Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA, Lander ES, and Hacohen N.** The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science (Wash DC)*. 2001; **294**: 870-875.
- Hutchison KA, Matic G, Meshinchi S, Bresnick EH, and Pratt WB.** Redox manipulation of DNA binding activity and BuGR epitope reactivity of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 1991; **266**: 10505- 10509.
- Imai K, Dalal SS, Chen ES, Downey R, Schulman LL, Ginsburg M, and D'Armiento J.** Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; **163**: 786-791.
- Ishii H, Hayashi S, Hogg JC, Fujii T, Goto Y, Sakamoto N, Mukae H, Vincent R, and van Eeden SF.** Alveolar macrophage-epithelial cell interaction following exposure to atmospheric particles induces the release of mediators involved in monocytes mobilization and recruitment. *Respir Res*. 2005; **8**: R422-R424.
- Ishikawa T, Kume H, Kondo M, Ito Y, Yamaki K, and Shimokata K.** Inhibitory effects of interferon- γ on the heterologous desensitization of β -adrenoreceptors by transforming growth factor- β 1 in tracheal smooth muscle. *Clin Exp Allergy*. 2003; **33**: 808-815.

- Ito K, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, and Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J.* 2001; **15**: 1100-1102.
- Iwagoe H, Kohrogi H, Fujii K, Hamamoto J, Hirata N, and Ando M. Inhibitory effects of tyrosine kinase inhibitors on antigen-induced tracheal contraction and histamine release in guinea-pigs. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996; **111**:291-298.
- Izumi T, Piskula MK, and Osawa S. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr.* 2000; **130**: 1695-1699.
- Jacoby DB, Glielich GJ, and Fryer AD. Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M₂ receptor. *J Clin Invest.* 1993; **91**: 1314-1318.
- Janssen-Heininger YM, Poynter ME, and Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor κ B. *Free Radic Biol Med.* 2000; **28**: 1317-1327.
- Jeffery PK. Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. *Thorax.* 1998; **53**: 129-136.
- Jin N, Siddiqui RA, English D, and Rhoades RA. Communication between tyrosine kinase pathway and myosin light chain kinase pathway in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1996; **271**: H1348-H1355.
- Jinsart W, Ternal B, and Polya GM. Inhibition of wheat embryo calcium dependent protein kinase and avian myosin light chain kinase by flavonoids and related compounds. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 1991; **372**:819-827.
- Johnson M. The β -Adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; **158** :S146–S153.
- Johnston SL, Pepi A, Bates PJ, Mastronarde JG, Monick MM, and Hunninghake GW. Low grade rhinovirus infection induces a prolonged release of IL-8 in pulmonary epithelium. *J Immunol.* 1998; **160**: 6172-6181.
- Joos L. COPD and genetics –what’s new? *Swiss Med Wkly.* 2004; **134**: 437-439.
- Joshi SR and Parikh RM. India--diabetes capital of the world: now heading towards hypertension. *J Assoc Physicians India.* 2007; **55**:323-324.
- Jovanovic SV, Steenken S, Tomic M, Marjanovic B, and Simic MG. Flavonoids as antioxidants. *J Am Chem Soc.* 1994, **116**: 4846-4851.
- Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG, and Hara Y. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoids Radicals. *Antioxidants in health and disease. AHDIEQ J.* 1998; **7**: 137-161.
- Justen U, Knuthsen P, and Leth T. Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of*
- Kanazawa H, Asai K, Hirata K, and Yoshikawa J. Possible effects of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med.* 2003; **114**: 354-358.
- Kang JL, Lee HW, Lee HS, Park IS, Chong Y, Castranova V, and Koh Y. Genistein prevents nuclear factor- κ B activation and lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; **164**: 2206-2212.
- Kang MJ, Oh YM, Lee JC, Kim DG, Park MJ, Lee MG, Hyun IG, Han SK, Shim YS, and Jung KS. Lung matrix metalloproteinase-9 correlates with cigarette smoking and obstructive of airflow. *J Korean Med Sci.* 2003; **18**: 821-827.

- Kang J, Chen J, Shi Y, Jia J, and Zhang Y.** Curcumin-induced histone hypoacetylation: the role of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol.* 2005; **69**:1205– 1213.
- Karimi KH, Sarrir E, Mortaz JJ, Smit H, Hosseini SJ, DeKimpe F, Nijkamp P, and Folkertz G.** Toll-like receptor-4 mediates cigarette smoke-induced cytokine production by human macrophages. *Respir Res.* 2006; **7**: 66-77.
- Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, and Voelkel NF.** Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Investig.* 2000; **106**: 1311-1319.
- Kawikova I, Barnes PJ, Takahashi T, Tadjkarimi S, Yacoub MH, and Belvisi MG.** 8-epi-prostaglandin F_{2α}, a novel non-cyclooxygenase derived prostaglandin, is a potent constrictor of guinea-pig and human airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; **153**: 590-596.
- Keatings VM, Collins PD, Scott DM, and Barnes PJ.** Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; **153**: 530-534.
- Keatings VM, and Barnes PJ.** Granulocytes activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; **155**: 449-453.
- Kharitonov SA, and Barnes PJ.** Exhaled markers of pulmonary disease. 2001; **163**: 1693-1772.
- Kim WD, Eidelman DH, and Izquierdo JL.** Centrilobular and panlobular emphysema in smokers. Two distinct morphological and functional entities. *Am Rev Respir Dis.* 1991; **144**: 1385-1390.
- Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, and Kim HP.** Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.* 1999; **58**: 759-765.
- Kim WD, Kim WS, Koh Y, Lee SD, Lim CM, Kim DS, and Cho YJ.** Abnormal peripheral blood T-lymphocyte subsets in a subgroup of patients with COPD. *Chest.* 2002; **122**: 437-444.
- Kimura M, Arai Y, Shimoi K, and Watanabe S.** Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J Epidemiol.* 1998;**8**:168-175.
- King RA, and Bursill B.** Plasma and urinary kinetics of isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in human. *Am J Clin Nutr.* 1998; **67**: 867-872.
- Kirkham P, and Rahman I.** Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther.* 2006; **111**: 476-494.
- Ko WC, Wang HL, Lei CB, Shih CH, Chung MI, and Lin CN.** Mechanisms of relaxant action of 3-O-methylquercetin in isolated guinea pig trachea. *Planta Med.* 2002; **68**: 30-35.
- Ko WC, Liu PY, Chen JL, Leu IJ, and Shih CM.** Relaxant effects of flavonoids in isolated guinea pig trachea and their structure-activity relationships. *Planta Med.* 2003; **69**: 1086-1090.
- Ko WC, Shih CM, Lai YH, Chen JH, and Huang HL.** Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.* 2004 ; **68** : 2087–2094
- Koyama S, Rennard SI, and Robbins RA.** Acetylcholine stimulates bronchial epithelial cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *Am J Physiol.* 1992; **262**: L466-L471
- Kranenburg AR, de Boer WI, van Kreiken JH, Mooi WJ, Walters JE, Saxena PR, Sterk PJ, and Sharma HS.** Enhanced expression of fibroblast growth factors and receptor FGFR-1 during vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; **27**: 517-525.

- Kumar P, Sharma S, Khanna M, and Raj HG. Effect of Quercetin on lipid peroxidation and changes in lung morphology in experimental influenza virus infection. *Int J Exp Pathol*. 2003;**84**:127-133.
- Kwon OJ, Au BT, Collins PD, Adcock IM, Mak JC, Robbins RA, Baraniuk JM, Chung KF, and Barnes PJ. Tumor necrosis factor α -induced interleukin-8 expression in cultured human epithelial cells. *Am J Physiol*. 1994; **11**: L398-L405.
- Lacoste JY, Bousquet J, and Chanez P. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allerg Clin Immunol*. 1993; **92**: 537-548.
- Lams BE, Sousa AR, Rees JP, Lee TH. Subepithelial immunopathology of the large airways in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2000; **15**: 512-516.
- Landolfi R, Mower RL, and Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol*. 1984; **33**:1525-1530.
- Lasky JA, and Brody AR. Interstitial fibrosis and growth factors. *Environ Health Perspect*. 2000;**108**:751-762.
- Learn BD, Fried VA, and Thomas EL. Taurine and hypotaurine content of human leukocytes. *J Leuk Biol*. 1990; **48**: 174-182.
- Lee TP, Matteliano ML and Middleton E. Effect of quercetin on human Polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholipid metabolism. *Life Sci*.1982; **31**: 2765-2774.
- Lee MJ, Wang ZY, and Li H. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.1995; **4**: 393-399.
- Lee LY, Kwong K, Lin YS, and Gu Q. Hypersensitivity of brochopulmonary C-fibers induced by airway mucosal inflammation: cellular mechanisms. *Pulm Pharmacol Ther*. 2002; **15**: 199-204.
- Lee JH, Del Sorbo L, Uhlig S, Porro GA, Whitehead T, Voglis S, Liu M, Slutsky AS, and Zhang H. intercellular adhesion molecule-1 mediates cellular cross-talk between parenchymal and immune cells after lipopolysaccharide neutralization. *J Immunol*. 2004; **172**: 608-616.
- Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, and Fan CK. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages cigarette smokers. Regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; **162**: 1355-1360.
- Lin CC, Chen JL, and Ko WC. Relaxation of isolated guinea pig trachea by genistein via inhibition of phosphodiesterase. *Planta Med*. 2007; **73**: 323-329.
- Liu SF, Ye X, and Malik AB. Inhibition of NF-kappa B activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo expression of inflammatory genes. *Circulation*. 1999; **100**: 1330-1337.
- Liu J, Li X, Yue Y, Li J, and He Y. The inhibitory effect of quercetin on IL-6 production by LPS-stimulated neutrophils. *Cell Mol Immunol*. 2005; **2**: 455-460.
- Lopez AD, and Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med*. 1998; **4**: 1241-1243.
- Lucey EC, Keane J, Kuang PP, Snider GL, and Goldstein RH. Severity of elastase-induced emphysema is decreased in tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β receptor-deficient mice. *Lab Invest*. 2002;**82**: 79-85.
- Macander PJ. Flavonoids affect acetylcholine, prostaglandin E2, and antigen mediated smooth muscle contraction, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships* (Cody V, Middleton E and Harborne JB eds) , Alan R. Liss, Inc., New York. 1986 pp 489-492.

- MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, and Hogg JC. The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N Engl J Med.* 1989; **321**:924-928.
- MacNee W, Bridgeman MM, Marsden M, Drost E, Lannan S, Selby C, and Donaldson K. The effects of N-acetylcysteine and glutathione on smoke-induced changes in lung phagocytes and epithelial cells. *Am J Med.* 1991; **91**: 60S-66S.
- MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol.* 2001; **429**: 195-207.
- MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005; **2**: 50-60.
- Mahler DA, Huang S, Tabrizi M, and Bell GM. Efficacy and safety of a monoclonal antibody recognizing interleukin-8 in COPD: a pilot study. *Chest.* 2004; **126**: 926-934.
- Maier KL, Leuschel L, and Costabel U. Increased oxidized methionine residues in BAL fluid proteins in acute or chronic bronchitis. *Eur Respir J.* 1992; **5**: 651-658.
- Majo J, Ghezzi H, and Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J.* 2001; **17**: 946-953.
- Manach C, Morand C, and Crespy V. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett.* 1998; **426**: 331-336.
- Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, and Rémésy C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr.* 2003; **57**:235-242.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, and Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; **79**:727-47.
- Mao JT, Tashkin DP, Belloni PN, Baileyhealy I, Baratelli F, and Roth MD. All-trans retinoic acid modulates the balance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with emphysema. *Chest.* 2003; **124**: 1724-1732.
- Mapel D, Chen JC, GEOAge D, and Halbert RJ. The cost of chronic obstructive pulmonary disease and its effects on managed care. *Manag Care Interface.* 2004; **17**: 61-66.
- Martinez MC, Randriamboavonjy V, Ohlmann P, Komasa N, Duarte J, Schneider F, Stoclet JC, and Andriantsitohaina R. Involvement of protein kinase C, tyrosine kinases and Rho kinase in Ca²⁺ handling of human small arteries. *Am J Physiol.* 2000; **279**: H1228-H1238.
- Martinez-Flórez S, Gutiérrez-Fernández B, Sánchez-Campos S, González-Gallego J, and Tuñón MJ. Quercetin attenuates nuclear factor- κ B activation and nitric oxide production in interleukin-1 β -activated rat hepatocytes. *J Nutr.* 2005; **135**: 1359-1365.
- Mathy-Hartert M, Damas P, Nys M, Deby-Dupont G, Canivet JL, Ledoux D, and Lamy M. Nitrated proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients at risk of ventilator-associated bronchopneumonia. *Eur Respir J.* 2000; **16**:296-301.
- Matsuda H, Kageura T, Morikawa T, Toguchida I, Harima S, and Yoshikawa M. Effects of stilbene constituents from rhubarb on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Bioorg Med Chem Lett.* 2000; **10**: 323-327.
- Maurice D, and Haslam RJ. Nitroprusside enhances isoprenaline-induced increases in cAMP in rat aortic smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 1990; **191**: 471 -475.
- Meja KK, Barnes PJ, and Giembycz MA. Characterization of prostanoid receptor(s) on human blood monocytes at which prostaglandin E2 inhibits lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor- α . *Br J Pharmacol.* 1997; **122**: 149-157.

- Merenyi G, Lind J, and Eriksen TE. Nucleophilic addition to diazaquinones. Formation and breakdown of tetrahedral intermediates in relation to luminol chemiluminescence. *J Am Chem Soc.* 1986; **108**: 7716-7726.
- Meshi B, Vitalis TZ, Ionescu D, Elliott WM, Liu C, Wang XD, Hayashi S, and Hogg JC. Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; **26**: 52-57.
- Michel O, Nagy AM, Schroeden M, Duchateau J, Neve J, and Fondu P. Dose-response relationship to inhaled endotoxin in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; **156**: 1157-1164.
- Middleton EJ, and Drzewiecki G. Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem. Pharmacol.* 1984; **33**: 3333-3338.
- Middleton EJ. Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int J Pharmacol.* 1996; **34**: 344-348.
- Middleton EJ, Kandaswami C, and Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000; **52**: 673-751.
- Miltyk W, Craciunescu CN, Fischer L, Jeffcoat RA, Koch MA, Lopaczynski W, Mahoney C, Jeffcoat RA, Crowell J, Paglieri J, and Zeisel SH. Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein, and glycitein) in 20 patients with prostate cancer. *Am J Clin Nutr.* 2003; **77**: 875-882.
- Mio T, Romberger DJ, Thompson AB, Robbins RA, Heires A, and Rennard SI. Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; **155**: 1770-1776.
- Miotto D, Ruggieri MP, Boschetto P, Cavallese G, Papi A, Bononi I, Piola C, Murer B, Fabbri LM, and Mapp CE. Interleukin-13 and 4-expression in the central airways of smokers with chronic bronchitis. *Eur Respir J.* 2003; **22**: 602-608.
- Mishra S, Abbot S, Choudhury Z, Cheng M, Khatab N, Maycock N, Zavery A, and Aarson P. Endothelium-dependent relaxation of rat aorta and main pulmonary artery by the phytoestrogens genistein and daidzein. *Cardiovascular Res.* 2000; **46**: 539-546.
- Molfino NA. Drugs in clinical development for chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration.* 2005; **72**: 105-112.
- Molfino NA, and Jeffery PK. Chronic obstructive pulmonary disease: Histopathology, inflammation and potential therapies. *Pul Pharm Therap.* 2006;
- Molinie F, Kauffman F. Epidémiologie et conséquence socio-économiques. *Epidémiologie descriptive.* In : Margaux. Paris: Broncho-pneumopathie chronique obstructives. 2003; pp 15-34.
- Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, and Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax.* 2003; **58**: 585-588.
- Mookerjee B K, Lee T P, Logue G P, Lippes H A, and Middleton E. The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *Prog Clin Biol Res.* 1986; **213** : 511-520.
- Morris CJ, Earl JR, Trenam CW, and Blake DR. Reactive oxygen species and iron dangerous partnership in inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 1995; **27**: 109-122.
- Morrow JD. The isoprostanes: their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metab Rev.* 2000; **32**: 377-385.
- Morton MS, Arisaka O, Miyake N, Morgan LD, et al. Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J Nutr.* 2002; **132**, 3168-3171.
- Moyano E, Martinez-Garcia JF, and Martin C. Apparent redundancy in Myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in *Abutilon* flowers. *Plant Cell.* 1996; **8**: 1519-1532.

- Müller TF, Müller A, Bachem MG, and Lange H. Immediate metabolic effects of different nutritional regimens in critically ill medical patients. *Intensive Care Med.* 1995;**21**:561-566.
- Murakami K, Muto N, Fukazawa K, and Yamamoto I. Comparison of ascorbic acid and ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside on the cytotoxicity and bioavailability to low density cultures of fibroblasts. *Biochem Pharmacol.* 1992 ;**44**:2191-2197.
- Myers AC. Transmission in autonomic ganglia. *Respir Physiol.* 2001; **125**: 99-111.
- Nagai Y, Shimazu R, Ogala H, Akashi S, Sudo K, Yamazaki H, Hayashi S, Iwakura Y, Kimoto M, and Miyake K. Requirement for MD-1 in cell surface expression of RP 105/CD 180 and B-cell responsiveness to lipopolysaccharide. *Blood.* 2002, **99**: 1699-1705.
- Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, Aalinkeel R, Nair H, Schwartz SA, and Kandaswami C. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system. *Clin Vac Immunol.* 2006; **13**: 319-328.
- Namgoong SY, Son K H, Chang HW, Kang SS, and Kim HP. Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* 1994; **54** : 313-320.
- Nanua S, Zick SM, Andrade JE, Sejjan US, Burgess JR, Lukacs NW, and Hershenson MB. Quercetin blocks airway epithelial cell chemokine expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; **35**: 602-610.
- Nichol G, Nix A, Barnes PJ, and Chung KF. Prostaglandin F_{2 α} enhancement of capsaicin induced cough in man: modulation by β_2 -adrenergic and anticholinergic drugs. *Thorax.* 1990; **45**: 694-698.
- Nikaido T, Ohmoto T, Sankawa U, Hamanaka T and Totsuka K. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by flavonoids. *Planta Medica.* 1982 ; **46**:162–166.
- Nishizuka Y .Protein kinase and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* .1995;**9**: 484-496.
- Nys M, Deby-Dupont G, Habraken Y, Legrand-Poels S, Kohnen S, Ledoux D, Canivet JL, Damas P, and Lamy M. Bronchoalveolar lavage fluids of ventilated patients with acute lung injury activate the NF-kappa B transcription factor in a human epithelial alveolar cell line. *Clin Sci.* 2002;**103**: 577-585.
- Ogawa E, Elliot WM, Hughes F, Eichholtz TJ, Hogg JC, and Hayashi S. Latent adenoviral infection induces production of growth factors relevant to airway remodeling in COPD. *Am J Physiol.* 2004; **286**: L189-197.
- O'Grady NP, Preas HL, Pugin J, Fiuza C, Tropea M, Reda D, Banks SM, and Suffredini AF. Local inflammatory responses following bronchial endotoxin instillation in human. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; **163**: 1591-1598.
- Ohruai T, Sekizawa K, Yamauchi K, Ohkawara Y, Nakazawa H, Aikawa T, Sasaki H, and Takishima T. Chemical oxidant potentiates electrically and acetylcholine-induced contraction in rat trachea: possible involvement of cholinesterase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; **259**: 371-376.
- Okamoto K, Tanaka H, Ogawa H, Makino Y, Eguchi H, Hayashi S, Yoshikawa N, Poellinger L, Umesono K, and Makino I. Redox-dependent regulation of nuclear import of glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* 1999; **274**: 10363-10371.
- O'Leary KA, Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, and Williamson G. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res.* 2004;**551**: 245–254.
- Olson TS, and Ley K. Chemokines and chemokines receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; **283**: R27-R28.

- Owen CA. Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005; **2**: 373-385.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, and Donner DB. NF- κ B activation by tumor necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature.* 1999; **401**: 182-185.
- Panzner P, Lafitte JJ, Tscopoulos A, Hamid Q, and Tulic MK. Marked up-regulation of T-lymphocytes and expression of interleukin-9 in bronchial biopsies from patients with chronic bronchitis with obstruction. *Chest.* 2003; **124**: 1909-1915.
- Papi A, Romagnoli M, Baraldo S, Braccioni F, Guzzinati I, Saetta M, Ciaccia A, and Fabbri LM. Partial reversibility of airflow limitation and increased exhaled NO and sputum eosinophilia in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; **162**: 1773-1777.
- Paredi P, Kharitonov SA, and Barnes PJ. Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; **166**: S31-S37.
- Pauwels RA, Buist AS, Ma P, Jenkins CR, and Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop Summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **163**: 1265-1276.
- Peleman RA, Rytala PH, Kips JC, Joos GF, and Pauwels RA. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Respir.* 1999; **13**: 839-843.
- Peppin GJ, and Weiss SJ. Activation of endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1986, **83**, 4322-4326.
- Pérez-Vizcaino F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnez F, Moreno L, Lopez-Lopez G, and Tamargo J. Endothelium-independent vasodilator effects of flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; **302**: 66-72.
- Pesci A, Rossi GA, Bertorelli G, Aufiero A, Zanon P, and Olivieri D. Mast cells in the airway lumen and bronchial mucosa of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; **149**: 1311-1316.
- Pesci A, Balbi B, Majori M, Cacciani G, Bertacco S, Alciato P, and Donner CF. Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 1998; **12**: 380-386.
- Picman AK, Schneider EF, and Pieman J. Effect of flavonoids on mycelial growth of *Verticillium albo-atrum*. *Biochemical Systematics and Ecology.* 1995; **23**: 683-693.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000; **63**: 1035-1042.
- Pilette C, Ouadrhiri Y, Godding V, Vaerman JP, and Sibille Y. Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited. *Eur Respir J.* 2001; **18**: 571-588.
- Prause O, Laan M, Lotvall J, and Linden A. Pharmacological modulation of interleukin-17-induced GRO-2, GRO- α and interleukin-8 release in human bronchial epithelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2003; **462**: 193-198.
- Profita M, Chiappara G, Mirabella F, Di Giorgi R, Chimenti L, Costanzo G, Riccobono L, Bellia V, Bousquet J, and Vignola AM. Effect of cilomilast (Ariflo) on TNF- α , IL-8 and GM-CSF release by airway cells of patients with COPD. *Thorax.* 2003; **58**: 573-579.
- Profita M, Giorgi RD, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F, Gjomarkaj M, Bonsignore G, Bousquet J, and Vignola AM. Muscarinic receptors, leukotriene B₄ production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Allergy.* 2005; **60**: 1361-1369.
- Pryor WA, and Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxy nitrate and peroxy nitrite. *Ann NY Acad Sci.* 1993; **686**: 12-27.

- Pruzanski W, and Vadas P. Phospholipase A2-A mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today*.1991;**12**:143-144.
- Punturiei A,Filippov S, Allen E, Caras I, Murray R, Reddy V, and Weiss SJ. Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J Exp Med*. 2000; **192**: 789-800.
- Qiu Y, Zhu J, BandiV, Atmar R, Hattotuwa K, Guntupalli K, and Jeffery P. Biopsy neutrophilia, neutrophil chemokine and receptor gene expression in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; **168**: 968-975.
- Racke K, and Mathiesen S. The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm Pharmacol Ther*. 2004; **17**: 181-198.
- Radi R, Peluff O G, Alvarez MN, Navilliat M, and Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological system. *Free Radic Biol Med*. 2001; **30**: 463-488.
- Rahman I, and MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax*. 1998; **53**: 601-612.
- Rahman I, van Schadewijk AA, Crowther AJ, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, and de Boer WI. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; **166**: 490-495.
- Rahman I. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy. *Treat Respir Med*. 2005; **4**: 175-200.
- Rahman I, and Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J*. 2006; **28**: 219-242.
- Rao Y K, Fang SH, and Tzeng YM. Inhibitory Effects of the Flavonoids Isolated from *Waltheria indica* on the Production of NO, TNF- α and IL-12 in Activated Macrophages. *Biol Pharm Bull*. 2005 ; **28** : 912-915.
- Read MA. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents *Vascular*. *Am J Pathol*. 1995;147: 235-237.
- Reader JR, Hyde DM, Schelegle ES, Aldrich MC, Stoddard AM, McLane MP, Levitt RC, and Tepper JS. Interleukin-9 induces mucous cell mataplasia independent of inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003; **28**: 664-672.
- Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Bleck B, and Gordon T. Airway epithelial cells release MIP-3 α /CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003; **28**: 664-672.
- Reimold AM. TNF- α as therapeutic target: new drugs, more applications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002; **1**: 377-392.
- Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, and Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidant status. *J Nutr*. 2000; **130**: 2109S-2114S.
- Rennard SL. Looking at the patient- approaching the problem of COPD. *N Engl J Med*. 2004; **350**: 965-966.
- Repine JE, Bast A, and Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; **156**: 341-357.
- Retamales I, Elliot WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciurba FC, Rogers RM, Hayashi S, and Hogg JC. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; **164**: 469-473.
- Rice-Evans CA, Miller NI, and Pagange G. Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free Radic Biol Med*. 1996; **20**: 933-956.

- Richards GA, Theron AJ, Van der Merwe CA, and Anderson R. Spirometric abnormalities in young smokers correlate with increased chemiluminescence responses of activated blood phagocytes. *Am Rev Respir Dis.* 1989; **139**: 181-187.
- Riise GC, Ahlstedt S, Larsson S, et al. Bronhial inflammation in chronic bronchiitis assessed by measurement of cell products in bronchial lavage fluid. *Thorax.* 1995; **50**: 360-365.
- Risse PA. Developpement d'un modèle in vitro, d'inflammation pulmonaire humain au LPS. Intérêts physiopathologiques dans la BPCO. Thèse de doctorat 2006, Université Paris 5, France.
- Roffel AF, Elzinga CR, and Zaagsma J. Muscarinique M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. *Pulm Pharmacol.* 1990; **3**: 47-51.
- Rogers JC and Williams DL Kaempferol inhibits myosin light chain kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; **164**:419-425.
- Roland M, Bhowmik A, Sapsford RJ, Seemungal TA, Jeffries DJ, Warner TD, and Wedzicha JA. Sputum and plasma endothelin-1 levels in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2001; **56**: 30-35.
- Rose Jr CE, Sung SS, and Fu SM. Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. *Microcirculation.* 2003; **19**: 273-288.
- Rubin RN, Navon L, and Cassano PA. Relationship of serum antioxidants to asthma prevalence in youth. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; **169**: 393-398.
- Russell RE, Thorley A, Culpit SV, Dodd S, Donnelly L, Demattos C, Fitzgerald M and Barnes PJ. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteins and serine proteases. *Am J Physiol lung Cell Mol Physiol.* 2002a; **283**: L867-L873.
- Russell RE, Culpit SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, and Barnes PJ. Release and activity of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002b; **26**: 602-609.
- Rusznak C, Mills PR, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ, and Lozewicz S. Effect of cigarette smoke on the permeability and IL-1 β and sICAM-1 release from cultured human bronchial epithelial cells of never-smokers, smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; **23**: 530-536.
- Saetta M, Distefano A, Maestrelli P, Graziella T, Rugieri MP, Roggeri A, Calcagni P, Mapp CE, Ciaccia A, and Fabbri LM. Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; **150**: 1646-1652.
- Saetta M, Distefano A, Maestrelli P, Turato G, Mapp CE, Pieno M, Zanguochi G, DelPrete G, and Fabbri LM. Airway eosinophilia and expression of interleukin-5 protein in asthma and in exacerbations of chronic bronchitis. *Clin Exp Allergy.* 1996; **26**: 766-774.
- Saetta M, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Lucchini RE, Casoni G, Maestrelli P, Mapp CE, Ciaccia A, and Fabbri LM. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; **156**: 1633-1639.
- Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallesco G, Tropeano G, Mapp CE, and Maestrelli P. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; **160**: 711-717.
- Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, Turota G, Buonsanti C, Baraldo S, Bellettato CM, Papi A, Corbetta L, and Zuin R. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; **157**: 1404-1409.
- Saint S, Bent S, Vittinghoff E, and Grady D. Antibiotics in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. A meta-analysis. *JAMA.* 1995; **273**:957-960.

Sakai H, Otogoto S, Chiba Y, Abe K, and Misawa M. TNF-alpha augments the expression of RhoA in the rat bronchus. *J Smooth Muscle Res.* 2004; **40**: 25-34.

Sambucetti LC, Fischer DD, Zabludoff S, Kwon PO, Chamberlin H, Trogani N, Xu H, and Cohen D. histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. *J Biol Chem.* 1999; **274**: 34940-34947.

Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, and Katan MB. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc.* 2002; **102**:1414-1420.

Sandstrom T, Bjerner L, and Rylander R. Lipopolysaccharide (LPS) inhalation in healthy subjects increases neutrophils, lymphocytes and fibronectin levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir J.* 1992; **5**: 992-996.

Santos S, Peinado VI, Ramirez J, Morales-Blanchir J, Bastos R, Roca, Rodriguez-Roisin R, and Barbera JA. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary arteries of smokers and patients with moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; **167**: 1250-1256.

Santos MC, Oliveira AL, Viegas-Crespo AM, Vicente L, Barreiros A, and Monteiro P. Systemic markers of the redox balance in chronic obstructive pulmonary disease. *Biomarkers.* 2004; **9**: 461-469.

Santus P, Sola A, Carlucci P, Fumagalli F, Di GA, Mondoni M et al. Lipid peroxidation and 5-lipoxygenase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; **171**: 838-843.

Sarir H, Henricks P.A.J, van Houwelingen AH., Nijkamp FP., Folkerts G. Cells, mediators and Toll-like receptors in COPD. *Eur J Pharmacol.* 2008; **585**: 346-353

Sarria B, Naline E, Zhang Y, Cortijo J, Molimard M, Moreau J, Therond P, Advenier C, and Morcillo EJ. Muscarinic M2 receptors in acetylcholine-isoproterenol functional antagonism in human bronchus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; **283**: 1125-1132.

Sataka N, Imanishi M, Keto H, Yamada H, Ishikawa M, and Shibata S. Genistein potentiates the relaxation induced by β 1- and β 2-adrenoreceptor activation in rat aortic rings. *J cardiovascular Pharmacol.* 2000; **35**:227-233.

Savineau JP, Gonzalez De La Fuente P, and Marthan R. Effect of modulators of tyrosine kinase activity on agonist-induced contraction in the rat pulmonary vascular smooth muscle. *Pul Pharmacol.* 1996; **9**:189-195.

Schoonbroodt S, Legrand-Poels S, Bestbelpomme M, and Piette J. Activation of the NF- κ B transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochem. J.* 1997; **321**: 777-785.

Schulz C, Wolf K, Harth M, Kratzel K, Kunz-Schughart L, and Pfeifer M. Expression and release of interleukin-8 by human bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease, smokers and never-smokers. *Respiration.* 2003; **70**: 254-261.

Schulz C, Kratzel K, Wolf K, Schroll S, Kohler M, and Pfeifer M. Activation of bronchial epithelial cells in smokers without airway obstruction and patients with COPD. *Chest.* 2004; **125**: 1706-1713.

Schunemann HJ, Freudenheim JL, and Grant BJ. Epidemiologic evidence linking antioxidant vitamins to pulmonary function and airway obstruction. *Epidemiol Rev.* 2001; **23**: 248-267.

Schwartz DA, Donhan KJ, Olenchock SA, Pependorf WJ, VanFossen DS, and Burmeister LF. Determinants of longitudinal changes in spirometric among swine confinement operators and farmers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; **151**: 47-53.

Seemungal T, Harper-owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Moric I, Sanderson G, Message S, MacCallum P, Meade TW, Jeffries DJ, and Johnston SL. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; **164**: 1618-1623.

- Selby C, and MacNee W. Factors affecting neutrophil transit during acute pulmonary inflammation: minireview. *Exp Lung Res.* 1993; **19**:407-428.
- Selman M, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Ramirez L, Kudlacz EM, Mitchel PG, and Pardo A. Matrix metalloproteinases inhibition attenuates tobacco smoke-induced emphysema in guinea pigs. *Chest.* 2003; **123**: 1633-1641.
- Senior RM, Tegner H, Kuhn C, Ohlsson K, Starcher BC, and Pierce JA. The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase. *Am Rev Respir Dis.* 1997; **116**: 469-475.
- Sethi S. New developments in pathogenesis of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2004; **17** : 698-702.
- Shah A, Church MK, and Holgate ST. Tumour necrosis factor alpha: a potential mediator of asthma. *Clin Exp Allergy.* 1995; **25**:1038-44.
- Shamsuddin M, Chen E, Anderson J, and Smith LJ. Regulation of leukotriene and platelet-activating factor synthesis in human alveolar macrophages. *J Lab Clin Med.* 1997; **130**: 615-626.
- Shan X, Hu A, Veler H, Fatma S, Grunstein JS, Chuang S, and Grunstein MM. Regulation of toll-like receptor 4-induced proasthmatic changes in airway smooth muscle function by opposing actions of ERK 1 / 2 and p38 MAPK signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; **291**: L324-L333.
- Shao MX, Nakanaga T, and Nadel JA. Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor- α converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. *Am J Physiol.* 2004; **287**: L420-L427.
- Shapiro SD and Senior RM. Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; **20**: 1100-1102.
- Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, and Belaouaj A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol.* 2003; **163**: 2329-2335.
- Smith LJ, Holbrook JT, Wise R, Blumenthal M, Dozor AJ, Mastrorade J, and Williams L. Dietary intake of soy genistein is associated with lung function in patients with asthma. *J Asthma.* 2004; **41**: 833-843.
- Snider GL, Kleinerman LJ, Thurlbeck WM, and Bengali ZH. The definition of emphysema: report of a national Heart, lung and Blood Institute, Division of lung Disease workshop. *Am Rev Respir Dis.* 1985; **132**: 182-185.
- Snider GL. Chronic obstructive pulmonary disease: a continuing challenge. *Am Rev Respir Dis.* 1986; **133**: 942-944.
- Snider GL. Chronic obstructive pulmonary disease: a definition and implications of structural determinants of airflow obstruction for epidemiology. *Am Rev Respir Dis.* 1989; **140** : S3-S8.
- Soler P, Moreau A, Basset F, and Hance AJ. Cigarette smoke-induced changes in the number and differentiated state of pulmonary dendritic cells/ Langerhans cells. *Am Rev Respir Dis.* 1989; **139**: 1112-1117.
- Somlyo AV, and Somlyo AP. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* 2000; **522**: 177-185.
- Sommerhoff CP, Caughey GH, Finkbeiner WE, Lazarus SC, Basbaum CB, and Nadel JA. Mast cell chymase: a potent secretagogue for airway gland serous cells. *J Immunol.* 1989; **142**: 2450-2455.
- Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, and Caughey GH. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Investig.* 1990; **85**:682-689.

- Song W, Zhao J, and Li Z. Interleukin-6 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with COPD. *Chin Med J*. 2001; **114**: 1140-1142.
- Spencer JPE, Abd El Mohsen M M, and Rice-Evans C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity . *Archives of Biochem Biophys*. 2004;**423**: 148-161.
- Spicuzza L, Giembycz MA, Barnes PJ, and Belvisi MG. Prostaglandin E₂ suppression of acetylcholine release from parasympathetic nerves innervating guinea-pig trachea by interacting with prostanoid receptors of the EP₃-subtype. *Br J Pharmacol*. 1998; **123**: 1246-1252.
- Spicuzza L, Barnes PJ, Di Maria GU, and Belvisi MG. Effect of 8-isoprostanglandin F_{2α} on acetylcholine release from parasympathetic nerves in guinea pig airways. *Eur J Pharmacol*.2001; **416**: 231-234.
- Srivastava AK. Inhibition of phosphorylase kinase, and tyrosine protein kinase activities by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun*.1985; **131**:1-5.
- Srivastava AK, and St Louis J. Smooth muscle contractility and protein tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biochem*. 1997;**76**:7-51.
- Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*. 2003;**200**:448-64.
- Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JP, Toews GB, Westwick J, and Strieter RM. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in lung. *J Clin Invest*. 1990; **86**: 1945-1953.
- Stefanova I, Corcoran ML, Horak EM, Wahl LM, Bolen JB, and Horak ID. Lipopolysaccharide induces activation of CD14-associated protein tyrosine kinase p53/56lyn. *J Biol Chem*. 1993; **268**: 20725-20728.
- Stern N, Golub M, Nozawa K, Berger M, Knoll E, Yanagawa N, Natarajan R, Nadler JL and Tuck ML . Selective inhibition of angiotensin II-mediated vasoconstriction by lipoxygenase blockade. *Am J Physiol*. 1989; **257**:H434–H443.
- Steusloff A, Paul E, Semenchuk LA, Di Salvo J, and Pfitzer G. Modulation of Ca²⁺ sensitivity in smooth muscle by genistein and protein tyrosine phosphorylation. *Arch Biochem Biophys*. 1995;**320**, 236-242.
- Stockley RA. Proteases and antiproteases. *Novartis Found Symp*. 2001; **234**: 189-199.
- Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, and Dayer JM. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis*. 1992 ; **145** :1016-1022.
- Szilasi M, Dolinay T, Nemes Z, and Strausz J. Pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Pathol Oncol Res*. 2006; **12**: 52-60.
- Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, and Levine RL. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in α1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem*. 2000; **275**: 27258-27265.
- Taha R, Olivenstein R, Utsumi T, Ernst P, Barnes PJ, Rodger IW, and Giaid A. Prostaglandin H synthase 2 expression in airway cells from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; **161**: 636-640.
- Takeyabu K, Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Tanino M, Miyamoto K, and Kawakami Y. Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Eur Respir J*. 1998; **12**: 1033-1039.
- Takeda K, Kaisho T, and Akira S. Toll-like receptor. *Annu Rev Immunol*. 2003; **21**: 335-376.

- Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, and Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol.* 2000; **12**: 113-117.
- Takeyama K, Jung B, Shim JJ, Burgel PR, Dao-Pick T, Ueki IF, Protin U, Kroschel P, and Nadel JA. Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke. *Am J Physiol.* 2001; **280**: L165-L172.
- Takizawa H, Tanaka M, Tanaka K, Ohtoshi T, Ito K, Satoh M, Okada Y, Yamasawa F, Nakahara K, and Umeda A. Increased expression of transforming growth factor- β 1 in small airway epithelium from tobacco and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; **163**: 1476-1483.
- Taniguchi T, Miyazaki T, Minami Y, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Hatakeyama M, and Liu ZJ. IL-2 signaling involves recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the IL-2 receptor. *Ann NY Acad Sci.* 1995; **766**:235-244.
- Tanino M, Betsuyaku T, Takeyabu K, Tanino Y, Yamaguchi E, Miyamoto K, and Nishimura M. Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema. *Thorax.* 2002; **57**: 405-411.
- Tartaglia LA, and Goeddel DV. "Two TNF receptors." *Immunol Today.* 1992; **13**: 151-3.
- Terashima T, Wiggs B, English D, Hogg JC, and van Eeden SF. Phagocytosis of small carbon particles (PM₁₀) by alveolar macrophages stimulates the release of polymorphonuclear leukocytes from bone marrow. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; **155**: 1441-1447.
- Tliba O, Panettieiri RA, Tliba S, Walseth TF, and Amrani Y. Tumor necrosis factor-alpha differentially regulates the expression of proinflammatory genes in human airwaysmooth muscle cells by activationof interferon-beta-dependentCD38 pathway. *Mol Pharmacol.* 2004; **31**: 36-42.
- Tolloczko B, Tao FC, Zacour ME, and Martin JG. Tyrosine kinase-dependent calcium signaling in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; **278**: L1138-L1145
- Toma C, Jensen PE, Prieto D, Hughes A, Mulvany MJ, and Aalkjaer C. Effects of tyrosine kinase inhibitors on the contractility of rat mesenteric resistance arteries. *Br J Pharmacol.* 1995; **114**: 1266-1272.
- Torphy TJ, Zheng C, Peterson SM, Fiscus RR, Rinard GA, and Mayer SE. Inhibitory effect of methacholine on drug-induced relaxation, cyclic AMP accumulation, and cyclic AMP-dependent protein kinase activation in canine tracheal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985; **233**: 409- 417.
- Tracey KJ, and Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med.*1994; **45**:491-503.
- Traves SL, Culpitt S, Russel REK, Barnes PJ, and Donnelly LE. Elevated levels of the chemokines GRO- α and MCP-1 in sputum samples from COPD patients. *Thorax.* 2002; **57**: 590-595.
- Tsang F, and Wong WS. Inhibitors of tyrosine kinase signaling cascade attenuate antigen challenge of guinea-pig airways in vitro. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; **162**: 126-133.
- Tufvesson E, and Westergren-Thorsson G. Alteration of proteoglycan synthesis in human lung fibroblasts induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Biochem.* 2000; **77**:298-309.
- Turato G, Zuin R, and Saetta M. Pathogenesis and pathology of COPD. *Respiration.* 2001; **68**: 117-128.
- Turk V, Turk B, and Turk D. lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *Eur Mol Biol Organ J.* 2001; **20**: 4629-4633.

- Tzanakis N, Chrysofakis G, Tsoumakidou M, Kyriakou D, Tsiligianni J, Bouros D, and Siafakas NM. Induced sputum CD8⁺T-lymphocyte subpopulations in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2004; **98**: 57-65.
- Van Acker SABE, van den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJF, and Bast A. Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad Biol Med.* 1996; **20**: 331-342.
- Van Den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damma J, and Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4 and GRO- α and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood.* 2000; **96**: 2673-2681.
- Vander Puuw Kraan TC, Kucukaycan M, Bakker AM, Baggen JM, van der Zee JS, Dentener MA, Wouters EF, and Verweij CL. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with the -1055IL-13 promoter polymorphism. *Genes Immun.* 2002; **3**: 436-439.
- Vander Vliet A, Eiserich JP, Shigenaga MK, and Cross CE. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract. Epiphenomena or a pathophysiological mechanism of disease? *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; **160**:1-9.
- Van Koppen CJ, Blankesteyn WM, Klaassen ABM, Rodrigues de Miranda JF, Bled AJ, and Ginneken CAM. Autoradiographic visualization of muscarinic receptors in pulmonary nerves and ganglia. *Neurosci Lett.* 1987; **83**: 237-240.
- Vernooy JH, Dentener MA, Van Suylen RJ, Buurnan WA, and Wouters EF. Long-term intracheal liposaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002a; **26**: 152-159.
- Vernooy JH, Kucukaycan M, Jacobs JA, Chavannes NH, Buurnan WA, Dentener MA, and Wouters EF. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease; soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002b; **166**: 1218-1224.
- Vlahovic G, Russell ML, Mercer RR, and Crapo JD. Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; **160**: 2086-2092.
- Wakeling AE. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* 2002; **2**: 382-387.
- Walda IC, Tabak C, Smit HA, Räsänen L, Fidanza F, Menotti A, Nissinen A, Feskens EJ, and Kromhout D. Diet and 20-year chronic obstructive pulmonary disease mortality in middle-aged men from three European countries. *Eur J Clin Nutr.* 2002; **56**:638-643.
- Wallaert B, Gressier B, Marquette CH, Gosset P, Remy-Jardin M, Mizon J, and Tonnel AB. Inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by alveolar inflammatory cells from smoking patients with or without emphysema. *Am Rev Respir Dis.* 1993; **147**:1537-43.
- Walle T, Otake Y, Walle UK, and Wilson FA. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *J. Nutr.* 2000; **130**: 2658-2661.
- Wang BH, Ternai B, and Polya G. Specific inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by warangalone and robusitic acid. *Phytochem.* 1997; **44**: 787-796.
- Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman Jr HA, Shapiro SD, and Elias JA. Interferon- γ induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med.* 2000; **192**: 1587-1600.
- Wang B, Cleary PP, Xu H, and Li JD. Up-regulation of interleukin-8 by novel small cytoplasmic molecules of nontypeable *Haemophilus influenzae* via p38 and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Infect Immun.* 2003; **71**: 5523-5530.

- Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, Takahashi T, Miura T, Arai Y, Mazur W, Wahala K, and Adlercreutz H: Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr.* 1998;**128**:1710-1715.
- Wäitjen W, Michels G, Steffan B, Niering P, Chovolou Y, Kampkötter A, Tran-Thi QH, Proksch P, and Kahl R. Low Concentrations of Flavonoids Are Protective in Rat H4IIE Cells Whereas High Concentrations Cause DNA Damage and Apoptosis^{1,2}. *J Nutr.* 2005;**135**:525-531.
- Watts SW, Yeum CH, Campbell G, and Webb RC. Serotonin stimulates protein tyrosyl phosphorylation and vascular contraction via tyrosine kinase. *J Vasc Res.* 1996; **33**: 288-298.
- Weiss SJ, Peppin G, Ortiz X, agsdale C, and Test ST. Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science.* 1985; **227**: 747-749.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, and Racke K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and functions in humans. *Pharmacol Ther.* 1998; **77**: 59-79.
- Westfall DP, Gerthoffer WT, and Webb RC. Vasodilators and nitric oxide synthase. In: human pharmacology molecular to clinical. Brody TM, Larner J, Minnerman KP, editors. St. Louis: Mosby. 1998: 239-247.
- White JR, Lee JM, Young PR, Hertzberg RP, Jurewicz AJ, Chaikin MA, Widdowson K, Foley JJ, Martin LD, and Griswold DE. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J Biol Chem.* 1998; **273**: 10095-10098.
- Willemse BWM, Postma DS, Timens W, and ten Hacken NHT. The impact of smoking cessation on respiratory symptoms, lung function, airway hyperresponsiveness and inflammation. *Eur Respir J.* 2004; **23**: 464-476.
- Williams L, Bradley L, Smith A, and Foxwell B. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effect of Il-10 in human macrophages. *J Immunol.* 2004; **172**: 567-576.
- Winterbourn CC. Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite. *Biochem Biophys Acta.* 1985; **840**: 204-210.
- Winterbourn CC, and Brennan SO. Characterisation of oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem J.* 1997; **30**: 87-92.
- Winterbourn CC. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicol.* 2002; **181-182** ; 223-227.
- Witko-Sarsat V, Halbwachs-Mecarelli L, Schuster A, Nusbaum P, Ueki I, Canteloup S, Lenoir G, Descamps-Latscha B, and Nadel JA. Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; **20**: 729-736.
- Wong FWS, Koh DSK, Koh AHM, Ting WL, and Wong PTH. Effects of tyrosine kinase inhibitors on antigen challenge of guinea pig lung *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; **283**: 131-137.
- Wright JL, Farmer SG, and Churg A. Synthetic serine elastase inhibitor reduces cigarette smoke-induced emphysema in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; **166**: 954-960.
- Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, and Roussos C. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; **296**:181-187.
- Xu X, Harris KS, Wang HJ, Murphy PA, and Hendrich S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J Nutr.* 1995 ;**125**:2307-2315.
- Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, and Narita N. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest.* 1997; **112**: 505-510.

- Yamamoto S, Sobue T, Sasaki S, Kobayashi M, et al. Validity and reproducibility of a self-administered food-frequency questionnaire to assess isoflavone intake in a Japanese population in comparison with dietary records and blood and urine isoflavones. *J Nutr.* 2001; **131**, 2741-2747.
- Yang SG, Saifeddine M, Laniyonu A, and Hollenberg MD. Distinct signal transduction pathways for angiotensin-II in guinea pig gastric smooth muscle: differential blockade by indomethacin and tyrosine kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; **264**: 958-966.
- Yang XD, Corvalan JR, Wang P, Roy CM, and Davis CG. Fully human anti-interleukin-8 monoclonal antibodies: potential therapeutics for the treatment of inflammatory disease states. *J Leukoc Biol.* 1999; **66**: 401-410.
- Yang SR, Chida AS, Bauter MR, Shafiq N, Seweryniak K, Maggirwar SB, Kilty I and Rahman I. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF- κ B and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; **291**: L46-L57.
- Yoshioka A, Betsuyaku T, Nishimura M, Miyamoto K, Kondo T, and Kawakami Y. Excessive neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid in subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; **152**: 2127-2132.
- Yost BL, Gleich GJ, and Fryer AD. Ozone-induced airway hyperresponsiveness and blockade of M₂ muscarinic receptor by eosinophil major basic protein. *J Appl Physiol.* 1999; **87**: 1272-1278.
- Zeid NA, and Muller HK. Tobacco smoke induced lung granulomas and tumors: association with pulmonary Langerhans cells. *Pathology.* 1995; **27**: 247-254.
- Zhang ZH, and Wang Q. Modulation of a cloned human A-type voltage-gated potassium channel (hKv1.4) by the protein tyrosine kinase inhibitor genistein. *Pflueg Arch Eur J Physiol.* 2000; **440**: 784-792.
- Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese Jr RJ, Chapman Jr HA, Shapiro SD, and Elias JA. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Investig.* 2000; **106**: 1981-1093.
- Zhu J, Qiu YS, Majumdar S, Gamble E, Matin D, Turato G, Fabbri LM, Barnes N, Saetta M, and Jeffery PK. Exacerbations of bronchitis: bronchial eosinophilia and gene expression for interleukin-4, interleukin-5 and eosinophil chemoattractants. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; **164**: 109-116.
- Zidouni N. Symposium BPCO comment mener une enquête opérationnelle: les cas des BPCO. Juin 2005, Faculté de médecine, Annaba.
- Zielinska M, Kostrzewa A, Ignatowicz E, and Budzianowski J. The flavonoids, quercetin and isorhamnetin 3-O-acylglucosides diminish neutrophil oxidative metabolism and lipid peroxidation. *Acta Biochim Pol.* 2001; **48**: 183-189.

Résumé

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est un problème de santé publique majeur. Le présent travail étudie, *in vitro*, les effets pharmacologiques pulmonaires de la quercétine et de la génistéine. Sur le système acellulaire, la quercétine exerce un effet scavenger potentiel sur l'acide hypochloreux. Sur le parenchyme pulmonaire humain stimulé avec lipopolysaccharide (LPS) la quercétine et la génistéine ont montré un effet inhibiteur de la libération du TNF- α , IL-8 et MIP- β . Sur la bronche humaine precontractée, la quercétine et la génistéine sont capables d'induire une relaxation potentielle. Bien que le mécanisme moléculaire de leurs effets biologiques reste encore à explorer, notre étude suggère que la quercétine et la génistéine puissent contribuer dans la prévention et la cure de la maladie BPCO.

Mots clé : quercétine, génistéine, effets : scavenger, effet relaxant, anti-inflammatoire, HOCl, parenchyme et bronche humains.

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major global health problem. In the present study we have investigated, *in vitro*, the pharmacological pulmonary effects of quercetin and genistein. In an acellular assay, quercetin exerted a strong scavenger effect on HOCl. Using human pulmonary parenchyma stimulated with lipopolysaccharide (LPS), quercetin and genistein showed an effective inhibition of TNF- α , IL-8 and MIP- β release. On human bronchus precontracted, quercetin and genistein were able to cause a potent relaxation. Although, the molecular mechanism of their biological effects remains to be clarified, our data suggest that quercetin and genistein may contribute to preventive and cure effects on chronic obstructive pulmonary disease.

Key words: quercetin, genistein, scavenger, relaxant effects, anti-inflammatory effects, HOCl, human parenchyma and bronchus.

ملخص

يعتبر مرض انسداد القصبات الرئوية المزمن من أكبر مشاكل الصحة العمومية. تناول هذا البحث دراسة مفعول صيدلي رئوي لاثنين من فلافونيدات طبيعية كرسيتين و جنستيين. أظهر كرسيتين في وسط لاخلوي قوة مفعوله على إزاحة HOCl. وبينت النتائج المحصل عليها على النسيج الرئوي الإسفنجي للإنسان أن كرسيتين و جنستيين يملكان مفعولا مثبطا ناجعا على إنتاج TNF- α و IL-8 و MIP- β . وكذلك تمكنت كرسيتين و جنستيين على إحداث استرخاء قوي للقصبة الرئوية للإنسان المقلصة. بالرغم من أن الآلية الجزيئية لتأثيرهما البيولوجي تحتاج إلى دراسة أعمق، إلا أن هذه الدراسة تشير إلى إمكانية مساهمة كرسيتين و جنستيين في الوقائية و علاج مرض BPCO.

مفاتيح البحث: كرسيتين، جنستيين، التأثير الإزاحي، ضد الالتهاب، تقلص/استرخاء، HOCl، النسيج الرئوي الإسفنجي، القصبة الرئوية.