

Université de Montréal

Rôle des kinines en pathologie humaine :
Approche expérimentale

Par
Josée Robillard

Faculté de Pharmacie

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

Mars 2005

© Josée Robillard, 2005



AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle des kinines en pathologie humaine :
Approche expérimentale

présenté par :
Josée Robillard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Christophe Leroux, président-rapporteur
Albert Adam, directeur de recherche
Daniel Lamontagne, Co-directeur
Denis DeBlois, membre du jury

Résumé

Les kinines forment une famille de puissants peptides vasodilatateurs. La bradykinine (BK), prototype de cette famille et son métabolite actif, la des-arginine⁹-bradykinine (Des-Arg⁹-BK) sont impliquées dans certains phénomènes physiopathologiques, tel que l'inflammation.

À ce jour, le rôle de la BK et la Des-Arg⁹-BK en pathologie humaine reste mal connu. Afin de mieux cerner cette implication potentielle, nous avons exploré 3 problèmes d'intérêt clinique: l'étude du pouvoir kininogène du plasma lors du syndrome d'embolie par liquide amniotique, la définition du pouvoir kininogène de la fibrinolyse et enfin, l'exploration du métabolisme des kinines dans l'angioedème héréditaire (AOH) de type I et de type II chez des patients traités ou non par le Danatrol[®]. Pour ce faire, nous avons utilisé certaines méthodes validées et disponibles au laboratoire. Nous avons aussi développé des approches analytiques nouvelles.

Pour la première fois, nous avons montré un épuisement du pouvoir kininogène plasmatique pendant la phase aiguë du syndrome d'embolie par liquide amniotique.

De plus, nous avons exploré le système fibrinolytique dans la kininogénèse plasmatique et pour la première fois, nous avons observé une libération de BK, mais aussi de Des-Arg⁹-BK. Nous avons comparé ces résultats à ceux obtenus lors d'une incubation en présence de kallikréine plasmatique.

Enfin, nous avons étudié le métabolisme plasmatique de la BK et la Des-Arg⁹-BK chez des patients atteints d'AOH de type I et de type II, traités ou non par le Danatrol[®] et nous avons montré l'effet du Danatrol[®] sur la T_{1/2} plasmatique de la Des-Arg⁹-BK.

Somme toute, l'analyse de ces résultats permet de mettre en évidence le rôle des kinines en pathologie humaine. Ces observations pourraient mener à des investigations nouvelles d'intérêt clinique stratégique.

Mots-clés : Bradykinine, des-arginine⁹-bradykinine, fibrinolyse, angioedème héréditaire, kininogène de haut poids moléculaire, liquide amniotique

Summary

Kinins are a family of powerful vasodilators peptides. Bradykinin (BK), the prototype of this family and its active metabolite, des-arginine⁹-bradykinine (Des-Arg⁹-BK) are implied in different physiopathological phenomena, such as inflammation.

To date, the role of BK and Des-Arg⁹-BK in human pathology remains poorly known. In order to better determine this potential implication, we explored 3 problems of clinical interest. First, we measure the time course evolution of the kinin-forming capacity of plasma in a case of amniotic fluid embolism syndrome. Second, we study the kinin-forming capacity of fibrinolysis when plasmin is incubated in presence of high molecular weight kininogen. Finally, we evaluate the kinin metabolism in the plasma of patients suffering of a type I and type II hereditary angioedema (HAE), the effect of a treatment with Danatrol[®] on the half life of degradation of BK and Des-Arg⁹-BK and the activity of metallopeptidases responsible for this metabolism is also evaluated.

These different approaches allow to obtain original results for a better understanding of the pathophysiological role of kinins, BK and Des-Arg⁹-BK.

Key words: Bradykinin, des-arginine⁹-bradykinine, fibrinolysis, hereditary angioedema, high molecular weight kininogen, amniotic fluid

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
I Le système kallibréines-kininogènes-kinines.....	1
1. Les kallibréines.....	2
2. Les kininogènes.....	3
3. Les kinines.....	5
4. Les systèmes kininogénateurs.....	6
4.1 Le système de contact plasmatique.....	6
4.1.1 Définition.....	6
4.1.2 Le facteur XII.....	7
4.1.3 Le contrôle de l'activation du système de contact plasmatique par C1INH.....	8
4.2 Le système fibrinolytique plasmatique.....	10
5. Le métabolisme des kinines plasmatiques.....	11
5.1 Nature des enzymes impliquées dans le métabolisme de la BK et de la Des-Arg ⁹ -BK.....	12
5.1.1 La carboxypeptidase N (CPN).....	12
5.1.2 La carboxypeptidase M (CPM).....	12
5.1.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA).....	13
5.1.4 L'endopeptidase neutre 24.11 (EPN 24.11).....	14
5.1.5 L'aminopeptidase P (APP).....	15
5.2 Importance des différentes métallopeptidases dans le métabolisme plasmatique de la BK et de la Des-Arg ⁹ -BK.....	17
6. Les récepteurs des kinines.....	18
7. Le complément plasmatique.....	21
II Le syndrome d'embolie par liquide amniotique.....	22
III L'angiooedème.....	23
1. Définition.....	23

2.	Classification	24
2.1	L'angiooedème héréditaire.....	24
2.1.1	Définition.....	24
2.1.2	Modèles expérimentaux du déficit en C1INH.....	25
2.2	L'angiooedème acquis.....	25
2.2.1	Définition.....	25
2.2.2	L'angiooedème acquis lié à la prise d'oestrogènes	26
IV	Kinines et angiooedème	28
	BUTS DU TRAVAIL	31
	MÉTHODOLOGIE	32
1.	Matériel et réactifs.....	32
2.	Échantillons de plasma.....	32
2.1	Angiooedème héréditaire de type I et II.....	32
2.2	Syndrome d'embolie par liquide amniotique	33
3.	Méthodes analytiques	33
3.1	Métabolisme des kinines exogènes	33
3.1.1	Incubation.....	33
3.1.2	Dosage des kinines	34
3.1.3	Calcul de la T½ des kinines.....	34
3.2	Métabolisme des kinines endogènes	35
3.2.1	Activation du système de contact plasmatique.....	35
3.2.2	Dosage des kinines	35
3.2.3	Profils métaboliques de la BK et de la Des-Arg ⁹ -BK endogènes	35
3.3	Dosage des métallopeptidases plasmatiques	36
3.3.1	L'aminopeptidase P (APP).....	36
3.3.2	La carboxypeptidase N (CPN)	36
3.3.3	L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA).....	37
3.4	Pouvoir kininogène de la kallikréine plasmatique et de la plasmine	37

3.4.1	Incubation pour le dosage des kinines immunoréactives libérées, le calcul du K_m et leur analyse par chromatographie liquide à haute pression (HPLC).....	37
3.4.2	Incubation pour l'immunobuvardage des produits d'hydrolyse du KHPM par la kallibréine plasmatique et la plasmine.....	38
3.4.3	Dosage des kinines	38
3.4.4	Identification de la BK et de la Des-Arg ⁹ -BK immunoréactives par HPLC.....	38
3.4.5	Calcul du K_m	39
3.5	Immunobuvardage	39
4.	Traitement statistique des différents paramètres cinétiques calculés pour les patients atteints d'AOH de type I et II.....	40
	PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS	41
I	Présentation et analyse des résultats pour le pouvoir kininogène plasmatique lors du syndrome d'embolie par liquide amniotique.....	41
1.	BK immunoréactive libérée à partir du KHPM pendant l'activation <i>in vitro</i> du système de contact plasmatique chez une patiente atteinte du syndrome d'embolie par liquide amniotique.....	41
2.	Immunobuvardage des différents prélèvements de plasma de la patiente	43
II	Présentation et analyse des résultats pour le pouvoir kininogène de la kallibréine plasmatique et de la plasmine.....	44
1.	Immunobuvardage des produits d'hydrolyse obtenus par incubation du KHPM en présence de kallibréine plasmatique et de plasmine	44
2.	Dosage de la BK et de la Des-Arg ⁹ -BK immunoréactives libérées lors de l'incubation du KHPM en présence de kallibréine plasmatique et de plasmine	47
3.	Calcul du K_m de la kallibréine plasmatique et de la plasmine vis-à-vis le KHPM... ..	49
4.	Nature des kinines immunoréactives libérées suite à l'incubation de KHPM en présence de kallibréine plasmatique et de plasmine	51
III	Présentation et analyse des résultats pour l'angioedème héréditaire de type I et II	54

1. Activités des métallopeptidases plasmatiques impliquées dans le métabolisme de la BK et la Des-Arg ⁹ -BK chez des patients atteints d'AOH de type I et II	54
2. T _{1/2} plasmatiques de la BK et de la Des-Arg ⁹ -BK chez des patients atteints d'AOH de type I et II	56
DISCUSSION GÉNÉRALE	59
CONCLUSION	63
BIBLIOGRAPHIE	64
ANNEXE.....	I

Liste des figures

Figure 1.	Représentation des 6 domaines du KHPM avec leur fonction primaire.....	4
Figure 2.	Origine de la BK et de la KD.....	6
Figure 3.	Le système de contact plasmatique et ses relations avec le système intrinsèque de la coagulation, le complément et la fibrinolyse.....	9
Figure 4.	Cascade enzymatique de la fibrinolyse.....	11
Figure 5.	Métabolisme de la BK et de la Des-Arg ⁹ -BK par les principales métallopeptidases plasmatiques.....	16
Figure 6.	Contribution relative des principales métallopeptidases plasmatiques impliquées dans le métabolisme de la BK et de la Des-Arg ⁹ -BK.....	17
Figure 7.	Le récepteur B ₂ de la BK.....	20
Figure 8.	Vue d'ensemble des voies d'activation du complément.....	22
Figure 9.	BK immunoréactive libérée à partir du KHPM pendant l'activation <i>in vitro</i> du système de contact plasmatique dans le contexte du syndrome d'embolie par liquide amniotique.....	42
Figure 10.	Profil de l'immunobuvardage des différents prélèvements de plasma de la patiente.....	43

- Figure 11.** Profil de l'immunobuvardage de l'hydrolyse du KHPM par la kallibréine plasmatique.....45
- Figure 12.** Profil de l'immunobuvardage de l'hydrolyse du KHPM par la plasmine.....46
- Figure 13.** BK et Des-Arg⁹-BK immunoréactives libérées suite à l'incubation de différentes concentrations de KHPM en présence de 1µg de kallibréine plasmatique48
- Figure 14.** BK et Des-Arg⁹-BK immunoréactives libérées suite à l'incubation de différentes concentrations de KHPM en présence de 1µg de plasmine.....48
- Figure 15.** Courbe de Lineweaver-Burk obtenue à partir des quantités dosées de BK libérée suite à l'incubation de KHPM en présence de kallibréine plasmatique.....49
- Figure 16.** Courbe de Lineweaver-Burk obtenue à partir des quantités dosées de Des-Arg⁹-BK libérée suite à l'incubation de KHPM en présence de kallibréine plasmatique50
- Figure 17.** Courbe de Lineweaver-Burk obtenue à partir des quantités dosées de BK libérée suite à l'incubation de KHPM en présence de plasmine.....50
- Figure 18.** Courbe de Lineweaver-Burk obtenue à partir des quantités dosées de Des-Arg⁹-BK libérée suite à l'incubation de KHPM en présence de plasmine.....51

- Figure 19.** Temps de rétention des kinines immunoréactives libérées suite à l'incubation de KHPM en présence de kallibréine plasmatique.....52
- Figure 20.** Temps de rétention des kinines immunoréactives libérées suite à l'incubation de KHPM en présence de plasmine.....52
- Figure 21.** Profil chromatographique standard du temps de rétention des kinines dans un système HPLC utilisant la colonne échangeuse de cations.....53
- Figure 22.** Moyenne des activités de l'APP plasmatique chez les patients atteints d'AOH de type I et II, traités ou non par le Danatrol®55
- Figure 23.** Moyenne des activités de l'ECA plasmatique chez les patients atteints d'AOH de type I et II, traités ou non par le Danatrol®56
- Figure 24.** Moyenne des $T_{1/2}$ plasmatiques de la BK exogène ajoutée au plasma de patients atteints d'AOH de type I et II, traités ou non par le Danatrol®57
- Figure 25.** Moyenne des $T_{1/2}$ plasmatiques de la Des-Arg⁹-BK chez les patients atteints d'AOH de type I et II, traités ou non par le Danatrol®58

Liste des sigles et abréviations

AC :	adénylate cyclase
AO :	angiooedème
AOA :	angiooedème acquis
AOH :	angiooedème héréditaire
AI :	angiotensine I
AII :	angiotensine II
AMP _c :	adénosine monophosphate cyclique
ANP :	atrial natriuretic peptide
APP :	aminopeptidase P
APP _c :	aminopeptidase P cytosolique
APP _m :	aminopeptidase P membranaire
aPTT :	temps d'activation du plasma par la thromboplastine
ARA :	antagonistes des récepteurs à l'angiotensine
BK :	bradykinine
BNP :	brain natriuretic peptide
Ca ²⁺ :	calcium
CAM :	complexe d'attaque membranaire
C1INH :	inhibiteur de C1
CPM :	carboxypeptidase M, kininase I
CPN :	carboxypeptidase N, kininase I
DAG :	diacylglycérol
Des-Arg ⁹ -BK :	des-arginine ⁹ -bradykinine
Des-Arg ¹⁰ -KD :	des-arginine ¹⁰ -kallidine
DIG-Osu :	digoxigenin-3-0-methylcarboxyl-ε-aminocaproic-acid-N-hydroxysuccinimide ester
ECA :	enzyme de conversion de l'angiotensine I, kininase II
EPN 24.11 :	endopeptidase neutre 24.11

ERO :	élément de réponse aux oestrogènes
FXI :	facteur XI de la coagulation
FXIa :	facteur XI activé
FXII :	facteur XII de la coagulation, facteur de Hageman
FXIIa :	facteur XII activé
GC :	guanylate cyclase
GMP _c :	guanosine monophosphate cyclique
GPI :	glycosylphosphatidylinositol
HEPES :	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC :	chromatographie liquide à haute pression
HRPO :	peroxydase de raifort
iECA :	inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
iVP :	inhibiteur des vasopeptidases
JAK/STAT :	janus kinase/STAT
IL :	interleukine
IP ₃ :	inositol triphosphate
kDa :	kilodalton
KD :	kallidine, Lys-BK
KFPM :	kininogène de faible poids moléculaire
KHPM :	kininogène de haut poids moléculaire
KK :	kallicréine
K _m :	constante de Michaelis-Menten
MBL :	mannose binding lectine
NO :	monoxyde d'azote
NOs :	monoxyde d'azote synthase
PIP ₂ :	phosphatidyl inositol biphosphate
PAI-1 :	inhibiteur de type 1 de l'activateur tissulaire du plasminogène
PAI-2 :	inhibiteur de type 2 de l'activateur tissulaire du plasminogène

PGI ₂ :	prostaglandine I ₂
PK :	prékallcréine plasmatique
PLA ₂ :	phospholipase A ₂
PLC-β :	phospholipase C-β
tPA :	activateur tissulaire du plasminogène
UmA :	unités de milliabsorbance
uPA :	urokinase
Zn ²⁺ :	zinc

Remerciements

Je tiens à remercier :

- Le Professeur Albert Adam pour son soutien, sa patience, son aide, ses conseils et surtout pour la confiance qu'il m'a accordée. Au cours des deux dernières années, être sous sa direction m'a appris à connaître une personne passionnée, dévouée et admirable. J'ai pu développer un esprit critique, une rigueur scientifique appliquée autant aux techniques de laboratoire qu'à la rédaction d'articles importants, incluant ce mémoire. Je ne garderai que de bons souvenirs des moments les plus difficiles à ceux les plus mémorables.
- Les étudiants au Doctorat Giuseppe Molinaro et Marie Eve Moreau pour m'avoir aidé à mieux comprendre la théorie et les techniques, pour avoir répondu à mes nombreuses questions et pour m'avoir aidé lors de mes manipulations
- Mme Nicole Gervais, l'assistante de recherche, pour m'avoir montré les techniques de laboratoire et avoir résolu les petits problèmes quotidiens
- L'équipe du Dr. Georges-Étienne Rivard pour les échantillons et leur collaboration dans l'article en annexe
- Le Dr. Christian Drouet pour les échantillons
- Le Professeur Yves Lepage pour le traitement statistique
- Mes parents et amis pour m'avoir constamment soutenue et m'avoir encouragée dans toutes mes démarches
- Toutes les personnes qui ont fait en sorte que ce mémoire voit le jour

INTRODUCTION

I Le système kallibréines-kininogènes-kinines

Comme le système rénine-angiotensine, celui de la coagulation et le complément, le système kallibréines-kininogènes-kinines représente une cascade métabolique incluant de nombreuses étapes. Il a été mis en évidence pour la première fois il y a près d'un siècle par Abelous et Bardier, deux physiologistes toulousains (Abelous et Bardier, 1909). Au cours d'une de leurs expériences, ces auteurs remarquèrent que l'injection intraveineuse d'une fraction d'urine humaine, insoluble dans l'alcool, chez un chien anesthésié causait une hypotension. Cette hypotension fut attribuée à une substance spécifique nommée plus tard *substance F* (Frey et Kraut, 1928; Kraut et al, 1928). Étant donné que cette *substance F* était présente en concentration importante dans le pancréas, elle fut nommée kallibréine (KK). Plus tard, d'autres chercheurs découvrirent que le pancréas était assurément le principal site de synthèse de la kallibréine tissulaire (Kraut et al, 1930). Cette dernière est capable d'hydrolyser le kininogène pour en libérer des kinines, peptides vasoactifs et hypotenseurs.

En 1949, Rocha e Silva et collaborateurs étudiaient les effets du venin provenant d'une vipère localisée en Amérique du Sud, *Bothrops jararaca* et démontrèrent la libération d'une substance vasodilatatrice lors d'une incubation de ce venin avec les globulines du plasma (Rocha e Silva et al, 1949). La bradykinine (BK), un nonapeptide (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), principal membre de la famille des kinines produisait une contraction lente du muscle lisse. Ce peptide doit son nom de BK à son action pharmacologique lente au niveau de la contraction du muscle lisse (*brady* signifie lent en grec, *kinine* signifie mouvement). Depuis ce temps, d'autres kinines ont été découvertes et de très nombreuses études leur ont été consacrées.

Différentes enzymes peuvent métaboliser les kinines. Elles font l'objet d'investigations approfondies, dont les nôtres. Elles ont été regroupées sous le terme générique de kininases. Ainsi, la carboxypeptidase N (CPN) et la carboxypeptidase M (CPM), toutes deux nommées kininase I, libèrent le résidu arginine de la partie carboxy-

terminale de la BK pour former la des-arginine⁹-bradykinine (Des-Arg⁹-BK), son métabolite actif. L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA ou kininase II) hydrolyse le dipeptide Phe⁸-Arg⁹ ainsi que le dipeptide Ser⁶-Pro⁷. L'endopeptidase neutre 24.11 (EPN 24.11) clive le lien Pro⁷-Phe⁸ pour libérer, comme l'ECA, le dipeptide Phe⁸-Arg⁹. Finalement, l'aminopeptidase P (APP) libère le résidu arginine en partie amino-terminale (Erdös et Skidgel, 1997). Ces trois dernières enzymes inactivent les kinines.

Les kinines exercent leurs effets pharmacologiques en se liant à deux types de récepteurs. La BK agit sur les récepteurs de type B₂, alors que son métabolite actif, la Des-Arg⁹-BK, agit sur le type B₁. Ainsi, le récepteur B₂ est stimulé par la séquence complète de la BK et ses analogues, alors que B₁ est stimulé par des peptides auxquels l'arginine de la partie carboxy-terminale est absente (Erdös et Skidgel, 1997).

1. Les kallicroéines

On distingue deux types de kallicroéines : les kallicroéines tissulaires et la kallicroéine plasmatique.

Les kallicroéines tissulaires, synthétisées sous forme de prékallicroéines, font partie d'un groupe de protéases à sérine retrouvées dans différents types de cellules glandulaires (glandes salivaires, pancréas, intestins et prostate) et leur produit de sécrétion exocrine. On les a également mises en évidence dans les polynucléaires neutrophiles, les cellules de la bordure en brosse du tubule contourné proximal au niveau du rein et dans l'urine (Margolius, 1999). Ces kallicroéines ont un poids moléculaire de 25 à 45kDa et sont différentes d'un point de vue biochimique de la kallicroéine plasmatique (Bhoola et al, 1992). Les kallicroéines tissulaires hydrolysent le kininogène de faible poids moléculaire (KFPM) pour libérer la kallidine (KD, Lys-BK).

La kallicroéine plasmatique est synthétisée au niveau du foie sous forme de prékallicroéine (PK). C'est sous cette forme inactive qu'elle circule dans le plasma. La prékallicroéine est constituée d'une chaîne polypeptidique unique d'environ 619 acides

aminés (Chung et al, 1986; Bhoola et al, 1992). La kallibréine est formée par le clivage enzymatique de la prékalibréine plasmatique par le facteur XIIa (FXIIa) de la coagulation au niveau du dipeptide Arg³⁷¹-Ile³⁷². Cette activation protéolytique a pour conséquence la formation d'une enzyme composée d'une chaîne lourde en partie amino-terminale (371 acides aminés, 55kDa) et d'une chaîne légère en partie carboxy-terminale (248 acides aminés, 36kDa), toutes deux reliées par un pont disulfure (Chung et al, 1986). La chaîne légère contient le site catalytique de l'enzyme. La kallibréine plasmatique hydrolyse le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) pour libérer la BK. L'activité protéolytique de la kallibréine plasmatique est inhibée par différentes antiprotéases, principalement par l'inhibiteur de C1 (C1INH), ainsi que par l'antithrombine III et l' α_2 -macroglobuline de façon moindre (Meijers et al, 1988; Meijers et al, 1992).

2. Les kininogènes

Chez les mammifères, trois types de kininogènes ont été décrits jusqu'à présent : le KHPM (88 à 115kDa), le KFPM (50 à 68kDa) et le T-kininogène (Müller-Esterl et al, 1986). Ce dernier ne se retrouve que chez le rat.

Les kininogènes sont des glycoprotéines multifonctionnelles synthétisées principalement par le foie. Malgré leur masse moléculaire différente, les kininogènes ont une structure de base très semblable et proviennent d'un même gène, soit le gène *K*. Ce dernier est situé au locus 3q26 du chromosome 3 (Cheung et al, 1992).

La structure de base des KHPM et KFPM est formée d'une chaîne lourde commune en partie amino-terminale (50 à 60kDa) et d'une chaîne légère en partie carboxy-terminale de longueur variable selon le type de kininogène. La chaîne légère d'un poids moléculaire de 45 à 58kDa est spécifique au KHPM, alors qu'elle n'est que de 4 à 5kDa pour le KFPM (Müller-Esterl et al, 1986). Les deux chaînes sont reliées par un pont disulfure.

La chaîne lourde, commune aux deux types de kininogènes, est constituée d'unités répétitives, les domaines 1, 2 et 3 respectivement, illustrés à la figure 1. Le domaine 1

contient un site de fixation pour le calcium (Ca^{2+}), les domaines 2 et 3 sont doués d'une activité inhibitrice pour les protéases à cystéines (papaïne, cathepsines B, H et L) (Salvesen et al, 1986). Le domaine 4, situé entre la chaîne lourde et la chaîne légère, contient la séquence kininomatrice. Les domaines 5 et 6, illustrés à la figure 1, constituent la chaîne légère du KHPM et sont responsables de son activité procoagulante. En effet, le domaine 5, riche en résidus histidine, proline et lysine, est capable de fixer le KHPM aux surfaces chargées négativement (Müller-Esterl et al, 1986). Le domaine 6 est responsable de l'interaction de ce même kininogène avec la prékallicroïne plasmatique et le facteur XI de la coagulation (FXI) (Thompson et al, 1977). En effet, le KHPM dans le plasma circule complexé à la prékallicroïne ainsi qu'au FXI. Pour le KFPM, le domaine 5 constitue l'unique chaîne légère et sa fonction reste inconnue jusqu'à maintenant.

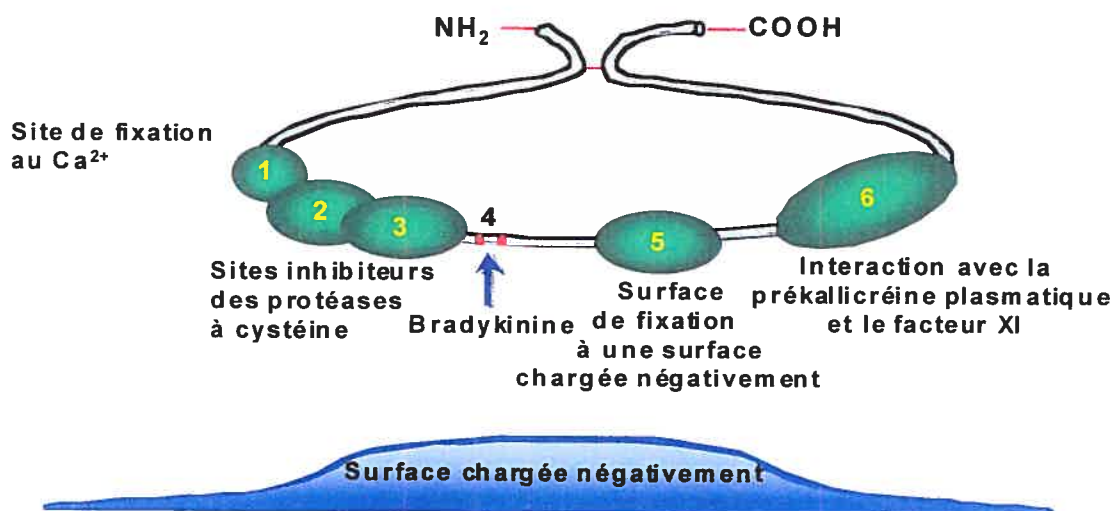


Figure 1. Représentation des 6 domaines du KHPM avec leur fonction primaire. Les domaines 1, 2 et 3 constituent la chaîne lourde, commune aux deux types de kininogènes. Le domaine 4 contient la partie kininomatrice, commune aussi. Les domaines 5 et 6 constituent la chaîne légère du KHPM.

3. Les kinines

Les kinines constituent une famille de peptides vasodilatateurs et proinflammatoires pouvant influencer une variété de processus biologiques. Entre autres, les kinines peuvent causer de l'hypotension, de la douleur, une relaxation des muscles lisses, ainsi que l'augmentation de perméabilité des vaisseaux sanguins.

La BK est un nonapeptide, prototype de cette famille de peptides vasoactifs. Cette kinine est composée de 5 acides aminés différents, soit, l'arginine, la phénylalanine, la proline, la glycine et la sérine en proportion molaire 2:2:3:1:1. Elle est libérée dans le plasma lors de l'hydrolyse du KHPM aux liens Lys³⁶²-Arg³⁶³ et Arg³⁷¹-Ser³⁷² par la kallibréine plasmatique, tel qu'illustré à la figure 2.

La KD (Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), quant à elle, est libérée par les kallibréines tissulaires qui clivent les liens Met³⁶¹-Lys³⁶² et Arg³⁷¹-Ser³⁷² du KFPM, tel que montré à la figure 2 (Colman et Schmaier, 1997).

L'effet pharmacologique de ces deux kinines passe par l'activation des récepteurs B₂, qui sont constitutifs dans la plupart des cellules (Marceau et al, 1998). La BK agit la plupart du temps localement au site de sa formation à cause de sa courte demi-vie plasmatique, normalement en deçà de 30 secondes (McCarthy et al, 1965).

La Des-Arg⁹-BK est le métabolite actif de la BK, il en est de même pour la des-arginine¹⁰-kallidine (Des-Arg¹⁰-KD) par rapport à la KD. Ces métabolites stimulent les récepteurs B₁ qui sont surtout exprimés lors de conditions pathologiques, particulièrement lors de l'inflammation.

Les kinines doivent être considérées comme des médiateurs paracrines ou autocrines et non comme des hormones, puisqu'elles exercent leur activité pharmacologique au site de leur formation.

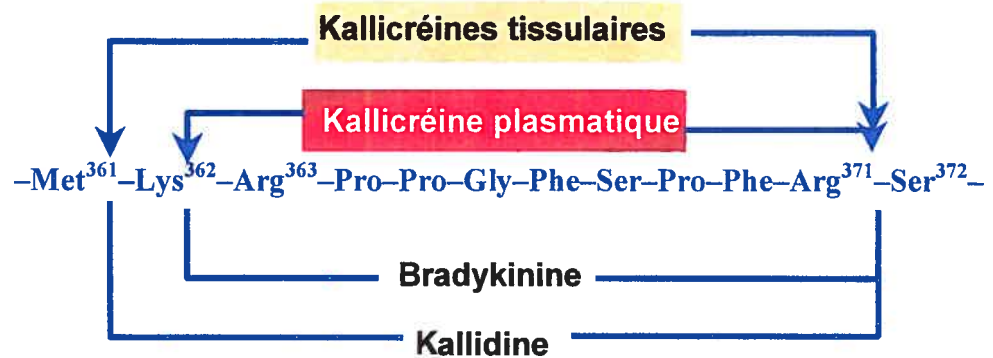


Figure 2. Origine de la BK et de la KD. La BK est formée par hydrolyse des liens Lys³⁶²-Arg³⁶³ et Arg³⁷¹-Ser³⁷² du KHPM par la kallicroïne plasmatique. La KD est formée par clivage des liens Met³⁶¹-Lys³⁶² et Arg³⁷¹-Ser³⁷² du KFPM par les kallicroïnes tissulaires.

4. Les systèmes kininogénés

4.1 Le système de contact plasmatique

4.1.1 Définition

La formation de BK dans le plasma humain dépend de l'interaction du KHPM, son précurseur, avec une surface chargée négativement, tel qu'illustré à la figure 3.

Lorsqu'il y a contact du plasma avec une surface chargée négativement (billes de verre, sulfate de dextran ou kaolin dans un système *in vitro*) cette surface concentre le facteur XII de la coagulation (FXII, facteur de Hageman) et lie le domaine 5 du KHPM. Le KHPM agit alors comme un cofacteur non-enzymatique nécessaire à l'activation du FXII, de la prékallicroïne et du FXI en enzymes actives (Kaplan et Silverberg, 1987). La liaison du FXII plasmatique à une surface chargée négativement provoque son autoactivation en FXIIa. Cette autoactivation est dépendante du zinc (Zn^{2+}). Le FXIIa transforme la

prékallicréine plasmatique circulante complexée au KHPM en sa forme active, la kallicréine, qui elle, hydrolyse le KHPM pour libérer le peptide vasoactif BK. De plus, la kallicréine amplifie l'activation du FXII en FXIIa. Ce dernier poursuit son action en activant le FXI responsable du déclenchement de la voie intrinsèque de la coagulation (Kaplan et Silverberg, 1987).

L'homéostasie de ce système est contrôlée principalement par C1INH. Ce dernier compte pour près de 90% de l'inhibition du FXIIa. C1INH lie le FXIIa et l'inactive de façon irréversible (Colman et Schmaier, 1997).

Comme le montre la figure 3, le système de contact entretient des liens avec le système intrinsèque de la coagulation, le complément et le système fibrinolytique. Le FXIIa, en plus de promouvoir l'hydrolyse de la prékallicréine plasmatique en kallicréine, active le FXI en FXIa, premier facteur de la voie intrinsèque de la coagulation (Kaplan et Silverberg, 1987). Le FXIIa provoque aussi l'activation de C1 en protéases C1s et C1r du complément (Ghebrehiwet et al, 1983). De plus, la BK formée par le système de contact induit la libération de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) qui lui, clive le plasminogène pour former la plasmine, responsable de la fibrinolyse (Brown et al, 1997).

4.1.2 Le facteur XII

Le FXII a été découvert à cause de son déficit dans le sang de Monsieur Hageman en 1955, d'où son nom (Saito, 1980). Le FXII est une glycoprotéine plasmatique d'environ 80kDa (Kaplan et Silverberg, 1987). L'activation du FXII au contact d'une surface chargée négativement entraîne une protéolyse limitée de ce dernier en FXIIa. Celui-ci est composé de 2 chaînes reliées par un pont disulfure : une de 52kDa en partie amino-terminale qui sert à lier les surfaces chargées négativement et une de 28kDa à la partie carboxy-terminale associée à l'activité protéolytique (Saito, 1980). Le FXIIa active la prékallicréine en kallicréine et cette dernière libère la BK à partir du KHPM (Fuhrer, 1990).

La majorité des sujets ayant un déficit fonctionnel en FXII sont démunis de la protéine immunoréactive. Une caractéristique commune aux patients est une augmentation

du temps d'activation du plasma par la thromboplastine (aPTT) (Fuhrer, 1990). De plus, la plupart des cas sont asymptomatiques. La déficience en facteur de Hageman est habituellement transmise de façon autosomale récessive.

4.1.3 Le contrôle de l'activation du système de contact plasmatique par C1INH

À côté de son rôle essentiel du contrôle des protéases C1r et C1s du complément, C1INH participe au contrôle de l'activité enzymatique de la kallikréine plasmatique et du FXIIa.

C1INH est une glycoprotéine d'environ 105kDa synthétisée par les hépatocytes et les monocytes. Il est codé par un gène localisé au chromosome 11 (Zahedi et al, 1993). C1INH fait partie de la superfamille des inhibiteurs des protéases à sérine (serpines) (Tosi et al, 1986). Cette famille inclut aussi l' α_2 -antiplasmin, l'antithrombine III, ainsi que l' α_1 -antitrypsine.

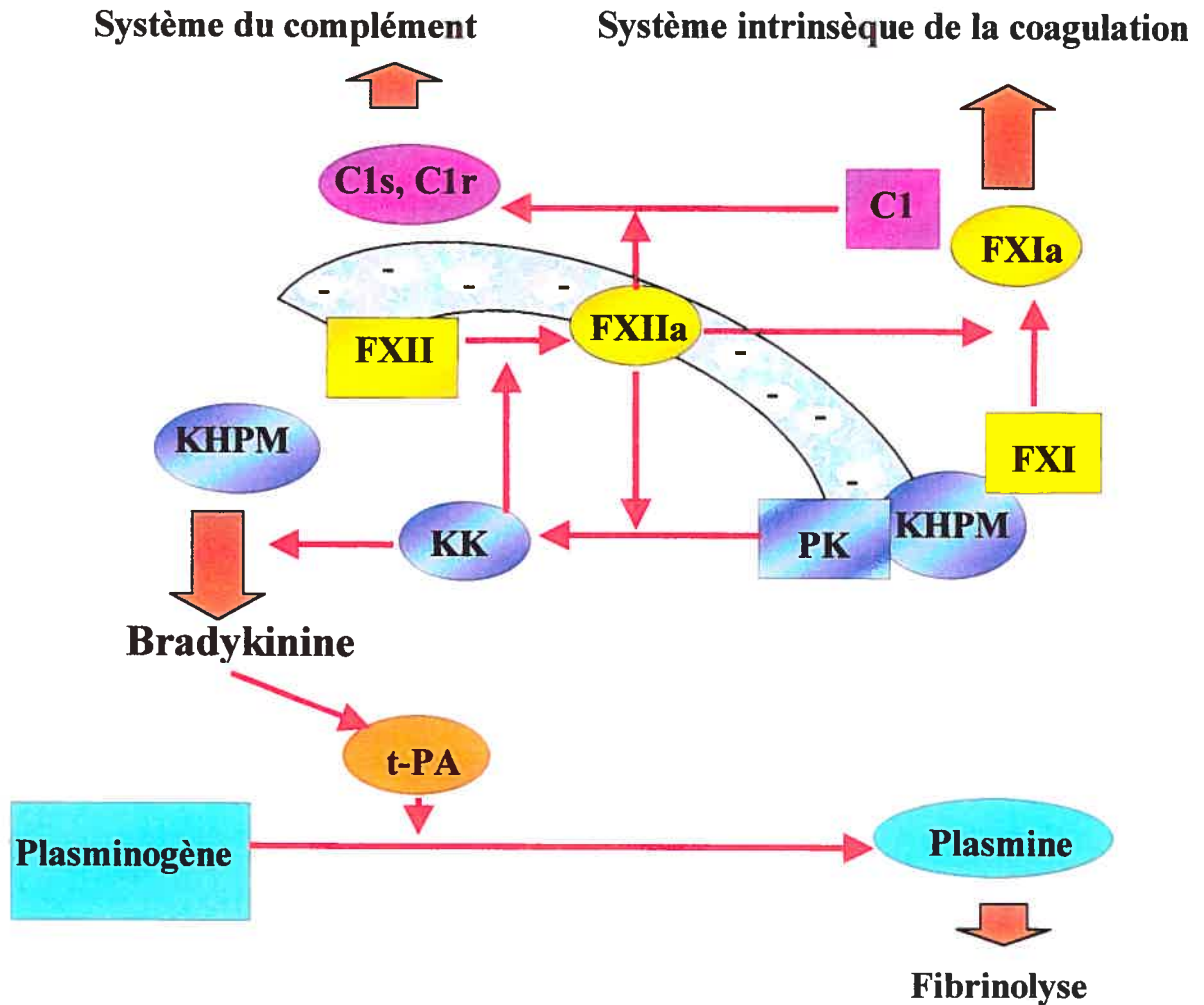


Figure 3. Le système de contact plasmatique et ses relations avec le système intrinsèque de la coagulation, le complément et la fibrinolyse. Le plasma est activé quand le FXII se lie à la surface chargée négativement et s'autoactive en FXIIa. Ce dernier hydrolyse la prékallicroïne plasmatique (PK) pour former la kallicroïne (KK). Cette dernière clive le KHPM pour libérer la BK. Le FXIIa peut activer le système intrinsèque de la coagulation par hydrolyse du FXI en FXIa et de plus, il peut activer le complément par l'activation de C1 en protéases C1r et C1s. La BK formée à partir du système de contact peut induire la libération de tPA qui active le plasminogène en plasmine et initie la fibrinolyse.

4.2 Le système fibrinolytique plasmatique

Des expériences préliminaires menées dans notre laboratoire suggèrent qu'il existe une autre voie de libération des kinines au niveau du plasma, soit la fibrinolyse. Le constituant central du système fibrinolytique est le plasminogène. Cette proenzyme inactive, synthétisée par le foie est présente dans le plasma sous forme de Glu-plasminogène. Le plasminogène est constitué de 791 acides aminés et est organisé en 7 domaines structuraux (Collen, 1999).

La cascade fibrinolytique est régulée par des activateurs ainsi que des inhibiteurs. Parmi les activateurs du plasminogène, on distingue ceux de nature endogène : le tPA et l'urokinase (uPA), ainsi que ceux d'origine exogène, dont la streptokinase. Le tPA est le principal activateur du plasminogène. Il active ce dernier par hydrolyse de la liaison Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² pour former la plasmine, responsable de la lyse du caillot de fibrine. La plasmine possède la capacité de cliver le KHPM pour libérer la BK, d'où sa propriété kininomatrice (Hill et al, 2000). De plus, Molinaro et collaborateurs ont démontré une libération du métabolite actif de la BK, la Des-Arg⁹-BK, au cours de la cascade fibrinolytique (Molinaro et al, 2002b).

La cascade de la fibrinolyse est régulée par des inhibiteurs des protéases à sérine. La plasmine est principalement inhibée par l' α_2 -antiplasmine. PAI-1 et PAI-2 sont les inhibiteurs du tPA (Collen, 1999). La figure 4 illustre la cascade fibrinolytique de façon globale.

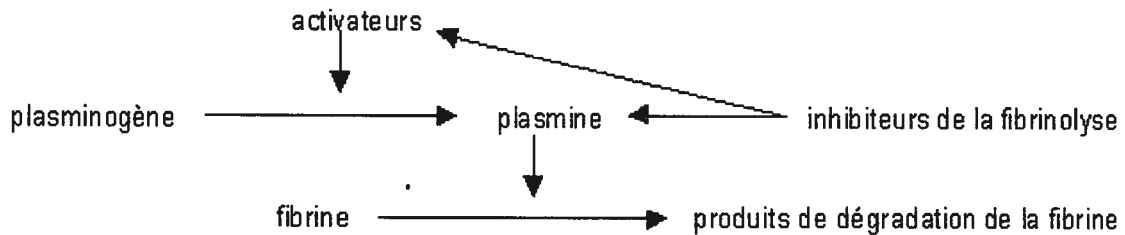


Figure 4. Cascade enzymatique de la fibrinolyse. Le précurseur de la plasmine, le plasminogène, est hydrolysé en plasmine par des activateurs. La plasmine exerce son action fibrinolytique en clivant la fibrine en produits de dégradation. Les activateurs du plasminogène et la plasmine sont régulés par des inhibiteurs.

5. Le métabolisme des kinines plasmatiques

L'activité biologique des kinines BK et Des-Arg⁹-BK dépend de leur formation, mais aussi de leur dégradation par différentes peptidases, habituellement nommées kininases (Erdös et al, 1963). Les travaux menés dans notre laboratoire nous ont permis de montrer que 5 peptidases sont principalement responsables du métabolisme de la BK. Ce sont la CPN, la CPM, l'ECA, l'EPN 24.11, et l'APP. Cependant, la nature de ces kininases et leur importance dans le métabolisme des kinines dépendent de différents facteurs, comme l'espèce animale, le milieu biologique, les conditions physiopathologiques et le modèle expérimental (Skidgel, 1992).

Ces enzymes font partie de la famille des métallopeptidases à zinc, puisqu'elles possèdent toutes un atome de Zn²⁺ au niveau de leur site actif, nécessaire à l'activité catalytique de l'enzyme (Erdös et Skidgel, 1997). Ce sont des glycoprotéines à chaîne unique liée à la membrane, sauf la CPN, glycoprotéine soluble, qui est constituée de 4 chaînes. Le plasma ne contient pas d'activité de l'EPN 24.11 et ce, contrairement aux cellules endothéliales et aux cardiomyocytes.

Les métallopeptidases impliquées dans le métabolisme plasmatique de la BK et de la Des-Arg⁹-BK sont illustrées à la figure 5.

5.1 Nature des enzymes impliquées dans le métabolisme de la BK et de la Des-Arg⁹-BK

5.1.1 La carboxypeptidase N (CPN)

Les carboxypeptidases sont divisées en 2 familles, soit les carboxypeptidases à sérine ainsi que les métallo-carboxypeptidases. La CPN, ou kininase I (EC 3.4.17.3) est une métallo-carboxypeptidase à zinc synthétisée par le foie et immédiatement relâchée dans la circulation, sans stockage. Apparemment, il n'existe aucun autre organe capable de synthétiser la CPN (Erdös, 1979).

La CPN est une enzyme tétramérique d'environ 280kDa, composée de deux sous-unités identiques de 83kDa qui sont hautement glycosylées et démunies d'activité enzymatique, ainsi que deux sous-unités identiques de 48 à 55kDa non-glycosylées, mais possédant un pouvoir catalytique (Levin et al, 1982). Les sous-unités sont unies par des liens non-covalents. Le gène qui code pour les sous-unités de 83kDa est localisé au locus 8p22-23 du chromosome 8 (Tan et al, 1990), alors que celui qui code pour les sous-unités de 48 à 55kDa est localisé au locus 10q23-25 du chromosome 10 (Gebhard et al, 1989).

La CPN hydrolyse une variété de protéines et peptides contenant une arginine ou une lysine à la partie carboxy-terminale (Skidgel, 1988). Ainsi, la CPN libère l'arginine en partie carboxy-terminale de la BK, formant la Des-Arg⁹-BK, son métabolite actif capable de stimuler les récepteurs B₁. Cette kininase I représente une voie métabolique mineure, sauf si l'ECA est inhibée (Blais et al, 1997).

5.1.2 La carboxypeptidase M (CPM)

La CPM, nommée aussi kininase I (EC 3.4.17.12) fait partie de la famille des métallo-carboxypeptidases. C'est une glycoprotéine à chaîne unique attachée fermement à la membrane cellulaire via un fragment de glycosylphosphatidylinositol (GPI). Sa masse moléculaire est d'environ 62kDa (Deddish et al, 1990). La CPM est retrouvée dans une

variété de cellules, notamment dans les poumons et le rein. La CPM origine du gène *CPM* situé au locus 12q15 du chromosome 12 (Kas et al, 1995). Des niveaux significatifs ont aussi été retrouvés dans les intestins, le cerveau et dans les nerfs périphériques (Skidgel et al, 1984).

Comme la CPN, la CPM clive préférentiellement les résidus arginine ou lysine en partie carboxy-terminale de la BK pour libérer le métabolite actif Des-Arg⁹-BK (Skidgel, 1988). Comme sa localisation est membranaire, la CPM métabolise la BK localement, en dehors de la circulation sanguine (Bhoola et al, 1992).

5.1.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA)

L'ECA, ou kininase II (EC 3.4.15.1; peptidyl-dipeptidase A), est une métallopeptidase à zinc. Son gène codant se situe au locus 17q23 du chromosome 17 (Rigat et al, 1990). L'ECA existe sous deux formes, l'ECA somatique d'une masse moléculaire de 140 à 170kDa pouvant varier quelque peu selon son niveau de glycosylation (Skidgel et Erdös, 1993) et l'ECA germinale de masse moléculaire égale à environ 90kDa, présente dans les cellules germinales des testicules (Hubert et al, 1991). L'ECA somatique est une glycoprotéine à chaîne unique composée d'environ 1278 acides aminés (Skidgel et Erdös, 1993). Elle est présente dans divers tissus et cellules, entre autres, dans l'endothélium vasculaire, les cellules musculaires lisses, les myocytes et les fibroblastes cardiaques, la bordure en brosse du tubule proximal rénal, ainsi que le cerveau (Erdös, 1990). Elle renferme deux domaines homologues contenant chacun un atome de Zn²⁺ au niveau du site actif, caractéristique essentielle à son activité catalytique. L'ECA métabolise plusieurs peptides, incluant l'angiotensine I (AI), la BK, la KD, la substance P et la neurotensine (Campbell, 2003).

L'ECA joue le rôle prépondérant dans la dégradation de la BK. Elle hydrolyse d'abord le lien Phe⁸-Arg⁹ pour former un métabolite inactif, la BK_[1-7], elle clive ensuite le lien Ser⁶-Pro⁷ pour produire la BK_[1-5], inactive elle aussi (Yang et al, 1970). De plus, elle

métabolise la Des-Arg⁹-BK en hydrolysant la séquence Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸ de la partie carboxy-terminale produisant le même métabolite inactif BK_[1-5] (Inokushi et Nagamatsu, 1981).

En plus d'être la voie majeure de dégradation de la BK, l'ECA est responsable de la formation d'angiotensine II (AII) à partir de l'AI, en clivant le lien His⁹-Leu¹⁰ de l'AI. L'AII possède des propriétés vasoconstrictrices, contrairement à la BK, qui est vasodilatatrice. L'ECA est considérée comme une kininase plutôt qu'une angiotensinase étant donné son affinité beaucoup plus élevée pour la BK ($K_m = 0,18\mu\text{M}$) que pour l'angiotensine I ($K_m = 16\mu\text{M}$) (Jaspard et Alhenc-Gelas, 1995).

5.1.4 L'endopeptidase neutre 24.11 (EPN 24.11)

L'EPN 24.11 (EC 3.4.24.11) est une métallopeptidase à zinc contenant un seul site actif (Erdös et Skidgel, 1997). Cette glycoprotéine à chaîne unique est localisée dans de nombreux tissus, sauf dans les cellules endothéliales vasculaires où son niveau d'expression est très bas (Johnson et al, 1985). On la retrouve principalement dans les cellules épithéliales, le placenta et les intestins. L'EPN 24.11 origine du gène *NEP* localisé au locus 3q21-27 du chromosome 3 (Barker et al, 1989)

Comme l'ECA, l'EPN 24.11 inactive la BK en clivant le lien Pro⁷-Phe⁸ pour générer la BK_[1-7]. Par contre, elle diffère de l'ECA pour le métabolisme de la Des-Arg⁹-BK. En effet, l'EPN 24.11 clive le lien Gly⁴-Phe⁵ de la Des-Arg⁹-BK pour générer deux peptides inactifs, Arg¹-Pro²-Pro³-Gly⁴ et Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸ (Gafford et al, 1983).

L'EPN 24.11 participe aussi à l'hydrolyse d'autres peptides, comme l'enképhaline, la substance P, la neurotensine, ainsi que les peptides natriurétiques sécrétés par les oreillettes (ANP, Atrial Natriuretic Peptide) et les ventricules du cœur (BNP, Brain Natriuretic Peptide) (Erdös et Skidgel, 1989).

5.1.5 L'aminopeptidase P (APP)

L'APP (X-prolyl aminopeptidase, EC 3.4.11.9) existe sous 2 formes, soit la forme membranaire et celle cytosolique. Le gène codant pour l'APP cytosolique (APP_c) est *XPNPEP1* sous-localisé au locus 10pter-q23.33 du chromosome 10 (Sprinkle et al, 2000). L'APP membranaire (APP_m) origine du gène *XPNPEP2* situé au locus Xq26.1 du chromosome X (Sprinkle et al, 1998). L'APP_m est caractérisée par la présence de séquences hydrophobes, incluant un peptide signal N-terminal et un fragment GPI en C-terminal qui lie l'enzyme à la membrane. La masse moléculaire de l'APP est d'environ 220 à 360kDa (Nielsen et al, 1997). On la retrouve dans une variété de cellules, notamment sur la surface des cellules endothéliales vasculaires, au niveau des cellules lymphoïdes, sur la bordure en brosse de la membrane des intestins et des reins et aussi au niveau du poumon (Erdös et Skidgel, 1997). L'activité plasmatique est due à l'APP_m puisque celle-ci est localisée sur la surface membranaire des cellules endothéliales vasculaires (Ryan et al, 1996). La forme soluble de l'APP_m est probablement produite par protéolyse du fragment GPI qui lie l'enzyme à la membrane cellulaire (Turner et al, 1997).

Plusieurs fonctions physiologiques ont été proposées à l'APP, incluant les rôles dans le métabolisme de peptides régulateurs de la pression artérielle et de la réponse inflammatoire suite à une infection. Plus précisément, l'APP a un rôle physiologique en tant que kininase. En effet, l'APP clive très spécifiquement les peptides ayant une proline en deuxième position amino-terminale, elle devient donc la deuxième enzyme en importance dans le métabolisme de la BK, puisque celle-ci possède une proline en position 2. Ainsi, l'APP libère l'arginine à la partie amino-terminale formant un métabolite inactif, la BK_[2-9]. Elle est aussi impliquée dans le métabolisme de la Des-Arg⁹-BK, elle en est même la principale voie métabolique, produisant le peptide inactif BK_[2-8] (Cyr et al, 2001).

L'intérêt de la communauté scientifique à l'égard de l'APP est en constante croissance. Plusieurs études ont été consacrées aux rôles de cette métallopeptidase dans certaines pathologies. Comme elle est impliquée dans le processus inflammatoire, son rôle dans le métabolisme des kinines vasodilatatrices, en particulier celui de la Des-Arg⁹-BK a

été récemment étudié. Ses implications dans les effets secondaires d'une classe de médicaments largement utilisés, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (iECA) ont été aussi analysées. L'angiooedème (AO) fait partie de ces effets secondaires et il est d'un intérêt très particulier.

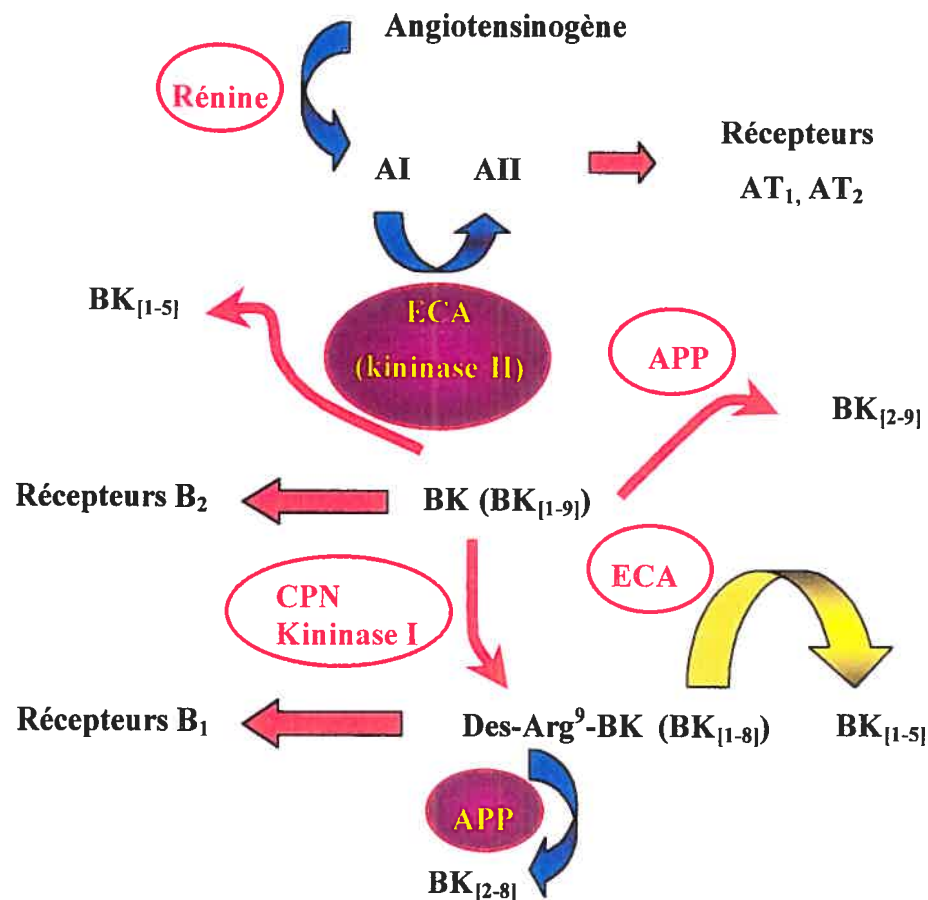


Figure 5. Métabolisme de la BK et de la Des-Arg⁹-BK par les principales métallopeptidases plasmatiques. La BK est métabolisée par 3 enzymes dans le plasma. Elle est transformée en Des-Arg⁹-BK, son métabolite actif, par la CPN. L'ECA et l'APP hydrolysent la BK en peptides inactifs. L'ECA est aussi impliquée dans le système rénine-angiotensine en activant l'AI en AII. La Des-Arg⁹-BK, à son tour, est métabolisée par l'APP et l'ECA en peptides inactifs.

5.2 Importance des différentes métallopeptidases dans le métabolisme plasmatique de la BK et de la Des-Arg⁹-BK

Les différentes enzymes impliquées dans le métabolisme plasmatique de la BK et de la Des-Arg⁹-BK n'agissent pas à part égale. La figure 6 illustre la contribution relative de chaque enzyme impliquée dans le métabolisme de la BK et son métabolite actif, dans le plasma humain. L'ECA est l'enzyme la plus importante dans la dégradation de la BK, elle compte pour près de 75% du métabolisme total. L'APP vient en deuxième position, avec près de 21,5% de l'activité kininasique totale. La CPN est une voie métabolique mineure, elle ne compte que pour 3,5%, sauf si l'ECA est inhibée. La Des-Arg⁹-BK pour sa part, est principalement métabolisée par l'APP (65%) et l'ECA est la voie métabolique secondaire (35%) (Décarie et al, 1996).

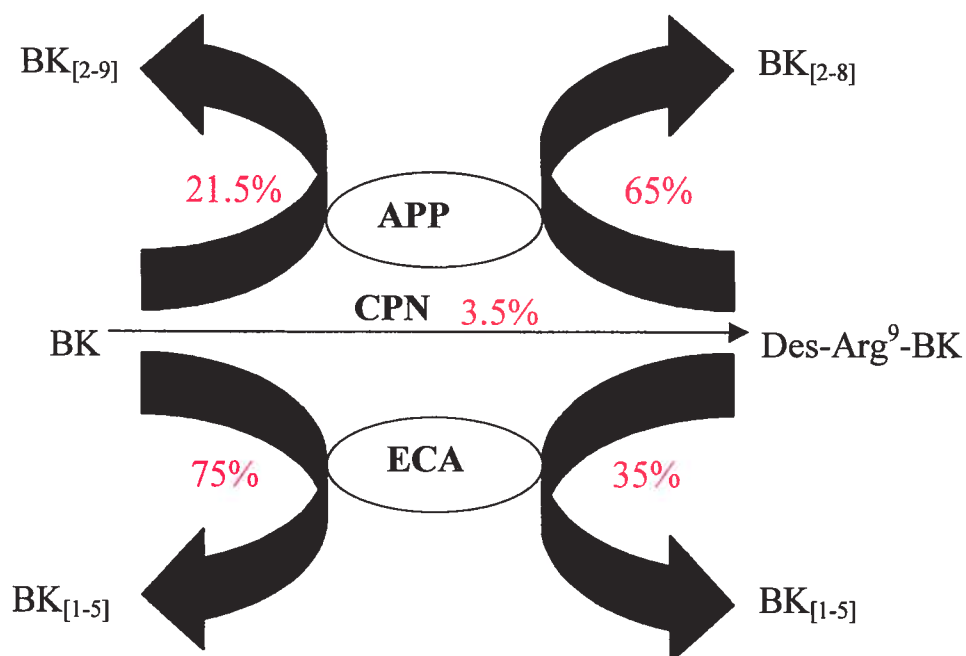


Figure 6. Contribution relative des principales métallopeptidases plasmatiques impliquées dans le métabolisme de la BK et de la Des-Arg⁹-BK.

6. Les récepteurs des kinines

Les effets pharmacologiques des kinines passent par l'activation de récepteurs hautement spécifiques. Vers la fin des années 1970, l'existence de 2 types de récepteurs stimulés par la séquence de la BK fut proposée, soit le récepteur de type B₁ et celui de type B₂ (Regoli et Barabé, 1980). Ces récepteurs sont localisés dans différents tissus et cellules, entre autres, dans le système cardiovasculaire, le tractus urinaire et intestinal. Ils sont présents à la fois sur les cellules endothéliales et musculaires lisses, ainsi que sur les fibroblastes (Marceau, 1995). Les deux sous-types de récepteurs ont été définis selon leur propriétés pharmacologiques. Le récepteur B₂ est préférentiellement stimulé par la séquence complète de la BK et la KD, alors que les métabolites tronqués pour l'arginine en C-terminal, la Des-Arg⁹-BK et la Des-Arg¹⁰-KD activent les récepteurs de type B₁. Regoli et collaborateurs ont tout d'abord dressé une liste des principaux agonistes de chaque type de récepteur, selon leur affinité, chez le lapin. Pour le récepteur B₁; Des-Arg¹⁰-KD > Des-Arg⁹-BK > KD > BK. Pour le récepteur B₂; BK = KD > Des-Arg¹⁰-KD > Des-Arg⁹-BK (Regoli et al, 1990). Selon certains auteurs, la Des-Arg¹⁰-KD serait aussi le principal agoniste du récepteur B₁ chez l'homme, bien avant la Des-Arg⁹-BK (Marceau et Regoli, 1991; Drapeau et al, 1991). En effet, la Des-Arg⁹-BK est environ 2000 fois moins efficace que la Des-Arg¹⁰-KD à compétitionner avec la [³H]-Des-Arg¹⁰-KD dans un essai de liaison compétitive (Drapeau et al, 1991).

Les récepteurs de type B₁ et B₂ ont une homologie de 35% chez l'Homme. De plus, ils partagent certaines caractéristiques; ils sont tous deux localisés à la surface cellulaire et sont constitués de 7 passages transmembranaires couplés aux protéines G_{αq} insensibles à la toxine pertussique (Gutowski et al, 1991).

La liaison de la kinine à son récepteur déclenche une cascade d'évènements intracellulaires illustrés à la figure 7, soit l'activation de la phospholipase C-β (PLC-β) responsable de l'hydrolyse du phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP₃) (Regoli et al, 1990; Huang et al, 1991). Ce dernier

provoque une augmentation du taux de Ca^{2+} intracellulaire, qui à son tour, active la phospholipase A_2 (PLA_2) et initie la formation de monoxyde d'azote (NO) via la NO synthase (NOs) dépendante de la voie calcium-calmoduline. Ces molécules sont responsables des effets pharmacologiques vasodilatateurs, anti-prolifératifs et anti-ischémiques via la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMP_c) et de guanosine monophosphate cyclique (GMP_c) qui agissent sur les cellules musculaires lisses. (Regoli et al, 1990).

L'activation du récepteur B_2 est à l'origine des symptômes de l'inflammation, tels que l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la vasodilatation, l'œdème, la douleur et la libération de médiateurs proinflammatoires, comme les prostaglandines (Marceau, 1995). Ce type de récepteur étant constitutif dans la plupart des cellules et tissus, la réponse suite à sa stimulation est très puissante, mais de courte durée puisqu'il subit une désensibilisation via une séquestration et une internalisation suite à une stimulation agoniste (Faussner et al, 1999). En effet, la BK active une voie Janus kinase/STAT (JAK/STAT) associée à un mécanisme d'internalisation via des radeaux lipidiques. Cette activation implique la phosphorylation de tyrosines sur Tyk2 de la famille JAK, ainsi que sur STAT3. Suite à la stimulation par la BK, le récepteur B_2 et STAT3 subissent une translocation et une internalisation via des radeaux lipidiques (Ju et al, 2000). De plus, ce type de récepteur est totalement recyclé à la surface membranaire. Étant donné sa rapide désensibilisation, le récepteur B_2 est impliqué dans les réponses inflammatoires et algésiques à court terme (Faussner et al, 1999).

Pour sa part, le récepteur B_1 est inductible et ne subit aucune internalisation et peu ou pas de désensibilisation. Il montre quand même une certaine rotation avec une demi-vie mesurable. Par contre, il n'est pas exprimé à la surface des cellules en situation normale. L'expression de ce récepteur est régulée surtout par des facteurs de croissance, des cytokines comme l'IL- 1β , l'IL-2 et l'IL-8 ou des lipopolysaccharides bactériens, souvent en condition pathologique inflammatoire (Ni et al, 1998). Étant donné que ce type de

récepteur subit peu de désensibilisation, il est impliqué dans les réponses inflammatoires et algésiques à long terme (Faussner et al, 1999).

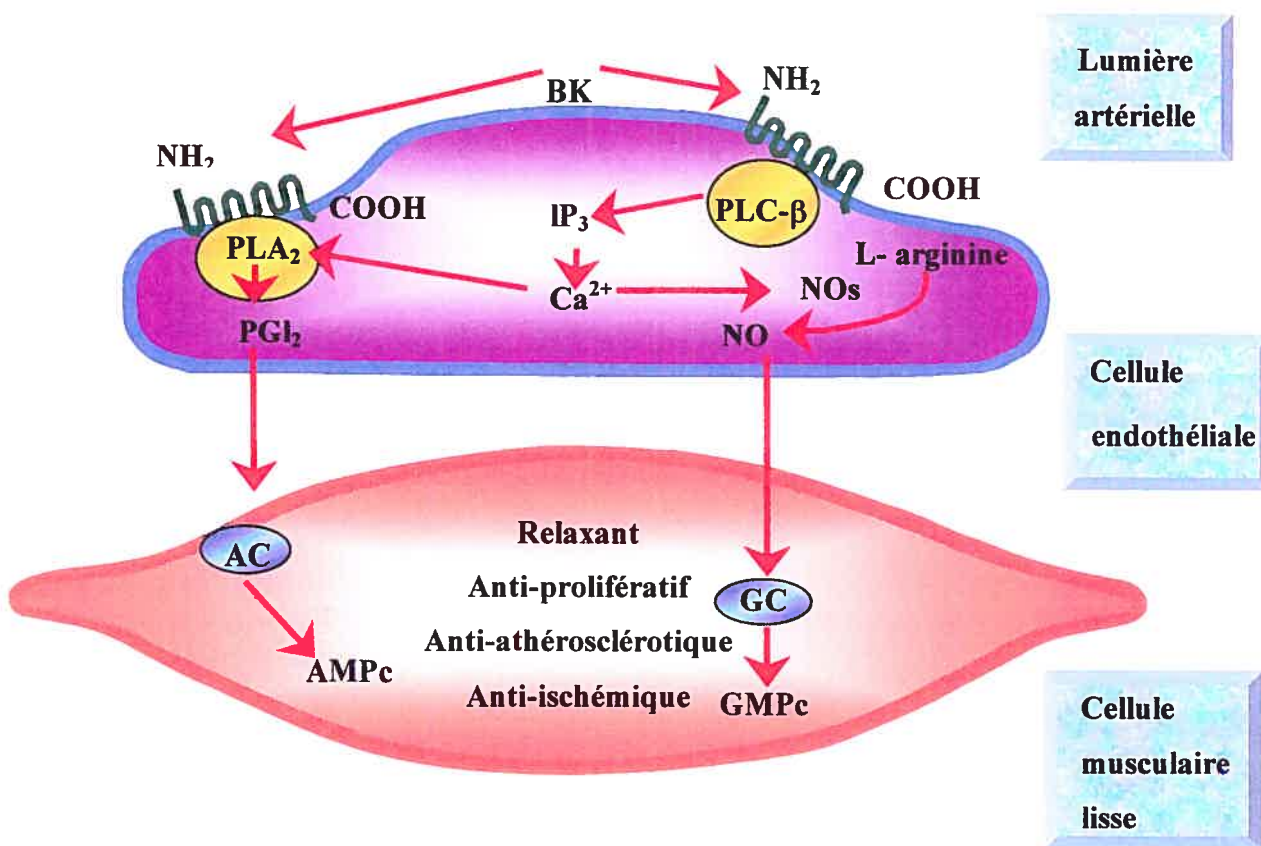


Figure 7. Le récepteur B₂ de la BK. Les voies de la PLC-β et de la PLA₂ aboutissent à la formation d'AMP_c et de GMP_c qui agissent sur les cellules musculaires lisses vasculaires par des effets relaxants, des effets anti-prolifératifs, anti-athérosclérotiques et anti-ischémiques.

7. Le complément plasmatique

Le complément ne fait pas partie intégrante de notre travail, mais son introduction brève rendra la dernière partie plus compréhensible.

Le complément est l'effecteur majeur de la branche cellulaire du système immunitaire (Goldsby et al, 2000). Il a pour fonctions la lyse des cellules, bactéries et virus et l'épuration immunitaire. L'activation du complément implique trois voies métaboliques principales : la classique, l'alterne et la voie des lectines. La cascade impliquant les trois voies est illustrée à la figure 8.

L'activation de la voie classique débute habituellement par la formation de complexes immuns. La protéine précurseur C1 est composée des sous-unités C1q, C1s et C1r. Lorsqu'il y a activation par un complexe immun, la déformation de C1q entraîne l'autoactivation de C1s et C1r. La sous-unité C1s activée initie une cascade ayant pour conséquence la formation d'un complexe d'attaque membranaire (CAM) et la relâche des anaphylatoxines C3a, C4a et C5a. Ces anaphylatoxines sont des peptides médiateurs de l'inflammation (Pixley et Colman, 1997). Elles se lient aux récepteurs des mastocytes et des basophiles du sang et induisent leur dégranulation avec libération d'histamine et autres médiateurs pharmacologiquement actifs. De plus, les anaphylatoxines provoquent la contraction des muscles lisses et augmentent la perméabilité vasculaire (Goldsby et al, 2000).

Au milieu des années 1950, Lepow et collaborateurs ont décrit la purification et la caractérisation du composant C1 du complément, ainsi que ses sous-composants : C1q, C1r et C1s. Ces études ont permis d'isoler et de décrire C1INH (Lepow et al, 1956). Cette glycoprotéine inhibe l'activité de C1. C1INH forme un complexe avec les protéases C1r et C1s, obligeant ces dernières à se dissocier de C1q, prévenant ainsi les coupures de C4 et de C2 dans la constitution de la C3 convertase.

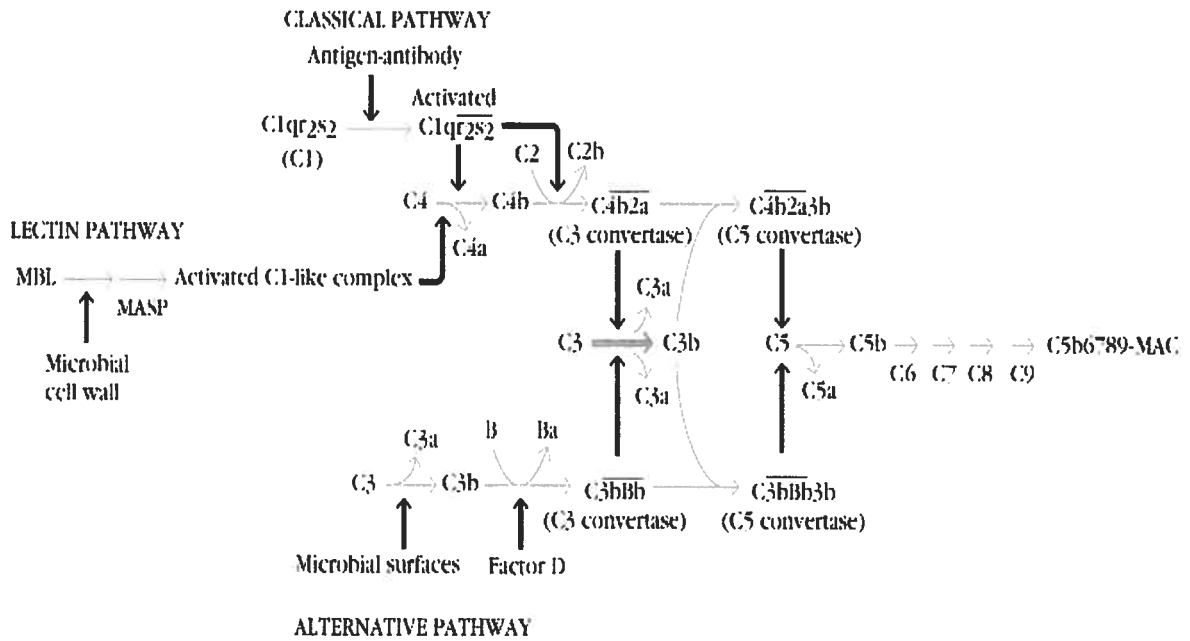


Figure 8. Vue d'ensemble des voies d'activation du complément. La voie classique est initiée par la liaison du C1 aux complexes immuns. La voie alterne est initiée par la liaison du C3b aux surfaces activatrices, telles que les parois cellulaires microbiennes. La voie des lectines est initiée par la liaison de la protéine sérique MBL (Mannose Binding Lectin) à la surface d'un pathogène. Ces voies génèrent toutes les C3 et C5 convertases et C5b, premier constituant du CAM (Goldsby et al, 2000).

II Le syndrome d'embolie par liquide amniotique

Le syndrome d'embolie par liquide amniotique est une complication complexe de la grossesse. Il est caractérisé par une hypotension sévère et une hypoxie, souvent suivies d'un arrêt cardiorespiratoire et d'un choc hémorragique si la patiente survit à l'arrêt cardiaque (Clark et al, 1995). Son incidence varie de 1/8000 à 1/80000 grossesses et le taux de mortalité associé est plus de 90% (Cunningham et al, 2001). La symptomatologie est initiée par une perte de la barrière physiologique qui existe entre les compartiments maternels et

foetaux. Il s'ensuit un contact direct entre le liquide amniotique et la circulation sanguine maternelle (Clark et al, 1986). En effet, des trophoblastes d'origine foetaux ont été retrouvés dans le sang maternel (Clark et al, 1995). Le contact peut survenir suivant l'amniocentèse, pendant l'accouchement où de petites lacérations peuvent se développer dans l'utérus ou, pendant l'accouchement par césarienne qui offre une opportunité unique pour l'exposition des tissus foetaux au sang maternel (Cunningham et al, 2001). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer la physiopathologie de ce syndrome, dont la symptomatologie a été rapprochée de celle de la réaction anaphylactoïde (Clark et al, 1995; Locksmith, 1999; Cunningham et al, 2001). Plusieurs médiateurs ont été évoqués. Bien qu'aucun rôle n'ait été attribué aux kinines, celles-ci pourraient être responsables de l'hypotension accompagnant le syndrome d'embolie par liquide amniotique.

III L'angioedème

1. Définition

La première description de l'AO fut effectuée en 1876 par John Laws Milton qui utilisa le terme «urticaire géant» pour décrire les lésions oedémateuses aiguës et de courte durée affectant le derme et l'espace sous-cutané (Milton, 1876). En 1888, Sir William Osler distingua une forme héréditaire de l'AO qu'il nomma œdème angioneurotique (Osler, 1888). Il fut le premier à décrire les caractéristiques cliniques.

L'AO se développe comme un œdème en absence de tout phénomène allergique, avec un gonflement des couches profondes de la peau et/ou des tissus sous-muqueux. Il est caractérisé par une perte locale de la barrière endothéliale au niveau des veinules post-capillaires suivie d'une augmentation de la perméabilité vasculaire (Davis, 2003). La plupart du temps, le visage, les mains et les pieds sont les plus affectés. L'AO représente un danger pour la vie si sa localisation implique les voies respiratoires supérieures,

principalement le larynx. Il peut aussi s'exprimer dans la voie gastrointestinale et génitale. L'AO peut être causé par certains facteurs déclenchants, comme un traumatisme post-opératoire, un stress émotionnel, une maladie infectieuse ou par l'inflammation.

2. Classification

Il existe principalement 2 formes d'AO : l'angiooedème héréditaire (AOH) et l'angiooedème acquis (AOA) (Cugno et al, 2003; Binkley et Davis, 2003).

2.1 L'angiooedème héréditaire

2.1.1 Définition

L'AOH est une maladie génétique à transmission autosomale dominante à forme hétérozygote exclusive. La lésion dérive d'une altération du gène codant pour C1INH (Davis, 2003). À ce jour, aucun individu ayant un déficit homozygote complet en C1INH n'a été observé. L'exploration biologique montre une faible activité de C1INH et de faibles concentrations de C4 et C1q. Dans 85% des cas, le déficit est dû à une diminution de l'expression de C1INH plasmatique (AOH type I, quantitatif). Les mutations qui causent l'AOH de type I passent de délétions et insertions de gros fragments par recombinaison dépendante des séquences Alu à des mutations faux-sens ou non-sens ou de courtes délétions/insertions qui ont pour conséquence la génération de codons stop prématurés (Davis et Tosi, 2002). Dans 15% des cas, les mutations provoquent une expression dysfonctionnelle de la glycoprotéine C1INH (AOH type II, qualitatif) (Davis, 2003). La plupart du temps, il s'agit d'une substitution d'un résidu stratégique dans la structure fonctionnelle qui a pour conséquence la variation du centre réactif de C1INH qui le rend dysfonctionnel.

Globalement, les crises d'AOH sont initiées par l'activation du complément, du système de contact et du système fibrinolytique simultanément. Ces activations spontanées

sont associées à un défaut quantitatif du contrôle par C1INH, qui en général, se situe en dessous de 30% de la normale (Davis, 2003). L'activation de ces différents systèmes est plus apparente durant les attaques d'AOH, mais elle peut aussi apparaître à différentes périodes asymptomatiques.

L'activation du complément est objectivée par les niveaux faibles de C4 et C2, les substrats naturels de C1s. De plus, des complexes circulants associant C1r ou C1s avec C1INH peuvent être observés, notamment durant les attaques d'AO. L'activation du système de contact peut également être observé. La preuve la plus fréquente est la mise en évidence de l'hydrolyse du KHPM (Cugno et al, 1997).

2.1.2 Modèles expérimentaux du déficit en C1INH

Alvin Davis III a élaboré en 2003, des modèles de souris invalidées pour C1INH afin d'analyser les principaux médiateurs de l'AO. Il développa 3 modèles, C1INH $-/-$, C1INH $-/+$ et C1INH $+/+$. Il observa des concentrations normales de C1INH chez la souris C1INH $+/+$, faibles, soit en-deçà de 50% de la normale chez la souris C1INH $-/+$ et nulles chez la souris C1INH $-/-$. Il remarqua que la perméabilité vasculaire suite à un stimulus inflammatoire est augmentée chez les souris déficientes et la situation est rétablie lorsqu'un traitement au C1INH est administré. De plus, la perméabilité vasculaire revient à la normale lorsqu'un antagoniste des récepteurs B_2 est administré, apportant l'évidence que la BK est bel et bien un médiateur de l'AO. Les phénotypes C1INH $-/+$ et C1INH $-/-$ sont virtuellement identiques, supposant qu'un déficit partiel est critique et qu'il n'y a pas d'effets additionnels en présence d'un déficit complet (Davis, 2003).

2.2 L'angioedème acquis

2.2.1 Définition

Les manifestations cliniques de l'AOA s'apparentent habituellement à celles de l'AOH, excepté que l'AOA n'est pas une forme transmise. La caractéristique principale de

la déplétion en C1INH impliquée dans l'AOA est l'élévation de la consommation du C1INH, contrairement à l'AOH, où la déplétion est d'origine génétique. On y retrouve aussi une hyperactivation de la voie classique du complément (Melamed et al, 1986).

L'AOA est retrouvé sous trois formes. Le premier type est caractérisé par un désordre lymphoprolifératif associé à une consommation du C1INH (Kaplan, 2001). Les cellules B sont très souvent les cibles.

La deuxième forme d'AOA est représentée par un désordre autoimmun. La déplétion du C1INH dans ce type d'AO est causée par des anticorps dirigés contre C1INH lui-même (Kaplan, 2001).

La troisième forme d'AOA est de type médicamenteux. Ce type d'AO peut être associé à l'utilisation d'oestrogènes, soit pour la contraception, soit comme substitution hormonale (Binkley et Davis, 2000). Elle peut aussi être déclenchée par l'utilisation de certains médicaments anti-hypertenseurs, comme les traitements aux iECA, aux inhibiteurs des vasopeptidases (iVP) et aux antagonistes des récepteurs à l'angiotensine (ARA) (Sigler et al, 1997).

2.2.2 L'angiooedème acquis lié à la prise d'oestrogènes

Les épisodes d'AOA lié à la prise d'oestrogènes sont cliniquement semblables à ceux de l'AOH. Ces épisodes apparaissent lors d'une grossesse ou lors d'usage d'oestrogènes exogènes (Binkley et Davis, 2000). En effet, les patientes qui développent un AO de ce type sont asymptomatiques en dehors de ces conditions hormonales.

La découverte d'une famille dont certains des membres féminins ont développé des AO, mais seulement en présence de fortes concentrations d'oestrogènes, a apporté une opportunité unique pour étudier les effets de cette hormone sur le développement d'AO (Binkley et Davis, 2000). Ces femmes appartenaient à trois générations et présentaient des symptômes identiques à ceux de l'AOH qui ne se présentaient qu'uniquement lors des grossesses, lors d'usage de contraceptifs oraux ou l'usage d'oestrogènes dans une thérapie de remplacement hormonal. Chez les femmes enceintes, les symptômes apparaissaient entre

14 et 21 jours après la conception et se prolongeaient jusqu'à l'accouchement. Par contre, aucune patiente ne développa d'AO durant la période post-partum. Chez les femmes en thérapie hormonale, les symptômes apparaissaient entre 7 et 14 jours suivant l'initiation de la thérapie. Les niveaux de C1INH et C4, ainsi que la fonction de C1INH ont été analysés chez ces femmes durant les périodes asymptomatiques. Les concentrations de C4 étaient normales, ainsi que la fonction et les niveaux de la protéine C1INH (Binkley et Davis, 2000).

Bien que la nature exacte de l'anomalie ne soit pas connue, quelques hypothèses ont été soulevées. Les hormones sexuelles, comme les oestrogènes et les androgènes, ont une influence sur la concentration de C1INH, du FXII (Binkley et Davis, 2000), ainsi que sur celle de la prékallitréine plasmatique (Fossum et al, 1994). Ces deux hormones ont un effet opposé sur les concentrations de la protéine C1INH. En effet, les androgènes augmentent les niveaux de C1INH, réduisent les attaques d'AO et constituent une thérapie pour les patients; le Danatrol[®] en est un exemple. Cette molécule est un stéroïde de synthèse qui inhibe l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, ainsi que la synthèse et libération des gonadotrophines hypophysaires. Le Danazol est le nom générique de la molécule. Il est commercialisé par Sanofi Aventis sous le nom de Danatrol[®] en Europe. Au Canada, il porte le nom de Cyclomen[®]. Le Danazol est principalement utilisé pour traiter l'endométriose, la maladie fibrokystique du sein et l'AO. Son mécanisme d'action consiste à diminuer la production d'oestrogènes en inhibant 2 hormones hypophysaires : l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). Son action bénéfique dans le traitement de l'AO passe donc par la diminution de production d'oestrogènes et par l'augmentation de la concentration du C1INH plasmatique. Comme mentionné précédemment, les oestrogènes diminuent les concentrations de C1INH, augmentant ainsi la probabilité de survenue d'AO (Binkley et Davis, 2003). Chez les femmes saines, les niveaux de FXII augmentent en réponse à l'usage d'oestrogènes exogènes (Gordon et al, 1980). Le promoteur du gène codant pour le FXII contient un élément de réponse aux oestrogènes (ERO) (Farsetti et al, 1995). Une mutation activatrice de l'ERO pourrait causer

une énorme augmentation du FXII en réponse à de fortes concentrations d'œstrogènes (Binkley et Davis, 2000).

IV Kinines et angioedème

Certains médiateurs ont été rendus responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire associée à l'AO : entre autres, la BK et l'histamine. Par contre, cette dernière ne semble pas jouer un rôle primordial dans la pathogenèse de l'AO, puisque la plupart des patients ne se plaignent pas de prurit et l'administration d'antihistaminiques ne peut prévenir, ni améliorer les symptômes caractéristiques (Cugno et al, 2003).

La pathogenèse de l'AOH suggère donc une libération de kinines, en particulier la BK et son métabolite actif, la Des-Arg⁹-BK. L'activation du système de contact au cours de crises aiguës et la génération de plusieurs protéases pourraient prendre part au mécanisme de l'œdème. En effet, il a été observé une activation du FXII et de la kallibréine plasmatique ainsi qu'une consommation de la prékallibréine et du KHPM, ce qui a pour conséquence la génération de BK, médiateur de l'œdème (Nielsen et al, 1996). D'ailleurs, Nussberger et collaborateurs ont démontré en 1998 que les concentrations de BK sont plus élevées lors de crises d'AOH (Nussberger et al, 1998). Si C1INH est absent (AOH type I) ou dysfonctionnel (AOH type II), le résultat se traduit par un contrôle insuffisant des formes activées du FXII, de la kallibréine plasmatique et des protéases C1r et C1s. Sous ces conditions, la production de BK est augmentée (Binkley et Davis, 2003). Une étude effectuée *in vivo* sur des souris invalidées pour C1INH a montré une augmentation considérable de la perméabilité vasculaire, laquelle est prévenue par un traitement préventif avec un antagoniste des récepteurs B₂ (Cugno et al, 2003). De plus, Alvin Davis III a démontré, en 2003, que l'augmentation de la perméabilité vasculaire chez la souris invalidée pour C1INH est renversée par un traitement avec le C1INH lui-même, avec un inhibiteur de la kallibréine plasmatique, le DX88, ou avec un antagoniste des récepteurs B₂,

le Hoe140. De plus, les souris invalidées à la fois pour C1INH et pour les récepteurs de type B₂, ne développent pas d'augmentation de perméabilité vasculaire. Ces analyses apportent l'évidence du rôle joué par la BK dans la pathogenèse de l'AOH (Davis, 2003). En somme, l'augmentation de la perméabilité vasculaire présente dans l'AOH est probablement due au contrôle insuffisant du système de contact qui provoque une production exagérée de BK.

Les iECA représentent une classe de médicaments utilisés par plus de 40 millions de patients au monde pour le traitement des maladies cardiovasculaires, comme l'hypertension (Brown et Vaughan, 1998). L'AO est un effet secondaire associé aux traitements par les iECA. Les symptômes cliniques de cet AO ont été attribués à des concentrations très élevées de BK et de Des-Arg⁹-BK. En effet, une augmentation des niveaux de BK a été mesurée dans le plasma de patients lors d'épisodes d'AO sur iECA. Mais, contrairement aux formes héréditaires de l'AO, il n'a été enregistré aucune augmentation d'hydrolyse du précurseur de la BK, le KHPM (Nussberger et al, 1998; Cugno et al, 2003). Ceci apporte l'évidence que la diminution du catabolisme de la BK joue un rôle plus important dans l'AO sur iECA que l'augmentation de production de BK. Par ailleurs, Blais et collaborateurs ont démontré que la moitié des cas d'AO sur iECA possédaient un défaut enzymatique relié au métabolisme de la Des-Arg⁹-BK (Blais et al, 1999b). Il a aussi été démontré que l'activité de l'APP est significativement plus faible chez les patients avec des antécédents d'AO sur iECA, ce qui est associé à une diminution significative de la dégradation *in vitro* de la Des-Arg⁹-BK (Adam et al, 2002; Molinaro et al, 2002a). Une forte accumulation de Des-Arg⁹-BK a des effets proinflammatoires *in vivo* (Blais et al, 1997; Blais et al, 1999a). Une étude récente a dévoilé que les patients traités avec des iECA ayant reçu des injections d'Apstatin, un inhibiteur de l'APP, ont développé des inflammations locales. En effet, en présence d'iECA, l'inhibition *in vivo* de l'APP potentialise les effets proinflammatoires de la BK (Kim et al, 2000). En somme, comme l'APP joue un rôle majeur dans le catabolisme de la BK quand l'ECA est inhibée, les

individus ayant une faible activité d'APP sont beaucoup plus prédisposés à développer des effets secondaires, comme l'AO, suite à une thérapie par des iECA.

Une étude récente en génétique a identifié un génotype qui prédit l'activité de l'APP circulante. Les auteurs ont montré que le gène *XPNPEP2*, qui code pour l'APP_m est impliqué de façon majeure dans le contrôle de l'activité de l'APP (Duan et al, 2004). Un polymorphisme impliquant la substitution d'un nucléotide à la position -2399 (C-2399A SNP) a été identifié. Le génotype C-2399A est associé de façon significative avec une diminution de l'activité de l'APP. En effet, l'analyse par régression linéaire a démontré que le génotype C-2399A explique 41% de la variabilité chez la population contrôle. Les séquences variantes dans le gène *XPNPEP2* sont associées avec une activité réduite de l'APP et peuvent être de puissantes prédictrices de l'AO associé aux iECA (Duan et al, 2004). Ainsi, il y a une association significative entre ces variances génétiques et l'activité de l'APP circulante et conséquemment, le polymorphisme identifié peut prédire la susceptibilité des individus à développer des effets secondaires, comme l'AO suite à une thérapie par les iECA.

BUTS DU TRAVAIL

Le but de notre travail de maîtrise se situe dans la droite ligne des travaux de recherche menés depuis plusieurs années dans notre laboratoire d'accueil : tenter d'approcher le rôle du système kalicréines-kininogènes-kinines et en particulier celui de la BK et de son métabolite actif, la Des-Arg⁹-BK en pathologie humaine.

En utilisant l'expertise et les méthodes analytiques disponibles, nous étudierons principalement trois problèmes :

1- Le pouvoir kininogène du plasma lors du syndrome d'embolie par liquide amniotique. Les kinines ont été suggérées comme médiateurs de cette complication de la grossesse associée à un taux de mortalité de plus de 90%. Cependant leur comportement au cours de ce syndrome n'a pas été défini. Nous aborderons ce problème chez une patiente, en étudiant le pouvoir kininogène du plasma pendant et après la phase aiguë de ce syndrome.

2- Le pouvoir kininogène de la fibrinolyse. Des observations de notre laboratoire montrent que, outre le système de contact, d'autres voies métaboliques dont la fibrinolyse sont capables de libérer les kinines à partir du KHPM. Dans un système *in vitro*, nous caractériserons le pouvoir kininogène de la plasmine.

3- Le métabolisme des kinines dans l'AOH de type I et II. L'AOH est dû à un déficit en C1INH transmis de façon héréditaire selon le mode autosomal dominant. Il est généralement admis que ce déficit conduit à une activation du système de contact lui-même responsable de la libération des kinines. Cependant, le métabolisme des kinines n'a pas été documenté. Une perturbation de ce métabolisme devrait en effet conduire à une accumulation des kinines et en particulier la Des-Arg⁹-BK. Nous étudierons donc le catabolisme de la BK exogène et celui de la Des-Arg⁹-BK chez des patients souffrant de ces 2 types d'AO. De plus, nous doserons l'activité des métallopeptidases plasmatiques responsables de ce métabolisme dans les échantillons de plasma des patients soumis ou non à la prophylaxie par Danatrol[®] (100 à 600mg/jour).

MÉTHODOLOGIE

1. Matériel et réactifs

La BK et la Des-Arg⁹-BK ont été achetées chez Peninsula Laboratories (Belmont, CA, USA). L'énalaprilat provient de Merck Frosst (Kirkland, QC, Canada). La L-arginine, la dansyl-Ala, l'o-phthaldialdéhyde, l'o-phénylènediamine, le Tween 20 et le peroxyde d'urée ont été obtenus chez Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). L'Arg-Pro-Pro et le Dansyl-Ala-Arg ont été achetés chez Bachem (Torrance, CA, USA). Le KHPM, la plasmine et la kallibréine plasmatique proviennent de Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN, USA). L'éthanol anhydre de grade HPLC a été obtenu chez American Chemicals (Montréal, QC, Canada). Les gels d'acrylamide 4-15%, la membrane de nitrocellulose ainsi que les anticorps de chèvre anti-IgGs de lapin couplés à la peroxydase de raifort (HRPO) ont été achetés chez BioRad (Hercules, CA, USA). L'eau purifiée déionisée provient de Les eaux Saint-Léger (Boucherville, QC, Canada). Le Chemi Glow a été obtenu chez Alpha Innotech (San Leandro, CA, USA). Les plaques de 96 puits ont été achetées chez Corning Incorporated (Corning, NY, USA). Tous les autres réactifs, sauf indication contraire, proviennent de Fisher Scientific (Montréal, QC, Canada).

2. Échantillons de plasma

2.1 Angiooedème héréditaire de type I et II

Les échantillons sanguins ont été prélevés chez des patients atteints d'angiooedème héréditaire de type I et II traités ou non par le Danatrol[®]. Ces échantillons anonymes nous ont été fournis par le Dr. Christian Drouet du CHU de Grenoble. Les patients ont fourni un consentement libre et éclairé.

Cinq ml de sang ont été prélevés par ponction veineuse au niveau de l'avant-bras et ont été recueillis dans des tubes Vacutainer[®] Becton-Dickinson (0,1mol/L de citrate de sodium). Après centrifugation (22°C, 15 minutes, 1250g), le plasma a été décanté et

conservé à -80°C dans des tubes de polypropylène jusqu'au moment des investigations biochimiques.

2.2 Syndrome d'embolie par liquide amniotique

Les échantillons sanguins ont été prélevés chez une patiente atteinte du syndrome d'embolie par liquide amniotique, par le Dr. Georges-Étienne Rivard à l'hôpital Ste-Justine de Montréal. Les 4 prélèvements de sang citratés (cf 2.1) ont été effectués à différents temps : immédiatement, 30 minutes, 2 et 9 jours après le choc. Les échantillons sont traités et conservés comme décrit ci-dessus au point 2.1. La patiente a par ailleurs fourni un consentement libre et éclairé.

3. Méthodes analytiques

3.1 Métabolisme des kinines exogènes

3.1.1 Incubation

Un volume de $495\mu\text{l}$ de plasma est incubé avec $5\mu\text{l}$ de BK exogène à une concentration finale de $48\mu\text{M}$ à 37°C avec agitation. Des aliquots de $50\mu\text{l}$ de plasma sont prélevés à différents intervalles de temps d'incubation, soit 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 9, 12 et 15 minutes. La réaction est arrêtée par l'ajout d'éthanol anhydre froid à une concentration finale de 80% v/v. Les échantillons sont incubés à 4°C pour au moins 15 minutes afin d'assurer la précipitation complète des protéines, dont les kininogènes, puis centrifugés (4°C , 15 minutes, 1750g). Le surnageant éthanolique est décanté et évaporé à sec dans un Speed Vac (Savant, Farmingdale, NY, USA). Les culots sont conservés à -80°C jusqu'au dosage des kinines. Cette méthodologie a été développée et validée précédemment (Cyr et al, 2001).

3.1.2 Dosage des kinines

Les culots des extraits éthanoliques évaporés sont remis en solution dans un tampon d'incubation (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, Tween 20 0,05% v/v, pH 7,4). Les kinines BK et Des-Arg⁹-BK sont dosées en utilisant deux immunoessais enzymatiques compétitifs précédemment décrits (Décarie et al, 1994; Raymond et al, 1995). À cette fin, des IgGs polyclonales de lapin hautement spécifiques dirigées contre la partie carboxy-terminale de la BK ou de la Des-Arg⁹-BK sont utilisées. Le traceur consiste en la BK ou la Des-Arg⁹-BK couplée en partie amino-terminale à la digoxigenin-3-0-methylcarboxyl-ε-aminocaproic-acid-N-hydroxysuccinimide ester (DIG-OSu). Des plaques de 96 puits sont recouvertes pendant toute une nuit à 4°C, d'IgGs anti-BK ou anti-Des-Arg⁹-BK (100ng/puits) dans un tampon de fixation (bicarbonate 100mM, pH 9,5). Après lavages, les plaques sont saturées avec le tampon d'incubation pendant 2 heures à 37°C. Après une autre étape de lavages, on procède à la réaction de compétition. Dans les deux cas, pour la courbe standard et l'échantillon biologique, la BK ou la Des-Arg⁹-BK entre en compétition avec son traceur respectif pour les sites d'anticorps fixés sur le support solide. Après une autre série de lavages, les complexes immuns réagissent avec le fragment Fab anti-digoxigénine couplé à la HRPO, et ce pendant 2 heures d'incubation à 37°C. Après une dernière étape de lavages, l'activité de la peroxydase est révélée au moyen du substrat de la HRPO, une solution d'o-phénylènediamine (1mg/ml) dans un tampon citrate 80mM (citrate de sodium 50mM, acide citrique 30mM, peroxyde d'urée 0,1% p/v, pH 5,0). L'absorption pour chaque puit est mesurée à 450nm avec une référence à 630nm (Bio-Tek Instrument, Winooski, VT, USA).

3.1.3 Calcul de la T_{1/2} des kinines

La constante (k) d'hydrolyse des kinines (S) est obtenue par une équation de premier ordre $S = S_0 e^{-kt}$. La demi-vie est calculée selon $T_{1/2} = \ln(2)/k$. (Moore et Pearson, 1981).

3.2 Métabolisme des kinines endogènes

3.2.1 Activation du système de contact plasmatique

Un volume de 800 μ l de plasma est préincubé avec de l'énalaprilat (concentration finale de 520nM inhibant totalement l'activité de l'ECA) pendant 15 minutes à 37°C, avec agitation, dans des tubes de polypropylène. Le système de contact est alors activé en incubant le plasma avec des billes de verre à 37°C, avec agitation. Des aliquots de 40 μ l de plasma sont prélevés à différents temps d'incubation, soit aux temps 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 36, 48 et 60 minutes et la réaction est arrêtée tel que décrit au point 3.1.1. Les valeurs de référence obtenues des différents paramètres cinétiques au moyen de cette approche expérimentale ont été publiées antérieurement lors d'une étude effectuée chez 116 volontaires sains (Cyr et al, 2001).

3.2.2 Dosage des kinines

Tel que décrit au point 3.1.2

3.2.3 Profils métaboliques de la BK et de la Des-Arg⁹-BK endogènes

Le modèle mathématique suivant $y = t^\alpha e^{-\beta t}$, $t > 0$, a été appliqué aux concentrations (y) de BK et de Des-Arg⁹-BK endogènes mesurées à différents temps t d'incubation pour chaque sujet. Ce modèle à 3 paramètres correspond à une forme de distribution gamma (Rice, 1995), il a été précédemment décrit et validé (Cyr et al, 2001). Les paramètres α et β caractérisent respectivement la partie ascendante et descendante de la courbe correspondant à la formation et à la dégradation de chaque peptide. Ces paramètres α et β permettent le calcul de la surface sous la courbe (la surface sous la courbe permettant le calcul de la quantité de peptide libérée pendant la période d'incubation, elle est donnée mathématiquement par $k\Gamma(\alpha+1)/\beta^{\alpha+1}$, où $\Gamma(\alpha+1)$ est la fonction gamma).

3.3 Dosage des métallopeptidases plasmatiques

3.3.1 L'aminopeptidase P (APP)

L'activité de l'APP plasmatique est mesurée en utilisant une version modifiée (Blais et al, 1999a) de l'essai décrit précédemment par Simmons et Orawski en 1992 (Simmons and Orawski, 1992). Brièvement, 20 μ l de plasma sont incubés à 37°C pendant 3 heures avec une solution de substrat Arg-Pro-Pro (concentration finale 0,5mM) dans un tampon HEPES 0,1M à pH 7,4. Le volume final est de 200 μ l. La réaction est arrêtée en ajoutant 800 μ l d'éthanol anhydre froid. Les échantillons sont ensuite centrifugés (4°C, 15 minutes, 1750g) et le surnageant est décanté. L'arginine libérée réagit avec l'o-phthaldialdéhyde contenu dans le tampon de révélation borate 0,05M pH 9,5 (165mg/L d'o-phthaldialdéhyde et 85 μ l/L de β -mercaptoéthanol). La fluorescence émise est lue par un fluorimètre TD700 à une longueur d'onde de 458nm d'émission (excitation : 320nm) (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA). Les résultats sont calculés en utilisant une courbe standard de L-arginine et exprimés en nanomoles d'arginine libérées/min/ml de plasma.

3.3.2 La carboxypeptidase N (CPN)

L'activité de la CPN est quantifiée dans le plasma en utilisant une version modifiée (Blais et al, 1999a) de l'essai décrit précédemment par Skidgel en 1995 (Skidgel, 1995). 20 μ l de plasma sont incubés à 37°C pendant 70 minutes avec une solution de dansyl-Ala-Arg à une concentration finale de 0,2mM dans un tampon HEPES 0,1M à pH 7,4. Le volume total est de 250 μ l. Après la période d'incubation, la réaction est arrêtée en ajoutant 150 μ l d'un tampon citrate (acide citrique 1M, pH 3,1). Le dansyl-Ala libéré est extrait par 3ml de chloroforme. Après la centrifugation (15°C, 10 minutes, 200g), la phase aqueuse est éliminée et la fluorescence de la phase chloroformique est mesurée à une longueur d'onde de 490nm (excitation : 340nm). Les résultats sont calculés en utilisant une courbe standard

de dansyl-Ala et les activités enzymatiques sont exprimées en nanomoles de dansyl-Ala libérées/min/ml de plasma.

3.3.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA)

L'activité de l'ECA est obtenue par l'essai radioenzymatique Buhlmann (Angiotensin-Converting Enzyme ^3H -REA, ALPCO, Windham, NH, USA) en suivant les instructions du fabricant. Cette méthode mesure l'hydrolyse du substrat synthétique glycine-glycyl- ^3H -hippuryl en acide ^3H -hippurique et en un dipeptide glycyl-glycine. Le solvant d'extraction sépare l'acide hippurique tritié du substrat n'ayant pas réagi. La radioactivité est mesurée par scintillation. L'activité de l'ECA est exprimée en unités ECA (1 unité = 1 nmol d'acide ^3H -hippurique/min/ml de plasma).

3.4 Pouvoir kininogénase de la kallikréine plasmatique et de la plasmine

3.4.1 Incubation pour le dosage des kinines immunoréactives libérées, le calcul du K_m et leur analyse par chromatographie liquide à haute pression (HPLC)

1 μg de kallikréine (211 nM) ou de plasmine (219 nM) est incubé en présence de quantités variables de KHPM (0,625 μg : 95 nM, 1,25 μg : 190 nM, 2,5 μg : 379 nM, 5 μg : 758 nM, 10 μg : 1515 nM, 25 μg : 3788 nM, 50 μg : 7576 nM) à 37°C. Le volume est ajusté à 55 μl avec un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. La réaction est arrêtée après 60 minutes tel que décrit au point 3.1.1.

3.4.2 Incubation pour l'immunobuvardage des produits d'hydrolyse du KHPM par la kallicréine plasmatique et la plasmine

Des quantités variables de kallicréine (0,0625 μ g : 13nM, 0,25 μ g : 58nM, 1 μ g : 211nM) ou de plasmine (0,0625 μ g : 15nM, 0,25 μ g : 60nM, 1 μ g : 219nM) sont incubées en présence de 50 μ g (7576nM) de KHPM à 37°C. Le volume est ajusté à 55 μ l avec un tampon Tris-HCl 50mM, pH 7,4. La réaction est arrêtée après différents intervalles de temps, soit 10, 30 et 60 minutes tel que décrit au point 3.1.1.

3.4.3 Dosage des kinines

Tel que décrit au point 3.1.2

3.4.4 Identification de la BK et de la Des-Arg⁹-BK immunoréactives par HPLC

Après évaporation, les culots des extraits éthanoliques sont resuspendus dans une solution de KH₂PO₄, 5mM avec 25% d'acétonitrile et 0,01% d'acide phosphorique. La BK et la Des-Arg⁹-BK sont séparées par un système HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies Canada, Mississauga, ON, CA) sur une colonne (2-sulfoethyl aspartamine) échangeuse de cations (PolySULFOETHYL ATM, The Nest Group, Inc, Southboro, MA, USA), avec un gradient linéaire de 100% de solvant A (KH₂PO₄ 5mM avec 25% d'acétonitrile, pH 3,0) à 100% de solvant B (KH₂PO₄ 5mM, KCl 300mM avec 25% d'acétonitrile, pH 3,0) pendant 25 minutes, à un débit constant de 1ml/min. Les peptides élués sont détectés par leur absorption à 220nm. Cette méthode permet une séparation des kinines en fonction de leur charge amino-terminale. Des fractions de 1ml sont collectées, puis évaporées, pour ensuite être dosées par immunoessai, tel que décrit au point 3.1.2.

3.4.5 Calcul du K_m

En utilisant le dosage de la BK, il fut possible d'obtenir le K_m de la kallibréine plasmatique et, de la plasmine envers le KHPM. De plus, nous avons pu calculer les K_m de la même façon avec le dosage de la Des-Arg⁹-BK. Pour ce faire, nous avons utilisé le logiciel Graphpad Prism 4 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3.5 Immunobuvardage

Cette méthode a été utilisée pour étudier la coupure protéolytique du KHPM dans deux situations : 1) pour le plasma de la patiente atteinte du syndrome d'embolie par liquide amniotique et 2) pour observer la coupure du KHPM par la kallibréine plasmatique et la plasmine. Les échantillons protéiques (plasma, KHPM, kallibréine plasmatique, plasmine) sont dilués avec un tampon Laemmli 6 fois concentré. Ils sont soumis à une électrophorèse en gel d'acrylamide avec un gradient de 4 à 15% pour 90 minutes, à une tension de 120V. Les protéines séparées par l'électrophorèse sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant une nuit à 4°C à une tension de 25V. La membrane est ensuite saturée avec une solution TTBS-lait 5% (Tris 20mM, NaCl 500mM, Tween 20 0,05%, lait 5%), puis incubée 6 heures en présence d'anticorps polyclonaux de lapin anti-KHPM développés au laboratoire (Adam et al, 1985b) dilués 1/10000 avec du TTBS-lait 5%. Les anticorps de lapin sont finalement reconnus par une solution d'anticorps secondaires de chèvre anti-IgGs de lapin marqués à la HRPO dilués 1/10000 avec du TTBS-lait 5%. La membrane est finalement lavée avec un tampon TTBS pendant 30 minutes et les complexes immuns sont révélés en ajoutant un substrat luminescent du HRPO (Chemi Glow) dans un chemilmager (Alpha Innotech corporation, San leandro, CA, USA).

4. Traitement statistique des différents paramètres cinétiques calculés pour les patients atteints d'AOH de type I et II

Une analyse de variance à un facteur à quatre niveaux (population de référence, AOH I non traités, AOH II non traités, AOH I Danatrol[®]) a été effectuée pour comparer les moyennes entre les groupes pour les paramètres activité plasmatique de l'APP, de l'ECA, de la CPN, la T_{1/2} plasmatique de la BK et de la Des-Arg⁹-BK. Les contrastes de Tukey ont été effectués lorsque nécessaires. Tous les résultats ont été interprétés à un niveau de signification de 5%.

PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS

I Présentation et analyse des résultats pour le pouvoir kininogénase plasmatique lors du syndrome d'embolie par liquide amniotique

1. BK immunoréactive libérée à partir du KHPM pendant l'activation *in vitro* du système de contact plasmatique chez une patiente atteinte du syndrome d'embolie par liquide amniotique

La figure 9A représente la cinétique de libération de la BK à partir de son précurseur, le KHPM, pendant l'activation *in vitro* du système de contact plasmatique. Les aires sous les courbes obtenues pour chaque profil correspondent aux quantités totales de BK libérée pendant la période d'incubation, et donc au pouvoir kininogénase du KHPM natif, puisqu'une mole de BK est libérée à partir d'une mole de KHPM. Pour les profils 1 et 2 obtenus pour les prélèvements effectués immédiatement et 30 minutes après le choc embolique, les aires sous les courbes correspondent à des quantités respectives de 0,5 et 0,7nmoles de BK libérée pour 1ml de plasma activé. Le pouvoir kininogénase du profil 3 (2 jours après l'événement) et celui du profil 4 (après 9 jours) correspondent respectivement à 5,5 et 16,3nmoles de BK/1ml de plasma activé.

Comme l'illustre la figure 9B, les aires sous les courbes des profils 1 et 2 se situent au 1^{er} percentile d'une population féminine de référence définie précédemment (Cyr et al, 2001). L'aire sous la courbe du profil 3 se situe au 26^e percentile, alors que celle du profil 4 est située au 99^e percentile de cette même population.

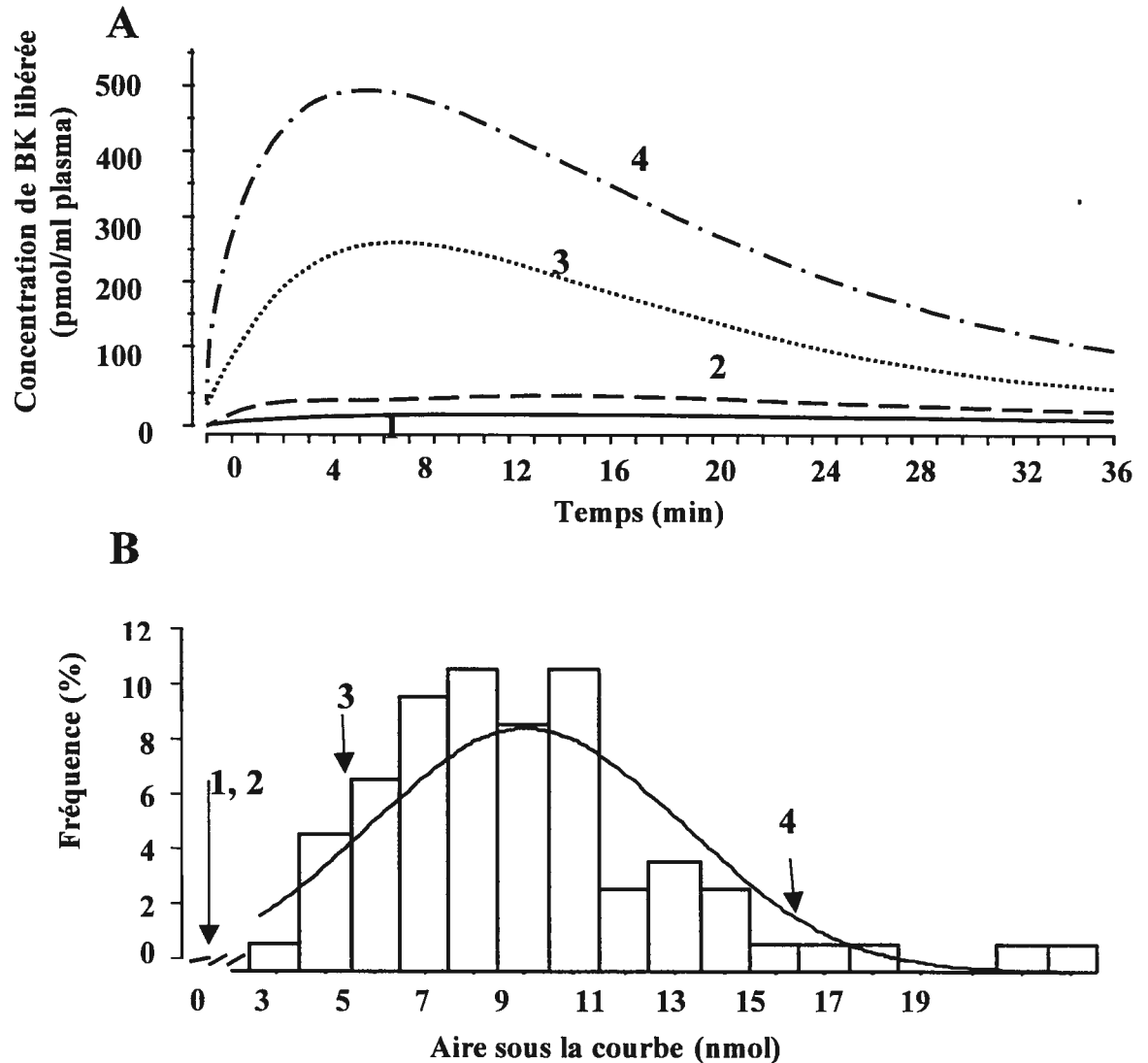


Figure 9. BK immunoréactive libérée à partir du KHPM pendant l'activation *in vitro* du système de contact plasmatique dans le contexte du syndrome d'embolie par liquide amniotique. A) Les différents profils de la patiente : prélèvement 1, immédiatement après le choc (____); prélèvement 2, 30 minutes après le choc (____); prélèvement 3, 2 jours après le choc (.....); prélèvement 4, 9 jours après le choc (.-.-.). B) Distribution normale de l'aire sous la courbe représentant la quantité totale de BK libérée chez une population féminine de référence. 1,2,3 et 4 correspondent aux profils en A).

2. Immunobuvardage des différents prélèvements de plasma de la patiente

La figure 10 illustre le profil de l'immunobuvardage des différents prélèvements de plasma de la patiente. Celui-ci confirme les profils du pouvoir kininogène montrés à la figure 9 et apporte l'évidence de la consommation massive de ce pouvoir kininogène plasmatique. En effet, le KHPM natif est indétectable dans le plasma au moment du choc. Par contre, le précurseur de la BK réapparaît sous sa forme native au jour 9 après l'événement, comme le montre la bande immunoréactive située à 100kDa.

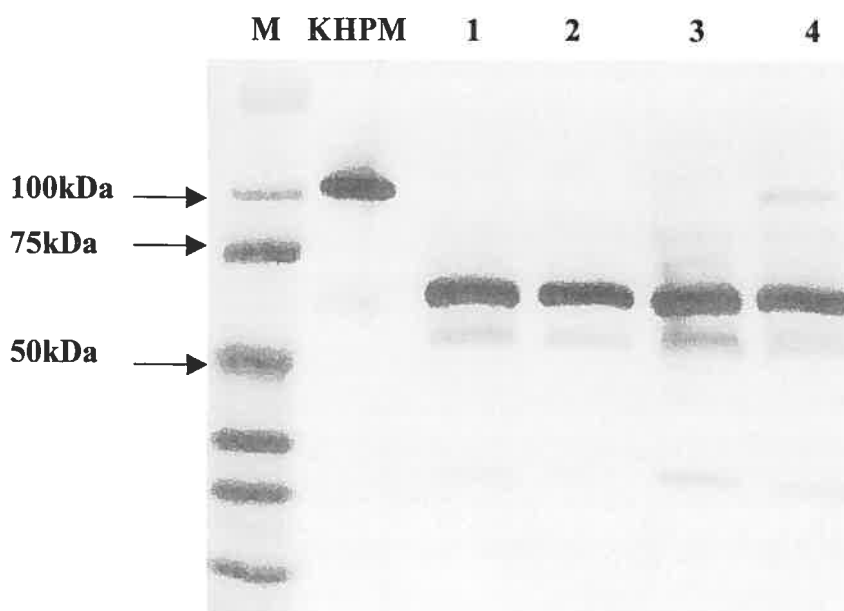


Figure 10. Profil de l'immunobuvardage des différents prélèvements de plasma de la patiente. M correspond au marqueur de poids moléculaire, KHPM natif, les numéros 1 à 4 correspondent aux différents échantillons de plasma de la patiente : 1) immédiatement après le choc; 2) 30 minutes après le choc; 3) 2 jours après le choc; 4) 9 jours après le choc.

II Présentation et analyse des résultats pour le pouvoir kininogénase de la kallibréine plasmatique et de la plasmine

1. Immunobuvardage des produits d'hydrolyse obtenus par incubation du KHPM en présence de kallibréine plasmatique et de plasmine

Nous représentons aux figures 11 et 12, les profils d'immunobuvardage des produits d'hydrolyse issus de l'incubation de quantités constantes de KHPM en présence de quantités variables, soit de kallibréine plasmatique (figure 11) ou de plasmine (figure 12).

L'immunobuvardage de la figure 11 montre qu'une quantité de 1 μ g de kallibréine plasmatique digère complètement 50 μ g de KHPM pour un temps d'incubation aussi court que 10 minutes. En effet, aucune bande immunoréactive ne peut être détectée à un poids moléculaire de 100kDa, correspondant au KHPM natif. Seules 2 bandes de poids moléculaire égal à 55kDa et 45kDa sont présentes. Un profil semblable est observé lors d'une incubation en présence de 1 μ g de plasmine à la figure 12.

La bande d'immunoréactivité correspondant au KHPM natif réapparaît lorsque le KHPM est incubé en présence d'une quantité moindre (0,25 μ g) de kallibréine plasmatique ou de plasmine pour une période de 10 minutes. Par contre, si le temps d'incubation augmente jusqu'à 30 et 60 minutes, nous assistons à une digestion quasi complète du KHPM.

Cependant, la bande immunoréactive correspondant au KHPM natif s'intensifie lorsque l'on diminue la quantité d'enzyme protéolytique (0,0625 μ g). Ici, quel que soit le temps d'incubation, la digestion est minimale.

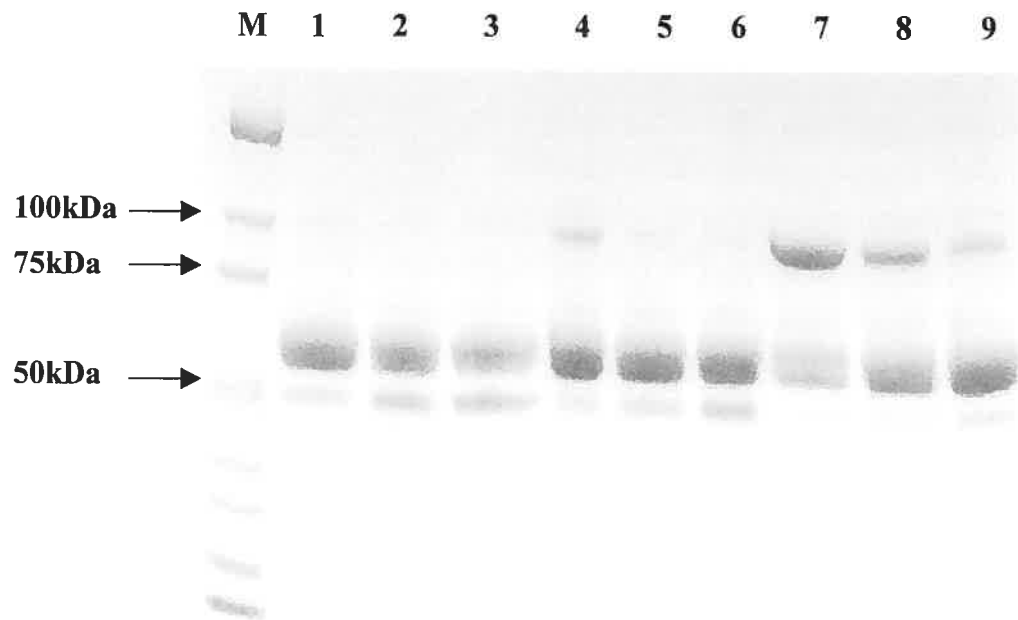


Figure 11. Profil de l'immunobuvardage de l'hydrolyse du KHPM par la kallibréine plasmatique. M correspond au marqueur de poids moléculaire, 1) 50 μ g de KHPM incubé 10 minutes en présence de 1 μ g de kallibréine, 2) 50 μ g de KHPM incubé 30 minutes en présence de 1 μ g de kallibréine, 3) 50 μ g de KHPM incubé 60 minutes en présence de 1 μ g de kallibréine, 4) 50 μ g de KHPM incubé 10 minutes en présence de 0,25 μ g de kallibréine, 5) 50 μ g de KHPM incubé 30 minutes en présence de 0,25 μ g de kallibréine, 6) 50 μ g de KHPM incubé 60 minutes en présence de 0,25 μ g de kallibréine, 7) 50 μ g de KHPM incubé 10 minutes en présence de 0,0625 μ g de kallibréine, 8) 50 μ g de KHPM incubé 30 minutes en présence de 0,0625 μ g de kallibréine, 9) 50 μ g de KHPM incubé 60 minutes en présence de 0,0625 μ g de kallibréine.

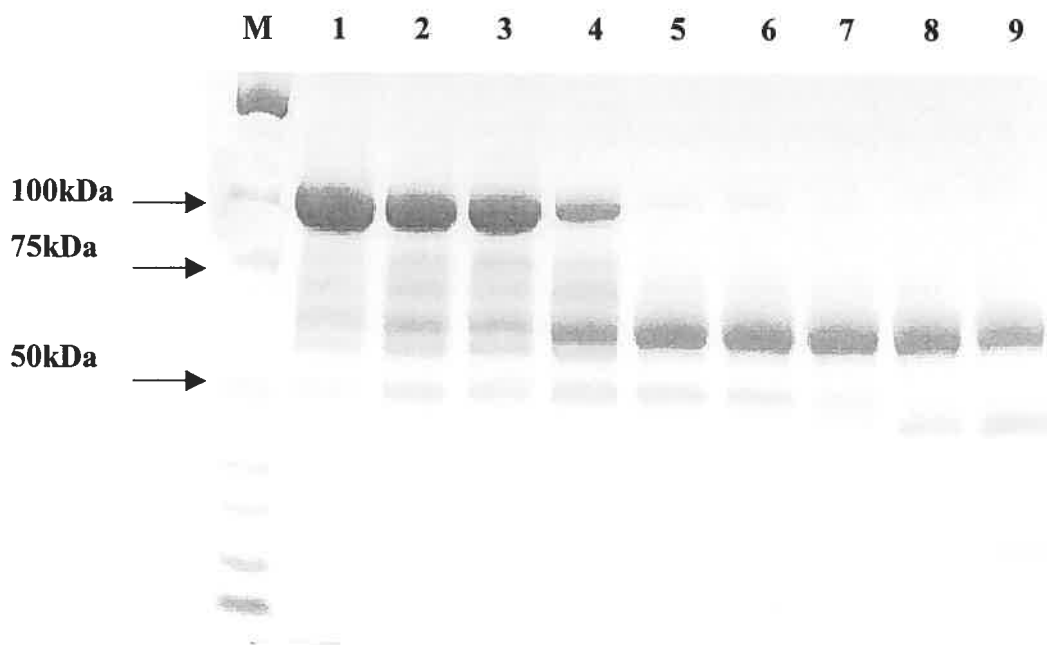


Figure 12. Profil de l'immunobuvardage de l'hydrolyse du KHPM par la plasmine. M correspond au marqueur de poids moléculaire, 1) 50µg de KHPM incubé 10 minutes en présence de 0,0625µg de plasmine, 2) 50µg de KHPM incubé 30 minutes en présence de 0,0625µg de plasmine, 3) 50µg de KHPM incubé 60 minutes en présence de 0,0625µg de plasmine, 4) 50µg de KHPM incubé 10 minutes en présence de 0,25µg de plasmine, 5) 50µg de KHPM incubé 30 minutes en présence de 0,25µg de plasmine, 6) 50µg de KHPM incubé 60 minutes en présence de 0,25µg de plasmine, 7) 50µg de KHPM incubé 10 minutes en présence de 1µg de plasmine, 8) 50µg de KHPM incubé 30 minutes en présence de 1µg de plasmine, 9) 50µg de KHPM incubé 60 minutes en présence de 1µg de plasmine.

2. Dosage de la BK et de la Des-Arg⁹-BK immunoréactives libérées lors de l'incubation du KHPM en présence de kallibréine plasmatique et de plasmine

Les profils des immunobuvardages ont été complétés par le dosage de la BK et de la Des-Arg⁹-BK immunoréactives. Les figures 13 et 14 montrent la libération de ces kinines à partir du KHPM par la kallibréine plasmatique et la plasmine respectivement.

Lorsque la kallibréine est incubée en présence de KHPM, on assiste à la libération non seulement de BK, mais aussi de Des-Arg⁹-BK (figure 13). On observe déjà une libération de BK pour une quantité de kallibréine de 1µg incubée en présence de 0,625µg de KHPM. À cette concentration de KHPM (95nM), la quantité de BK libérée égale à 51nM, ce qui correspond à une hydrolyse du KHPM natif de 53%. Pour la première fois également et de façon surprenante, nous observons la libération de Des-Arg⁹-BK par la kallibréine à partir du KHPM, en quantité moindre cependant que la BK. En effet, à la même concentration de KHPM, soit 95nM, la quantité de Des-Arg⁹-BK libérée égale à 4nM, ce qui correspond à environ 8% celle de la BK, qui concorde à une hydrolyse de 4% du KHPM natif.

On assiste également à une libération de BK et de Des-Arg⁹-BK par la plasmine (figure 14) à partir du KHPM. Il y a déjà libération de BK pour une quantité de plasmine de 1µg incubée en présence de 0,625µg de KHPM. À cette concentration (95nM), la quantité de BK libérée est égale à 10nM, ce qui correspond à une hydrolyse du KHPM natif de 11%, valeur 5 fois inférieure à celle obtenue par la kallibréine plasmatique. De plus, l'hydrolyse est plus importante pour les fortes concentrations de KHPM (3788nM). En effet, la libération de BK à cette concentration est égale à 867nM, ce qui correspond à une hydrolyse de 23% du KHPM natif. Pour la première fois, nous mettons en évidence la libération de Des-Arg⁹-BK par la plasmine à partir du KHPM. Pour une concentration de KHPM égale à 95nM, nous observons une libération de Des-Arg⁹-BK égale à 5nM, ce qui correspond à une hydrolyse de 5%, comparable à celle de la kallibréine plasmatique.

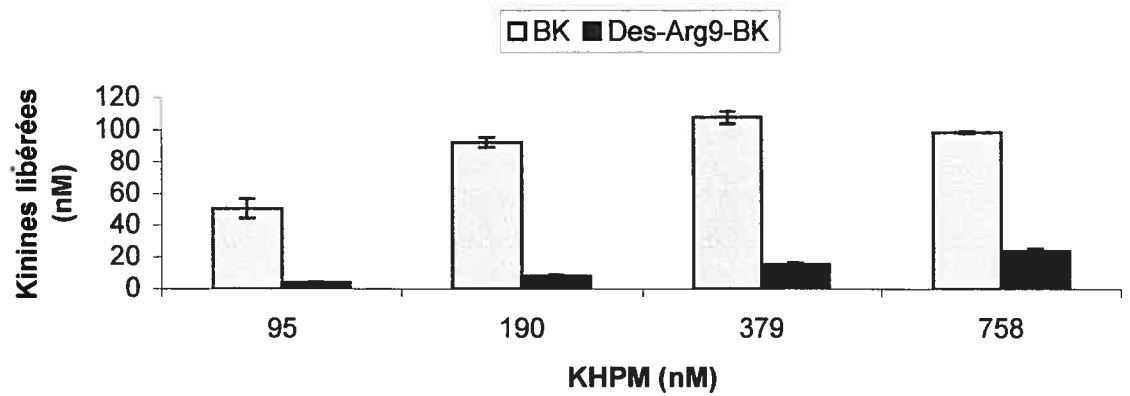


Figure 13. BK et Des-Arg⁹-BK immunoréactives libérées suite à l'incubation de différentes concentrations de KHPM en présence de 1µg de kallibréine plasmatique.

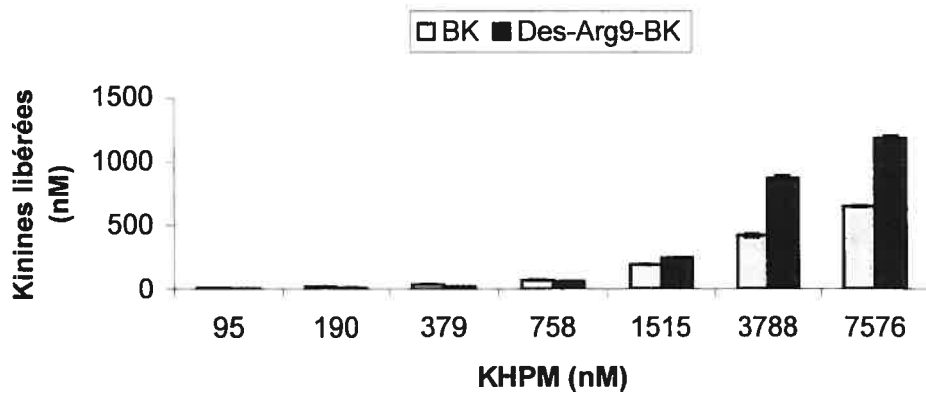


Figure 14. BK et Des-Arg⁹-BK immunoréactives libérées suite à l'incubation de différentes concentrations de KHPM en présence de 1µg de plasmine.

3. Calcul du K_m de la kallibréine plasmatique et de la plasmine vis-à-vis le KHPM

Les quantités de BK et de Des-Arg⁹-BK libérées lors des incubations de KHPM en présence de kallibréine plasmatique et de plasmine nous ont permis de calculer les K_m de la kallibréine (figures 15 et 16) et de la plasmine (figures 17 et 18) vis-à-vis le KHPM.

Le dosage de la BK libérée à partir de l'incubation de KHPM en présence de kallibréine nous a permis de calculer un K_m égal à $0,18\mu\text{M}$ (figure 15) alors qu'il est de $1,66\mu\text{M}$ pour le dosage de la Des-Arg⁹-BK (figure 16).

De même pour l'incubation de KHPM en présence de plasmine, le dosage de la BK nous a permis de constater que le K_m est de $44,96\mu\text{M}$ (figure 17) alors qu'il est de $19,58\mu\text{M}$ pour le dosage de la Des-Arg⁹-BK (figure 18).

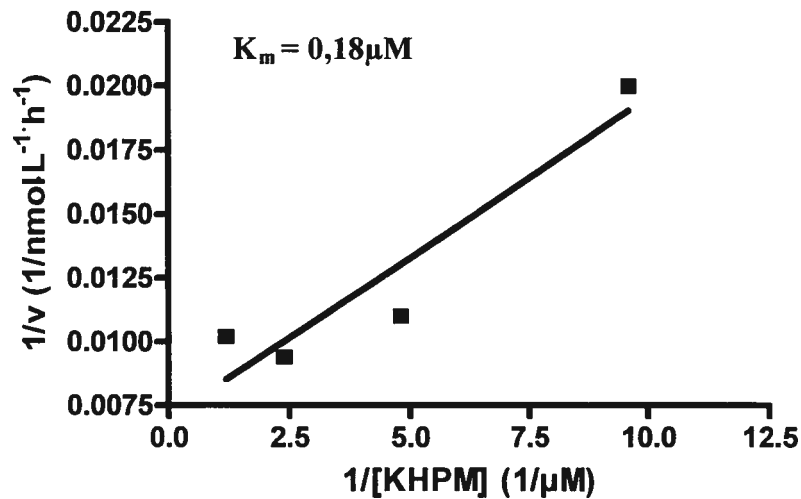


Figure 15. Courbe de Lineweaver-Burk obtenue à partir des quantités dosées de BK libérée suite à l'incubation de KHPM en présence de kallibréine plasmatique. Cette courbe permet de calculer le K_m de la réaction.

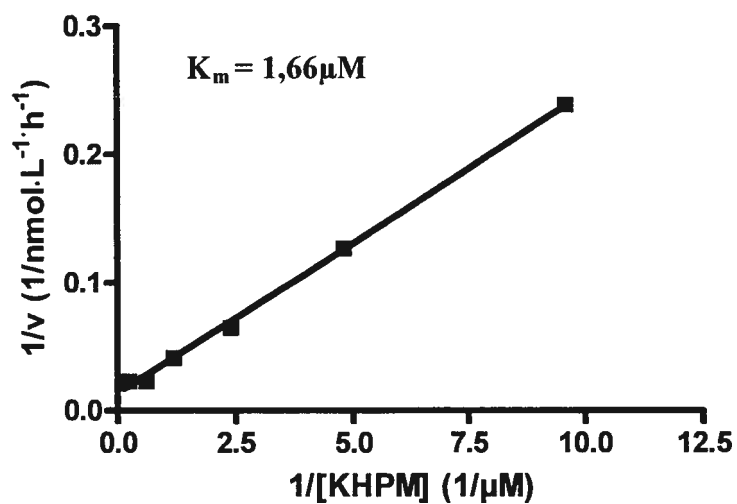


Figure 16. Courbe de Lineweaver-Burk obtenue à partir des quantités dosées de Des-Arg⁹-BK libérée suite à l'incubation de KHPM en présence de kallibréine plasmatique. Cette courbe permet de calculer le K_m de la réaction.

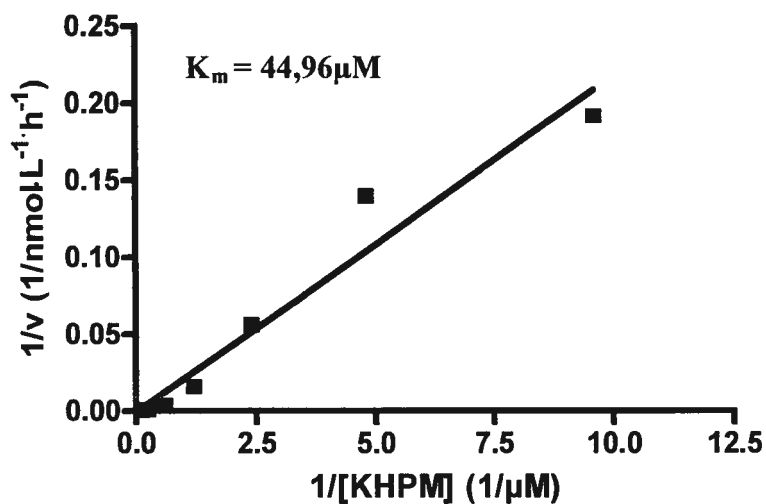


Figure 17. Courbe de Lineweaver-Burk obtenue à partir des quantités dosées de BK libérée suite à l'incubation de KHPM en présence de plasmine. Cette courbe permet de calculer le K_m de la réaction.

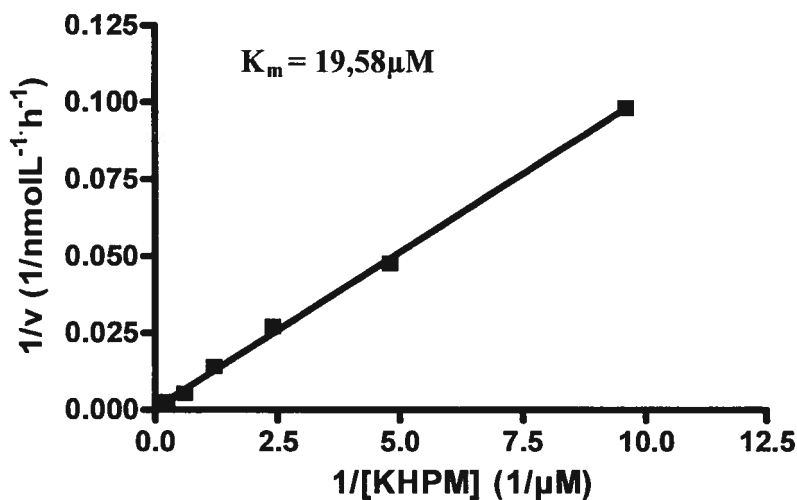


Figure 18. Courbe de Lineweaver-Burk obtenue à partir des quantités dosées de Des-Arg⁹-BK libérée suite à l'incubation de KHPM en présence de plasmine. Cette courbe permet de calculer le K_m de la réaction.

4. Nature des kinines immunoréactives libérées suite à l'incubation de KHPM en présence de kallibréine plasmatique et de plasmine

Les produits des réactions ont été séparés par HPLC. L'examen des espèces éluées confirme la nature de la BK et de la Des-Arg⁹-BK libérée. Dans le système utilisé, tant pour l'incubation de KHPM avec la kallibréine plasmatique (figure 19) qu'avec la plasmine (figure 20), la BK immunoréactive est principalement éluee à 24 minutes, alors que la Des-Arg⁹-BK l'est à 18 minutes, ce qui correspond aux temps de rétention des deux peptides standards (figure 21).

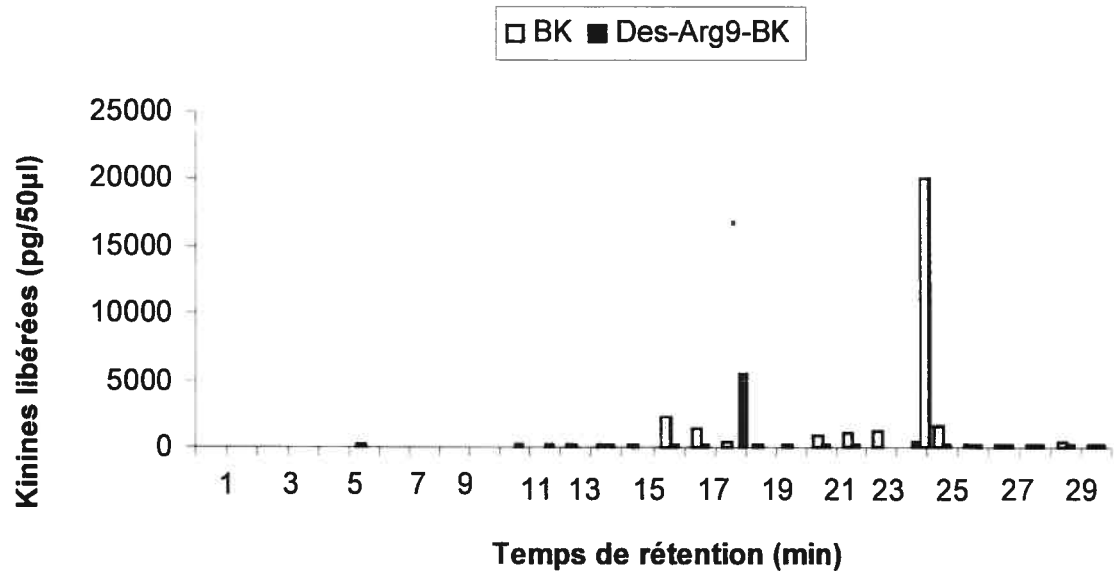


Figure 19. Temps de rétention des kinines immunoréactives libérées suite à l'incubation de KHPM en présence de kalllicréine plasmatique.

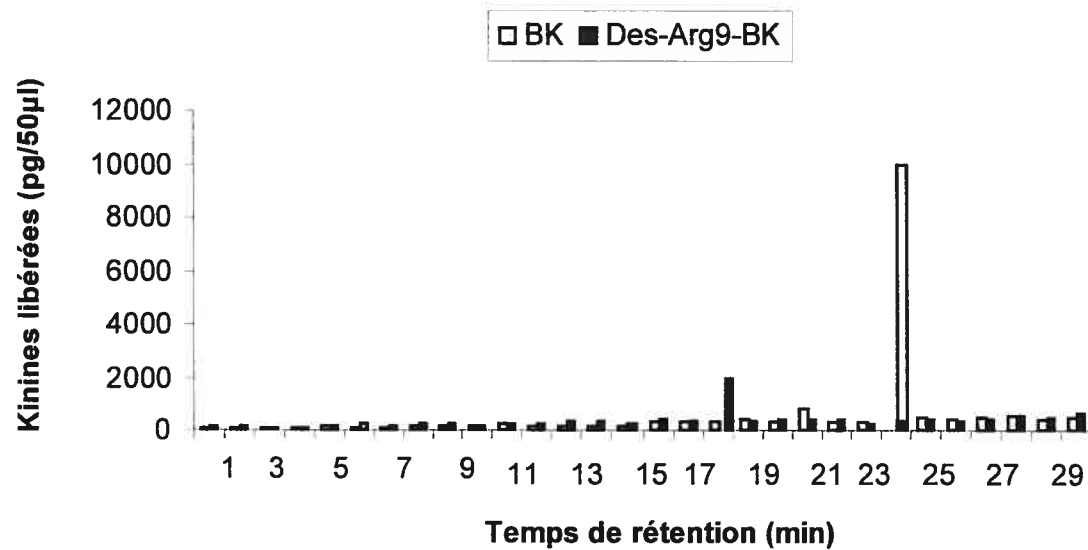


Figure 20. Temps de rétention des kinines immunoréactives libérées suite à l'incubation de KHPM en présence de plasmine.

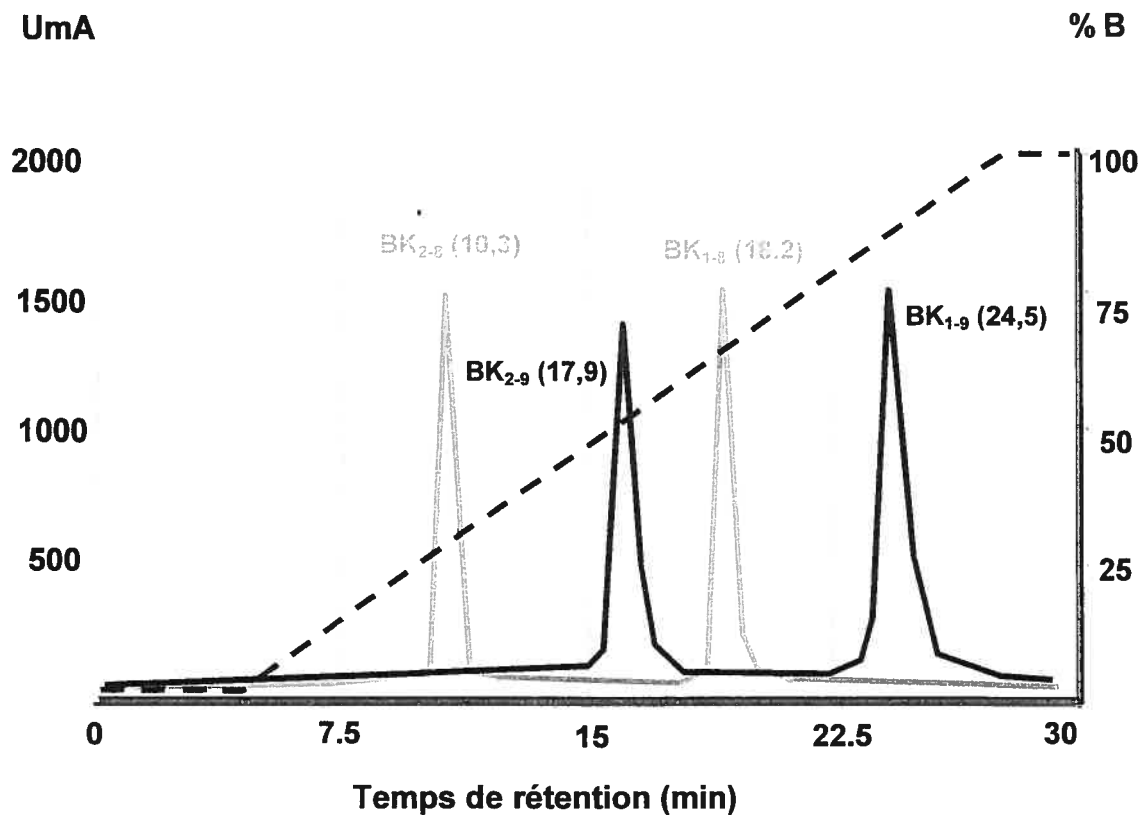


Figure 21. Profil chromatographique standard des kinines dans un système HPLC utilisant la colonne échangeuse de cations. UmA représente les unités de milliabsorbance. % B représente le gradient de solvant B.

III Présentation et analyse des résultats pour l'angioedème héréditaire de type I et II

1. Activités des métallopeptidases plasmatiques impliquées dans le métabolisme de la BK et la Des-Arg⁹-BK chez des patients atteints d'AOH de type I et II

La figure 22 illustre les moyennes des activités de l'APP plasmatique chez les patients atteints d'AOH de type I et II, traités ou non par le Danatrol[®]. Ces valeurs sont comparées à celles obtenues pour une population de référence constituée de 116 volontaires sains (Cyr et al, 2001). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre l'activité moyenne de l'APP des patients non traités atteints d'AOH de type I et d'AOH de type II ($p=0,999$). De plus, ces deux groupes ne diffèrent pas d'une population de référence ($p=0,528$ et $p=0,635$ respectivement). Cependant, les patients atteints d'AOH de type I traités par Danatrol[®] ont une activité moyenne de l'APP plasmatique significativement plus élevée que les autres groupes étudiés ($p<0,001$).

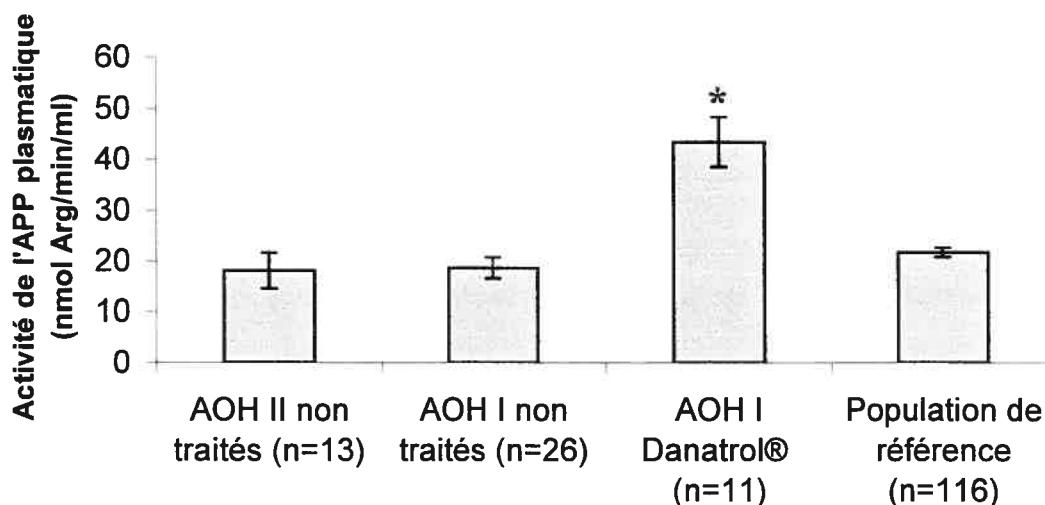


Figure 22. Moyenne des activités de l'APP plasmatique chez les patients atteints d'AOH de type I et II, traités ou non par le Danatrol®. Ces valeurs sont comparées à celles d'une population de référence. (* $p < 0,001$, groupe AOH I Danatrol® vs AOH I ou II non traités et population de référence).

La figure 23 montre les moyennes des activités de l'ECA plasmatique chez ces mêmes patients. Dans ce cas, l'activité moyenne de l'ECA des patients non traités atteints d'AOH de type I est significativement supérieure à celle des patients atteints d'AOH de type II, ainsi que celle de la population de référence ($p < 0,001$). Pour sa part, le groupe AOH de type II n'est pas significativement distinct de la population normale ($p = 0,997$). Enfin, le groupe AOH de type I traité par le Danatrol® ne montre pas de différence significative avec les groupes non traités AOH de type I ou II, ainsi que la population de référence ($p = 0,125$, $p = 0,812$, $p = 0,014$ respectivement).

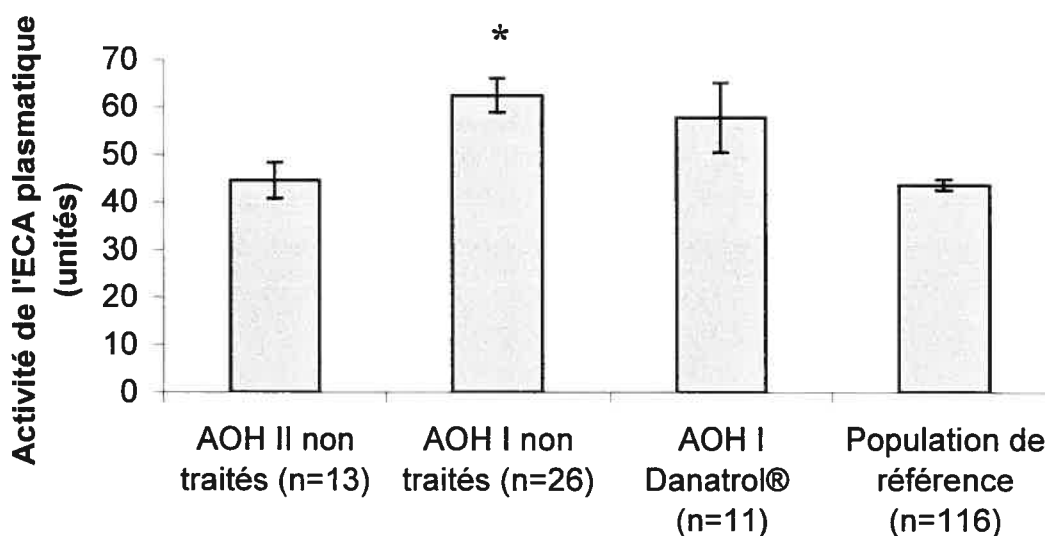


Figure 23. Moyenne des activités de l'ECA plasmatique chez les patients atteints d'AOH de type I et II, traités ou non par le Danatrol®. Ces valeurs sont comparées à celles d'une population de référence. (* $p < 0,001$, groupe AOH I non traités vs AOH II non traités et population de référence).

Enfin, l'analyse statistique des moyennes des activités de la CPN plasmatique chez ces mêmes patients n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative mesurée dans les différents groupes.

2. $T_{1/2}$ plasmatiques de la BK et de la Des-Arg⁹-BK chez des patients atteints d'AOH de type I et II

La figure 24 illustre les moyennes des $T_{1/2}$ plasmatiques de la BK exogène ajoutée au plasma des patients atteints d'AOH de type I et II, traités ou non par le Danatrol®. Celles-ci sont supérieures à la valeur moyenne mesurée dans la population de référence ($p < 0,001$). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre la $T_{1/2}$

plasmatique moyenne de la BK des patients non traités atteints d'AOH de type I et celles des patients atteints d'AOH de type II ($p=0,999$). De plus, il n'y a aucune différence significative entre les patients atteints d'AOH de type I traités par le Danatrol® et les groupes non traités AOH de type I ou II ($p=0,536$ et $p=0,688$ respectivement).

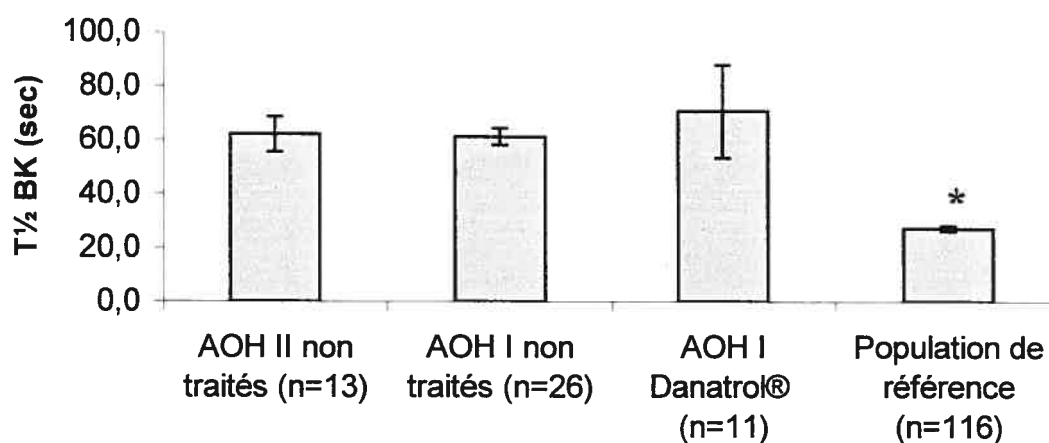


Figure 24. Moyenne des T½ plasmatiques de la BK exogène ajoutée au plasma de patients atteints d'AOH de type I et II, traités ou non par le Danatrol®. Ces valeurs sont comparées à celles d'une population de référence. (* $p < 0,001$, population de référence vs groupe AOH I ou II non traités et AOH I Danatrol®).

La figure 25 montre les moyennes des T½ plasmatiques de la Des-Arg⁹-BK chez les patients atteints d'AOH de type I et II, traités ou non par le Danatrol®. Ces valeurs sont comparées à celles obtenues pour une population de référence (Cyr et al, 2001). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre la T½ de la Des-Arg⁹-BK des différents groupes étant donné les valeurs élevées des écart-types.

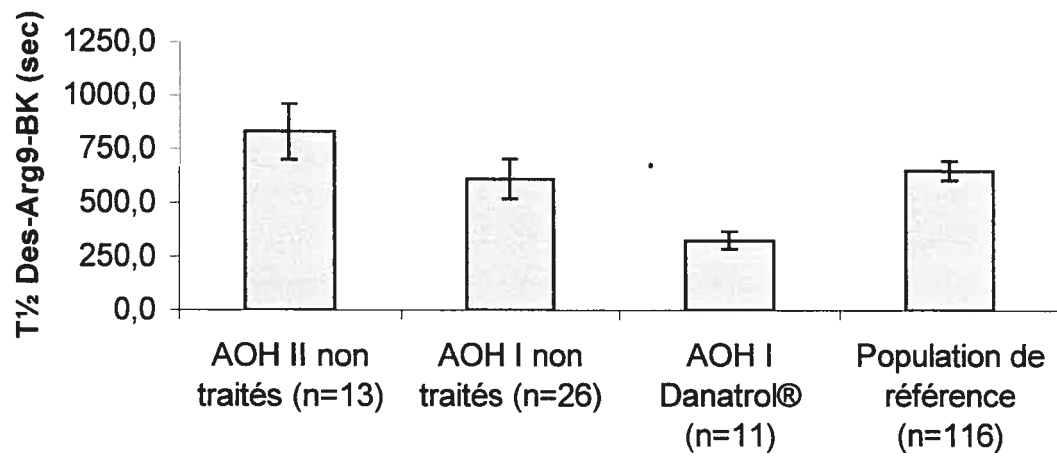


Figure 25. Moyenne des $T^{1/2}$ plasmatiques de la Des-Arg⁹-BK chez les patients atteints d'AOH de type I et II, traités ou non par le Danatrol[®]. Ces valeurs sont comparées à celles d'une population de référence.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Il y a près d'un siècle, Abelous et Bardier rapportaient la première évidence expérimentale du système kallicréines-kininogènes-kinines (Abelous et Bardier, 1909). Depuis ce temps, ce système a fait l'objet de multiples travaux expérimentaux. En effet, environ 1500 articles ont été publiés sur ce sujet depuis un siècle.

De nombreuses études chez l'animal, sur organes isolés, aux niveaux cellulaires et subcellulaires ont mis en évidence les propriétés proinflammatoires de la BK, alors que d'autres études ont suggérées un rôle cardioprotecteur de ce peptide. Le métabolisme plasmatique a été défini et a permis le développement de différents médicaments capables de potentialiser les effets pharmacologiques de la BK. Des études menées au niveau d'organes isolés d'abord et de systèmes cellulaires ensuite ont permis de caractériser les récepteurs B₁ et B₂ avec le développement d'antagonistes spécifiques, actuellement en développement clinique.

Malgré cette recherche intense, le rôle physiopathologique des kinines reste largement méconnu en pathologie humaine et ce pour 2 raisons principales. D'une part, il y a un manque d'approches analytiques rigoureuses applicables aux milieux biologiques facilement accessibles en pathologie humaine. D'autre part, les kinines, ces peptides de nature autocrine et paracrine sont difficilement accessibles au niveau périphérique.

L'objectif de notre travail de maîtrise vise à mieux comprendre le rôle des kinines en pathologie humaine. Pour ce faire, nous avons abordé 3 problèmes d'intérêt clinique.

Dans un premier temps, nous avons documenté la participation des kinines au syndrome d'embolie par liquide amniotique. Cependant, nous n'avons pas dosé la BK plasmatique, ce dosage étant entaché de nombreuses sources de perturbations analytiques, soit par la nature du peptide dosé, soit par l'interférence des précurseurs et la forte activité des enzymes du catabolisme. Au contraire, nous avons appliqué au plasma d'une patiente présentant le syndrome d'embolie par liquide amniotique, une méthode analytique précédemment décrite et validée au laboratoire (Cyr et al, 2001) et fondée sur l'examen du KHPM.

Nous avons montré que la symptomatologie clinique était associée à une consommation du pouvoir kininogène du plasma reflétant le KHPM natif. De plus, nous avons montré une restauration du KHPM plasmatique dans les jours qui suivent l'événement. Ces observations sont à mettre en parallèle avec d'autres qui ont montré un accroissement du KHPM et de la prékallicréine plasmatique au cours de la grossesse, ces concentrations retournant à la normale dans les jours qui suivent l'accouchement (Adam et al, 1985a). Nos observations plaident donc pour une consommation massive du KHPM associée aux symptômes du syndrome d'embolie par liquide amniotique.

Ces observations soulèvent des questions quant au mécanisme de libération des kinines *in vivo*. S'agit-il d'une activation de la voie intrinsèque de la coagulation, de la fibrinolyse, ou de la voie extrinsèque de la coagulation? Des études *in vitro* seront nécessaires pour étudier le rôle kininogène du liquide amniotique et son contenu en cellules épithéliales, ces cellules étant particulièrement riches en facteur tissulaire susceptible d'activer le facteur VII de la coagulation, lui-même responsable de l'activation du facteur X et du facteur II impliqués dans le système extrinsèque de la coagulation (Petroianu et al, 2000; Osterud et Bjorklid, 2001). Des études récentes du laboratoire montrent en effet, un pouvoir kininogène *in vitro* de ces 2 derniers facteurs. Nous ne pouvons pas exclure non plus un rôle de la fibrinolyse (Molinaro et al, 2002b).

Nous avons donc consacré la deuxième partie de notre mémoire au rôle kininogène de la plasmine que nous comparons à celui de la kallicréine plasmatique. Ces travaux complètent ceux de Molinaro et collaborateurs qui avaient montré que l'incubation du plasma humain en présence de tPA à une concentration pharmacologiquement active conduit à la libération de kinines (BK et Des-Arg⁹-BK immunoréactives) et ce avec une cinétique différente de celle de la kallicréine plasmatique lors de l'activation du système de contact plasmatique (Molinaro et al, 2002b). Nous montrons que la plasmine est capable d'hydrolyser *in vitro* le KHPM et d'en libérer non seulement la BK, mais aussi la Des-Arg⁹-BK.

Ainsi, ces observations montrent pour la première fois que la Des-Arg⁹-BK n'est pas seulement qu'un métabolite mineur de la BK, mais qu'elle peut être libérée directement à partir du KHPM kininogène. Pour la première fois également, nous mettons en évidence la présence de l'agoniste B₁ lors de l'action protéolytique de la kallibréine plasmatique sur le KHPM. Dans ce cas cependant, il s'agit d'une voie mineure puisque le pourcentage d'hydrolyse représente 8% de celui de la BK. Ces observations doivent être interprétées en regard des caractéristiques enzymatiques de ces 2 protéases à sérine pour lesquelles a été précisé le K_m ainsi que leur spécificité. Finalement, la nature de la BK et de la Des-Arg⁹-BK immunoréactives libérées a pu être confirmée par HPLC.

La BK a été considérée responsable de la symptomatologie inflammatoire locale accompagnant l'AO. Cependant, notre laboratoire a montré que les patients hypertendus traités par un iECA et ayant présenté un AO dévoilent au niveau de leur plasma, une activité diminuée de l'APP associée à l'augmentation de Des-Arg⁹-BK lors de l'activation du système de contact *in vitro* (Adam et al, 2002; Molinaro et al, 2002a).

Jusqu'à ce jour, aucune investigation consacrée au métabolisme des kinines n'a été appliquée à l'AOH, dont la seule cause est considérée être un déficit quantitatif (AOH de type I) ou qualitatif (AOH de type II) en C1INH. L'absence de cette antiprotéase conduit à l'activation incontrôlée du système de contact plasmatique. Nous appliquons pour la première fois une approche expérimentale, développée au laboratoire, aux échantillons de plasma de patients atteints d'AOH de type I et de type II traités ou non par le Danatrol[®]. Pour les patients atteints d'AOH de type I, l'activité de l'ECA plasmatique est significativement plus élevée lorsque comparée aux patients atteints d'AOH de type II et à la population de référence. Nous n'avons pu corréler cette activité avec d'autres paramètres cinétiques, dont la T_{1/2} de la BK qui est significativement plus élevée chez tous les patients atteints d'AO comparativement à la population de référence et donc, nous n'avons pas d'explication à ce résultat. Le Danatrol[®] par contre, entraîne une augmentation significative de l'activité de l'APP plasmatique chez les patients atteints d'AOH de type I. Comme montré précédemment (Adam et al, 2002; Molinaro et al, 2002a), nous retrouvons une

relation inverse entre le niveau d'activité de l'APP et la $T_{1/2}$ plasmatique de la Des-Arg⁹-BK.

CONCLUSION

Dans ce mémoire de maîtrise, nous avons exploré 3 problèmes pour mieux comprendre le rôle du système kallibréines-kininogènes-kinines et en particulier celui de la BK et de la Des-Arg⁹-BK en pathologie humaine. Ainsi, nous avons étudié 1) le pouvoir kininogène du plasma lors du syndrome d'embolie par liquide amniotique chez une patiente, 2) le pouvoir kininogène de la fibrinolyse et 3) le métabolisme plasmatique des kinines chez des patients atteints d'AOH de type I et de type II, traités ou non par le Danatrol[®].

Pour la première fois, nous avons mis en évidence une consommation massive du KHPM lors du syndrome d'embolie par liquide amniotique. Cette importante hydrolyse est donc associée aux symptômes de ce syndrome. De plus, nous avons démontré que la plasmine hydrolyse le KHPM pour libérer la BK, mais aussi la Des-Arg⁹-BK. Nous avons comparé les résultats avec ceux obtenus pour la kallibréine plasmatique, qui elle aussi hydrolyse le KHPM pour libérer la BK et la Des-Arg⁹-BK. Nous avons ainsi établi pour la première fois que le métabolite actif de la BK peut être libéré directement à partir du KHPM kininogène. Finalement, nous avons présenté l'effet du Danatrol[®] sur la hausse de l'activité de l'APP plasmatique chez les patients atteints d'AOH de type I. Cette hausse d'activité a pu être corrélée de façon inverse à la T_{1/2} de la Des-Arg⁹-BK.

Ces observations *in vitro*, mêmes préliminaires présentent un intérêt clinique considérable. En effet, elles pourraient constituer la base d'investigations nouvelles pour répondre à des questions non résolues à ce jour, comme la physiopathologie du syndrome d'embolie par liquide amniotique, ou encore le rôle des kinines et en particulier celui de la Des-Arg⁹-BK dans la coagulation intravasculaire disséminée accompagnée ou non d'un choc septique.

BIBLIOGRAPHIE

Abelous JE, Bardier E. (1909) *Les substances hypotensives de l'urine humaine normale*. Comptes-Rendus de la Société de Biologie (Paris). 66 : p.511-512

Adam A, Albert A, Boulanger J, Genot D, Demoulin A, Damas J. (1985a) *Influence of oral contraceptives and pregnancy on constituents of the kallikrein-kininogen system in plasma*. Clinical Chemistry. 31 (9) : p.1533-1536

Adam A, Albert A, Calay G, Closset J, Damas J, Franchimont P. (1985b) *Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values*. Clinical Chemistry. 31 (3) : p.423-426

Adam A, Cugno M, Molinaro G, Perez M, Lepage L, Agostoni A. (2002) *Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors*. The Lancet. 359 (9323) : p.2088-2089

Barker PE, Shipp MA, D'Adamio L, Masteller EL, Reinherz EL. (1989) *The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-27)*. Journal of Immunology. 142 : p.283-287

Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. (1992) *Bioregulation of kinins : kallikreins, kininogens and kininases*. Pharmacological Review. 44 (1) : p.1-80

Binkley KE, Davis AE III. (2000) *Clinical, biochemical and genetic characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 106 (3) : p.546-550

Binkley KE, Davis AE III. (2003) *Estrogen-dependent inherited angioedema*. Transfusion and Apheresis Science. 29 : p.215-219

Blais C Jr, Couture R, Drapeau G, Colman RW, Adam A. (1997) *Involvement of endogenous kinins in the pathogenesis of peptidoglycan-induced arthritis in the Lewis rat*. Arthritis and Rheumatism. 40 : p.1327-1333

Blais C Jr, Marc-Aurele J, Simmons WH, Loute G, Thibault P, Skidgel RA, Adam A. (1999a) *Des-Arg⁹-bradykinin metabolism in patients who presented hypersensitivity reactions during hemodialysis: role of serum ACE and aminopeptidase P*. Peptides. 20: p.421-430

Blais C Jr, Rouleau JL, Brown NJ, Lepage Y, Spence D, Munoz C, Friberg J, Geadah D, Gervais N, Adam A. (1999b) *Serum metabolism of bradykinin and des-Arg⁹-bradykinin in patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema*. Immunopharmacology. 43: p.293-302

Brown NJ, Nadeau JH, Vaughan DE. (1997) *Selective stimulation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo by infusion of bradykinin*. Thrombosis and haemostasis. 77 (3): p.522-525

Brown NJ, Vaughan DE. (1998) *Angiotensin-converting enzyme inhibitors*. Circulation. 97: p.1411-1420

Campbell D. (2003) *Vasopeptidase inhibition : a double-edged sword?*. Hypertension. 41 (3) : p.1383-1389

Cheung PP, Cannizzaro LA, Colman RW. (1992) *Chromosomal mapping of human kininogen gene (KNG) to 3q26 → qter*. Cytogenetics and Cell Genetics. 59 : p.24-26

Chung DW, Fujikawa K, McMullen BA, Davie EW. (1986) *Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats*. Biochemistry. 25 : p.2410-2417

Clark SL, Pavlova Z, Greenspoon J, Horenstein J, Phelan JP. (1986) *Squamous cells in the maternal pulmonary circulation*. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 154 (1): p.104-109

Clark SL, Hankins GDV, Dudley DA, Dildy GA, Porter GF. (1995) *Amniotic fluid embolism: Analysis of the National Registry*. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 172 (4 pt 1): p.1158-1169

Collen D. (1999) *The plasminogen (fibrinolytic) system*. Thrombosis and Haemostasis. 82 (2) : p.259-270

Colman RW, Schmaier AH. (1997) *Contact system: A vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive and proinflammatory attributes*. Blood. 90 (10): p.3819-3843

Cugno M, Cicardi M, Botasso B, Coppola R, Paonessa R, Mannucci PM, Agostoni A. (1997) *Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies*. Blood. 89 (3) : p.3213-3218

Cugno M, Nussberger J, Cicardi M, Agostoni A. (2003) *Bradykinin and the pathophysiology of angioedema*. International Immunopharmacology. 3 : p.311-317

Cunningham GF, Gant NF, Leveno KJ, Gelstrap LC, Hawth JC, Wenstrom KD. (2001) *Obstetrical haemorrhage*. In: Cunningham GF, Gant NF, Leveno KJ, Gelstrap LC, Hawth JC, Wenstrom KD, editors. *Williams Obstetrics*. New York: McGraw-Hill

Cyr M, Lepage Y, Blais C Jr, Gervais N, Cugno M, Rouleau JL, Adam A. (2001) *Bradykinin and des-Arg⁹-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma*. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 281 (1): p.H275-283

Davis AE III, Aulak KS, Zahedi K, Bissler JJ, Harrison RA. (1993) *C1 Inhibitor*. *Methods in enzymology*. Academic Press : London : 223 : p.97-120

Davis AE III, Tosi M. (2002) *C1 Inhibitor*. In: Creighton TE editor. *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*. John Wiley & sons, Inc : p.842

Davis AE III. (2003) *The pathogenesis of hereditary angioedema*. *Transfusion and Apheresis Science*. 29 : p.195-203

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

Décarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, Adam A. (1996) *Serum interspecies differences in the metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹]BK: influence of enalaprilat*. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 270 (39) : p.H1340-H1347

Deddish PA, Skidgel RA, Kriho VB, Li XY, Becker RP, Erdös EG. (1990) *Carboxypeptidase M in Madin-Darby canine kidney cells. Evidence that carboxypeptidase M has a phosphatidylinositol glycan anchor.* The Journal of Biological Chemistry. 265 : p.15083-15089

Drapeau G, DeBlois D, Marceau F. (1991) *Hypotensive effects of Lys-desArg⁹-bradykinin and metabolically protected agonists of B₁ or B₂ receptors for kinins.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 259 : p.997-1003

Duan Q, Nikpoor B, Molinaro G, Meijer IA, Rochefort D, Saint-Onge J, Foroud T, Flury L, Brown NJ, Gainer JV, Dubé MP, Rouleau JL, Agostoni A, Cugno M, Simon P, Clavel P, Potier J, Wehbe B, Benarbia S, Marc-Aurèle J, Chanard J, Adam A, Rouleau GA. (2004) *Genetic investigation of acute adverse reactions associated with angiotensin I-converting enzyme inhibitors. Variants in the XPNPEP2 gene are associated with angioedema induced by angiotensin I-converting enzyme inhibitors.* American Society of Human Genetics. Annual Meeting, October 26-30, Toronto, Canada.

Erdös EG, Renfrew AG, Sloane EM, Wohler JR. (1963) *Enzymatic studies on bradykinin and similar peptides.* Annals of the New York Academy of Sciences. 104 : p.222-235

Erdös EG. (1979) *Kininases.* In: Bradykinin, kallidin and kallikrein. Handbook of experimental pharmacology. Springer-Verlag, Heidelberg. : p.427-487

Erdös EG, Skidgel RA. (1989) *Neutral endopeptidase 24.11-enkephalinase and related regulators of peptide hormones.* FASEB. 3 : p.145-151

Erdös EG. (1990) *Some old and new ideas on kinin metabolism.* Journal of Cardiovascular Pharmacology. 15 (Suppl.6) : p.S20-S24

Erdös EG, Skidgel RA. (1997) *Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease*. In : Farmer SG, ED. Handbook of immunopharmacology : The kinin system. Academic Press : London : p.111-141

Farsetti A, Misiti S, Citarella F, Felici A, Andreoli M, Fantoni A, Sacchi A, Pontecorvi A. (1995) *Molecular basis of estrogen regulation of Hageman factor XII gene expression*. Endocrinology. 136 : p.5076-5083

Faussner A, Bathon JM, Proud D. (1999) *Comparison of the responses of B₁ and B₂ kinin receptors to agonist stimulation*. Immunopharmacology. 45 (1-3) : p.13-20

Fossum S, Hoem NO, Johannesen S, Korpberget M, Nylund E, Sandem S, Briseid K. (1994) *Contact factors in plasma from women on oral contraception - significance of factor XI for the measured activity of factor XII*. Thrombosis Research. 74 : p.477-478

Frey EK, Kraut H. (1928) *Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung*. Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie. 133 : p.1-56

Fuhrer G, Gallimore MJ, Heller W, Hoffmeister HE. (1990) *FXII*. Blut. 61 : p.256-266

Gafford JT, Skidgel RA, Erdös EG, Hersh LB. (1983) *Human kidney enkephalinase, a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides*. Biochemistry. 22 : p.3265-3271

Gebhard W, Matthias S, Eulitz M. (1989) *cDNA cloning and complete primary structure of the small, active subunit of human carboxypeptidase N*. European Journal of Biochemistry. 178 : p.603-607

Ghebrehiwet B, Randazzo BP, Dunn JT, Silverberg M, Kaplan AP. (1983) *Mechanisms of activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment*. Journal of Clinical Investigation. 71 : p.1450-1455

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. (2000) *Immunology, 4th edition*. WH Freeman and Company, New York, New York and Basingstoke

Gordon EM, Ratnoff OD, Saito H, Donaldson VH, Pensky J, Jones PK. (1980) *Rapid fibrinolysis, augmented Hageman factor (factor XII) titres and decreased C1 esterase inhibitor titres in women taking oral contraceptives*. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 96 : p.762-769

Gutowski S, Smrcka A, Nowak L, Wu DG, Simon M, Sternweis PC. (1991) *Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate hydrolysis by hormones*. The Journal of Biological Chemistry. 266 : p.20519-20524

Hill MD, Barber PA, Takahashi J, Demchuk AM, Feasby TE, Buchan AM. (2000) *Anaphylactoid reactions and angioedema during alteplase treatment of acute ischemic stroke*. Canadian Medical Association Journal. 162 (9) : p.1281-1284

Huang HM, Toral-Barza L, Gibson GE. (1991) *Interactions between inositol phosphates and cytosolic free calcium following bradykinin stimulation in cultured human skin fibroblasts*. Biochimica et Biophysica Acta. 1091 (3) : p.409-416

Hubert C, Houot AM, Corbol P, Soubrier F. (1991) *Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene*. The Journal of Biological Chemistry. 266 (23) : p.15377-15383

- Inokushi JI, Nagamatsu A. (1981) *Tripeptidyl carboxypeptidase activity of kininase II (angiotensin-converting enzyme)*. *Biochimica Biophysica Acta*. 662 : p.300-307
- Jaspard E, Alhenc-Gelas F. (1995) *Catalytic properties of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme on the cell surface*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 211 : p.528-534
- Johnson AR, Ashton J, Schulz W, Erdös EG. (1985) *Neutral metallopeptidase in human lung tissue and cultured cells*. *The American Review of Respiratory Disease*. 132 : p.564-568
- Ju H, Venema VJ, Liang H, Harris MB, Zou R, Venema RC. (2000) *Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae*. *The Biochemical Journal*. 351 : p.257-264
- Kaplan AP, Silverberg M. (1987) *The coagulation-kinin pathway of human plasma*. *Blood*. 70 (1) : p.1-15
- Kaplan AP. (2001) *C1 inhibitor deficiency: hereditary and acquired forms*. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 11 (4) : p.211-219
- Kas K, Schoenmakers EF, Van de Ven WJ. (1995) *Physical map location of the human carboxypeptidase M gene (CPM) distal to D12S375 and proximal to D12S8 at chromosome 12q15*. *Genomics*. 30 (2) : p.403-405

Kim KS, Kumar S, Simmons WH, Brown NJ. (2000) *Inhibition of aminopeptidase P potentiates wheal response to bradykinin in angiotensin-converting enzyme inhibitor-treated humans*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 292 : p.295-298

Kraut H, Frey EK, Bauer E. (1928) *Über ein neues Kreislaufhormon*. II. Mitteilung. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie. 175 : p.97-114

Kraut H, Frey EK, Werle E. (1930) *Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse*. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie. 189 : p.97-106

Lepow IH, Ratnoff OD, Rosen FS, Pillemer L. (1956) *Observations on a pro-esterase associated with partially purified first component of human complement (C'1)*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 92 (1) : p.32-37

Levin Y, Skidgel RA, Erdös EG. (1982) *Isolation and characterisation of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase I)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 79 : p. 4618-4622

Marceau F and Regoli D. (1991) *Kinins receptors of B₁ type and their antagonists*. In: Bradykinin antagonists, basic and clinical aspects. Editor RM Burch, Marcel Dekker, New York: p.33-49

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

Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. (1998) *The B₁ receptors for kinins*. Pharmacological Reviews. 50 : p.357-386

Margolius HS. (1999) *Tissue kallikreins. Structure, regulation and participation in mammalian physiology and disease.* Clinical Reviews in Allergy and Immunology. 16 : p.337-349

McCarthy DA, Potter DE, Nicolaidis ED. (1965) *An in vivo estimation of the potencies and half-lives of synthetic bradykinin and kallidin.* The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 148 : p.117-122

Meijers JCM, Kanters DHAJ, Vlooswijk RAA, Van Erp HE, Hessing M, Bouma BN. (1988) *Inactivation of human plasma kallikrein and factor XIa by protein C inhibitor.* Biochemistry. 27 : p.4231-4237

Meijers JCM, McMullen BA, Bouma BN. (1992) *The contact activation proteins: a structure / function overview.* Agents Actions. 38 (Pt.2) : p.219-230

Melamed J, Alper CA, Cicardi M, Rosen FS. (1986) *The metabolism of C1 inhibitor and C1q in patients with acquired C1-inhibitor deficiency.* Journal of Allergy and Clinical Immunology. 77 : p.322-326

Milton JL. (1876) *On giant urticaria.* Edinburgh Medical Journal. 22: p.513-514

Molinaro G, Cugno M, Perez M, Lepage Y, Gervais N, Agostoni A, Adam A. (2002a) *Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema is characterized by a slower degradation of des-arginine⁹-bradykinin.* The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 303: p.232-237

Molinaro G, Gervais N, Adam A. (2002b) *Biochemical basis of angioedema associated with recombinant tissue plasminogen activator treatment: An in vitro experimental approach*. Stroke. 33 (6) : p.1712-1716

Molinaro G, Boileau G, Adam A. (2004) *Aminopeptidase P and vasoactive peptides. From fundamental aspects to clinical interests*. In: Aminopeptidases in Biology and Disease. Editor: Hooper and Lendeckel, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Chapter 12 : p.251-269

Moore JW et Pearson RG. (1981) *Kinetics and mechanisms*. New York: Wiley : p.284-296

Müller-Esterl W, Iwanaga S, Nakanishi S. (1986) *Kininogens revisited*. Trends in Biochemical Sciences.11 : p.336-339

Ni A, Chao L, Chao J. (1998) *Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation*. The Journal of Biological Chemistry. 273 (5) : p.2784-2791

Nielsen EW, Johansen HT, Hogasen K, Wuillemin W, Hack CE, Mollnes TE. (1996) *Activation of the complement, coagulation, fibrinolytic and kallikrein-kinin systems during attacks of hereditary angioedema*. Scandinavian Journal of Immunology. 44 : p.185-192

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, Von Heijne G. (1997) *Identification of prokaryotic and eucaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites*. Protein Engineering. 10 (1) : p.1-6

Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. (1998) *Plasma bradykinin in angio-edema*. The Lancet. 351 : p.1693-1697

Osler W. (1888) *Hereditary angio-neurotic oedema*. The American Journal of the Medical Sciences. 95: p.362-367

Osterud B, Bjorklid E. (2001) *The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation*. Seminars in Thrombosis and Haemostasis.27 : p.605-617

Petroianu GA, Toomes LM, Maleck WM, Friedberg C, Bergler WF, Rufer R. (2000) *Administration of autologous fetal membranes: Effects on the coagulation in pregnant mini-pigs*. Pediatric Critical Care Medicine. 1: p.65-71.

Pixley RA, Colman RW. (1997) *The kallikrein-kinin system in sepsis syndrome*. In : Farmer SG, ED. Handbook of immunopharmacology : The kinin system. Academic Press : London : p.173-186

Raymond P, Drapeau G, Raut R, Audet R, Marceau F, Ong H, Adam A. (1995) *Quantification of Des-Arg⁹-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay : application to its kinetic profile during plasma activation*. Journal of Immunological Methods. 180 (2) : p.247-257

Regoli D, Barabé J. (1980) *Pharmacology of bradykinin and related kinins*. Pharmacological Reviews. 32 : p.1-46

Regoli D, Rhaleb NE, Drapeau G, Dion S. (1990) *Kinin receptor subtypes*. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 15 (Suppl.6) : p.S30-S38

Rice J. (1995) *Mathematical statistics and data analysis*. Belmont, Duxbury Press

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. (1990) *An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels.* Journal of Clinical Investigation. 86 (4): p.1343-1346

Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. (1949) *Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venom and by trypsin.* American Journal of Physiology. 156 : p.261-273

Ryan JW, Papapetropoulos A, Ju H, Denslow ND, Antonov A, Virmani R, Kolodgie FD, Gerrity RG, Catravas JD. (1996) *Aminopeptidase P is disposed on human endothelial cells.* Immunopharmacology. 32 (1-3) : p.149-152

Saito H. (1980) *The contact system in health and disease.* Year book medical publisher Inc.: p.215-33

Salvesen G, Parkes C, Abrahamson M, Grubb A, Barrett AJ. (1986) *Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases.* The Biochemical Journal. 236 : p.429-434

Sigler C, Annis K, Cooper K, Haber H, Van de Carr S. (1997) *Examination of baseline levels of carboxypeptidase N and complement components as potential predictors of angioedema associated with the use of an angiotensin converting enzyme inhibitor.* Archives of Dermatology. 133 : p.972-975

Simmons WH and Orawski AT. (1992) *Membrane-bound aminopeptidase P from bovine lung. Its purification, properties, and degradation of bradykinin.* Journal of Biological Chemistry. 267 : p.4897-4903

Skidgel RA, Johnson AR, Erdös EG. (1984) *Hydrolysis of opioid hexapeptides by carboxypeptidase N (kininase I). Presence of carboxypeptidases in cell membrane.* Biochemical Pharmacology. 33 : p.3471-3478

Skidgel RA. (1988) *Basic carboxypeptidases: regulators of peptides hormones activity.* Trends in Pharmacological Sciences. 9 : p.299-304

Skidgel RA, Erdös EG. (1993) *Biochemistry of angiotensin converting enzyme.* In: The Renin Angiotensin System. Vol.1 Gower Medical Publishers, London : p.10.1-101.10

Skidgel RA. (1992) *Bradykinin-degrading enzymes: structure, function, distribution and potential roles in cardiovascular pharmacology.* Journal of Cardiovascular Pharmacology. 20 : p.S4-S9

Skidgel RA. (1995) *Human carboxypeptidase N: lysine carboxypeptidase.* Methods in Enzymology. 248 : p.653-663

Sprinkle TJ, Stone A, Venema RC, Denslow ND, Caldwell C, Ryan JW. (1998) *Assignment of the membrane-bound human aminopeptidase P gene (XPNPEP2) to chromosome Xq25.* Genomics. 50 : p.114-116

Sprinkle TJ, Caldwell C, Ryan JW. (2000) *Cloning chromosomal sublocalisation of the human soluble aminopeptidase P gene (XPNPEP1) to 10q25.3 and conservation of the putative proton shuttle and metal ligand binding sites with XPNPEP2.* Archives of Biochemistry and Biophysics. 378(1) : p.51-56

Tan F, Weerasinghe DK, Skidgel RA, Tamei H, Kaul RK, Roninson IB, Schilling JW, Erdos EG. (1990) *The deduced protein sequence of the human carboxypeptidase N high molecular weight subunit reveals the presence of leucine-rich tandem repeats*. The Journal of Biological Chemistry. 265 :p.13-19

Thompson RE, Mandle R, Kaplan AP. (1977) *Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma*. The Journal of Clinical Investigation. 60 : p.1376-1380

Tosi M, Duponchel C, Bourgarel P, Colomb M, Meo T. (1986) *Molecular cloning of human C1 inhibitor: sequence homologies with alpha 1-antitrypsin and other members of the serpins superfamily*. Gene. 42 (3) : p.265-272

Turner AJ, Hyde RJ, Lim J, Hooper NM. (1997) *Structural studies of aminopeptidase P. A novel cellular peptidase*. Advances in Experimental Medicine and Biology. 421 : p.7-16

Yang HYT, Erdős EG, Levin Y. (1970) *A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin*. Biochimica Biophysica Acta. 214 : p.374-376

Zahedi K, Prada AE, Davis AE 3rd. (1993) *Structure and regulation of the C1 inhibitor gene*. Behring Institute Mitteilungen. 93 : p.115-119

ANNEXE

Robillard J, Gauvin F, Molinaro G, Leduc L, Adam A, Rivard GE. (2005) *The syndrome of amniotic fluid embolism: A potential contribution of bradykinin*. Journal of Obstetrics and Gynecology [sous presse]

The syndrome of amniotic fluid embolism: A potential contribution of bradykinin

Josée ROBILLARD, MSc,^a France GAUVIN, MD,^b Giuseppe MOLINARO, PhD,^a Line LEDUC, MD,^c Albert ADAM, PhD,^a Georges E. RIVARD, MD^{b,*}

^aFaculté de Pharmacie, Université de Montréal; ^bDépartement de Pédiatrie, Université de Montréal; ^cDépartement d'Obstétrique-Gynécologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

* **Reprint requests:** Georges E. Rivard, Division d'hématologie-oncologie, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte-Ste-Catherine, Montreal, QC H3T 1C5, Canada; [REDACTED]

[REDACTED] Tel : (514) 345-4931 ext. 4639 Fax : (514) 345-4884

Condensation: Blood specimen obtained from one patient during hypotensive shock associated with the syndrome of amniotic fluid embolism demonstrated complete consumption of plasma bradykinin generation capacity.

The syndrome of amniotic fluid embolism: A potential contribution of bradykinin

Josée Robillard, MSc,^a France Gauvin, MD,^b Giuseppe Molinaro, PhD,^a Line Leduc, MD,^c
Albert Adam, PhD,^a Georges E. Rivard, MD^{b,*}

Abstract

Objective: The syndrome of amniotic fluid embolism (AFE) is a potentially fatal complication of pregnancy. The pathophysiology of this condition is not well known. We had the opportunity of obtaining sequential blood specimens during the full course of a AFE. The objective of this study was to determine if bradykinin is involved in AFE.

Study design: Plasma bradykinin generating capacity was measured at several time points during the course of this AFE.

Results: Plasma bradykinin generating capacity was quickly and massively consumed at time of initial severe hypotension and cardiac arrest, in parallel with massive consumption coagulopathy.

Conclusion: This study clearly documents a potential role for generation of bradykinin in the pathophysiology of AFE.

Keywords: Amniotic fluid embolism, Bradykinin, DIC, Shock.

Introduction

The syndrome of amniotic fluid embolism (AFE) is a rare but catastrophic complication of pregnancy.¹ The incidence ranges from 1/8,000 to 1/80,000 and the associated mortality rate is up to 90%.² The clinical presentation of AFE is one of sudden dyspnea and hypotension often followed within minutes by cardiorespiratory arrest, and if the patient can be resuscitated, massive consumption coagulopathy with haemorrhagic shock. The syndrome appears to be initiated after maternal intravascular exposure to various foetal material contained in amniotic fluid.² Many hypotheses have been proposed to explain the pathophysiology of this condition.¹⁻³ The clinical diagnosis remains one of exclusion.⁴

Having in mind the hypothesis that bradykinin (BK) could contribute to the hypotension associated with AFE, we took the opportunity of collecting sequential blood specimens throughout the full course of a severe case of AFE, and we measured plasma bradykinin generating capacity at different time points.

BK is the prototype of kinins, a family of powerful vasoactive peptides.⁵ In plasma, BK is released from its precursor high molecular weight kininogen (HK) by plasma kallikrein which originates from prekallikrein (pKK) during the activation of the contact system of blood coagulation.⁶ This nonapeptide exerts its effects by stimulating the B₂ receptor of kinins on endothelial cells.⁷ We have previously shown that these proteins are highly sensitive to estrogens, as both plasma immunoreactive HK concentration and pKK activity increase dramatically after the 16th week of pregnancy, and return within reference range values 48 hours postpartum.⁸ We herein demonstrate the acute and massive consumption of plasma BK precursors in the early phase of a clinically diagnosed³ case of AFE. We believe that BK and/or its metabolites contributed to the severe hypotension of our patient.

Materials and methods

Case presentation

A 30 year-old woman was admitted to the hospital for vaginal bleeding at 27 weeks of gestation. She had two previous caesarean sections, one for malposition of the foetus and one for placenta previa. Otherwise, she had no medical problem. She received

betamethasone on admission, as per our protocol to induce maturation of her premature foetus' lungs. A diagnosis of placenta previa percreta was established. She stayed in the hospital until her 31st week of gestation. At that time, bleeding became more significant, and the decision was made to proceed with a delivery by caesarean section. Before surgery her haemoglobin was 118 g/L and her coagulation profile was normal. The caesarean section was done under epidural anaesthesia. The uterus was exposed and an incision was done through the placenta. The baby was delivered safely (APGAR 8-8-8). Immediately after, the patient complained of dizziness. She suddenly became bradycardic with escape rhythm, and severely hypotensive with unmeasurable blood pressure. She was intubated. Cardiac massage was initiated. She then went into ventricular fibrillation. After 5 minutes of full cardiopulmonary resuscitation, she went back to a sinus rhythm, but her blood pressure was still very low (60/20). On the surgical site, massive bleeding was noticed. She was given fluid and many transfusions of packed red cells, platelets, fresh frozen plasma, and cryoprecipitate. A jugular vein catheter was installed which showed a low central venous tension. Initial laboratory results showed a massive drop in haemoglobin level (45 g/L), severe thrombocytopenia (platelet: $14 \times 10^9/L$) and severe coagulopathy with unmeasurable fibrinogen (Table I). During the next hour, she was resuscitated with multiple transfusions while the surgeons were performing emergency hysterectomy. After ninety minutes of resuscitation procedures, her haemodynamic status was considered stabilized with normal blood pressure. Surgery was complicated by ongoing bleeding secondary to coagulopathy. Throughout this 6 hour surgery, blood loss was estimated at 28 litres. Patient received a total of 3 litres of crystalloids, as well as 36 units of packed red cells, 20 units of platelets, 19 units of fresh frozen plasma, and 2 units of cryoprecipitate. By the end of surgery, all the inotropes were weaned. Her haemoglobin level was 83 g/L, platelet count $54 \times 10^9/L$, and coagulation profile was normal, except for moderately elevated D-dimers. She was extubated the next morning and her neurological status was completely normal. She never developed renal insufficiency, acute respiratory distress syndrome or multiple organ dysfunction syndrome. She was discharged from the hospital two weeks after delivery and she and her baby have remained in perfect health, more than one year after the event.

Verbal informed consent was obtained from the patient, after she had recuperated from critical status, for further studying the pathophysiology of her AFE-related hypotensive shock. Given the clinical context of this investigation, this verbal informed consent was considered appropriate by our IRB.

Blood samples

Multiple blood samples were obtained for evaluation of coagulation and haematological parameters, during and immediately after surgery. Unused citrated plasma specimens were recentrifuged at 10,000 g for 10 minutes and platelet poor plasma were stored at -80°C until assayed

Materials

All chemical reagents were from Sigma (Oakville, ON, Canada) and were of the best analytical grade available. Polyclonal antibodies to BK⁹ and HK respectively were produced in our laboratory.⁸ Secondary goat anti-rabbit HRPO-conjugated antibodies were from BioRad (Hercules, CA, USA).

Laboratory testing

Routine coagulation parameters: Measured with STACompact Coagulation Analyser® (Stago, Asnières, France).

Kinin forming capacity of plasma: Endogenous BK released during the activation of the coagulation contact system was measured as previously described.¹⁰ Briefly, after preincubation of plasma (37°C, 15 minutes) with an of angiotensin converting enzyme inhibitor (enalaprilate, 520nM), the contact system was activated by incubation at 37°C with glass beads (0,3g/ml of plasma). The reaction was stopped at different time points (0,1,2,3,6,12,24,36,48, and 60 minutes) by adding cold anhydrous ethanol at a final 80% v/v concentration. After incubation at 4°C for at least 15 minutes and centrifugation (1750 g, 4°C, 15 minutes), the supernatant was evaporated to dryness and redissolved in initial plasma volume with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7,4 containing 100 mM NaCl and 0,05%

Tween 20. Immunoreactive BK was quantified as previously described.^{9, 11} The total amount of BK released during the 60 minutes incubation period was calculated from the area under the curve (AUC), and results were compared to our published normal reference values.¹⁰

Immunoblotting of high molecular weight kininogen: Plasma was diluted 1/300 in Laemmli buffer and run on a 4-15% gradient SDS-PAGE.¹² After electrophoretic transfer of the separated proteins to a nitrocellulose membrane, immunoreactive HK was detected using a Chemilmager System (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA).

Results

Immunoreactive BK released from HK during *in vitro* activation of the contact system

Fig. 1A represents the kinetics of immunoreactive BK released from HK during *in vitro* activation of the contact system. Profiles 1 and 2 (— and - - -) correspond to plasma drawn immediately and 30 minutes after the shock episode, respectively. The AUC of total BK released from plasma obtained at those two time points are 0,5 and 0,7nmoles of HK for 1ml of plasma, respectively. The kinin forming capacity of 1ml of plasma drawn at days 2 and 9 (..... and - . - . -) is higher, reaching respectively 5,5 and 16,3nmoles. As shown in Fig.1B, these values lie within the 1st (samples 1 and 2), 26th (sample 3) and 99th (sample 4) percentiles of a female reference population.¹⁰

Immunoblotting of HK

As shown in Fig. 2, the immunoelectrophoretic pattern of plasma corroborates other evidences of massive consumption of plasma bradykinin forming capacity as no immunoreactive HK could be detected in the plasma drawn immediately after the shock episode (line 1 and 2), but the non hydrolysed kinin precursor reappeared in the day 9 sample (line 4).

Comments

The syndrome of amniotic fluid embolism is a well recognized and potentially fatal complication of pregnancy.¹⁻³ Our patient fulfilled the criteria proposed to gain entry into the national AFE registry.¹ The primary reason for our patient's initial sudden hypotensive shock could be massive haemorrhage, as can be observed with caesarean section for placenta previa percreta.¹³ This is very unlikely as this patient had no history of abnormal bleeding with her two previous caesarean sections (one of which for placenta previa), her coagulation profile was normal prior to this surgery, and her experienced surgeon (LL) had not noticed any abnormal bleeding during the pre-delivery phase of this caesarean section. The acute dyspnea and the sudden cardiac arrest preceded by bradycardia with escape rhythm recorded on the cardiograph happened before the profuse bleeding started. The diagnosis is also supported by the sudden severe hypotension which preceded the profuse blood oozing secondary to the biologically demonstrated massive consumption coagulopathy which is well known in this condition.¹⁻³

We do not have documentation on the BK generating capacity of this patient's plasma prior to her caesarean section but we documented that her plasma quickly behaved normally in our assay after surgery, suggesting that, outside of her shock, she had normal plasma kinin generating capacity. Our first and most abnormal specimen was obtained within minutes of initiation of the shock, much before transfusion therapy could be considered responsible for the complete loss of plasma bradykinin generating capacity through hemodeletion. Our data clearly demonstrates that our patient massively consumed her plasma BK generating capacity at the same time as she became severely hypotensive and had her cardiac arrest. This timing corresponded to the very moment of expulsion of her foetus through the incised placenta previa percreta. It is tempting to speculate that amniotic fluid gained access to maternal systemic blood vessels through open placental and/or uterine vessels, especially in the context of a placenta percreta where placental blood vessels remain deeply rooted in the uterine wall.¹³ Amniotic fluid is known to contain tissue factor and to be able to activate coagulation through the extrinsic pathway.^{14, 15} The physiological secondary activation of the fibrinolytic system that follows has been demonstrated by us¹⁶ and others⁴ to be able to induce a strong generation of bradykinin and

des-Arg⁹-bradykinin from plasma HK. Moreover, activation of the plasma kallikrein-kinin system has been demonstrated to take place on cell membranes by a membrane-associated cystein protease;¹⁷ the abundant cell membranes present in amniotic fluid could possibly contribute via this pathway to generation of kinin in AFE. Through these mechanisms, acute and massive generation of kinins by amniotic fluid embolization in our patient could explain her acute and severe hypotension associated with complete consumption of her coagulation factors and of her plasma kinin forming capacity.

It could be considered somewhat surprising that this patient, with such an acute and catastrophic AFE, quickly recuperated and did not have pulmonary oedema nor multiple organ failure syndrome. The most likely explanation for this unusually favourable evolution is the very rapid and aggressive replacement therapy with blood products which she received. Indeed, with a pre-surgery established diagnosis of placenta previa percreta, several units of blood products were available in the operating room at time of initiating surgery, and the blood bank had been informed of the case. Rapid plasma therapy replaced her consumed coagulation factors and inhibitors, with correction of her haemostasis, and also supplied angiotensin converting enzyme, aminopeptidase P, and carboxypeptidase N, which quickly inactivated bradykinin and its active metabolites. The rapid clearance of vasodilatory kinins most probably contributed to prevent extravascular leakage with its contribution to the acute respirator distress syndrome and the multiple organ failure syndrome usually observed in severe cases of AFE.¹

In conclusion, we believe that the generation of bradykinin has contributed to the acute and severe cardiovascular collapse associated with the AFE suffered by our patient. We believe that the generation of bradykinin can be added to the list of pathophysiological mediators contributing to the AFE. Further work, especially in animal models injected intravenously with amniotic fluid, needs to be done before we can conclude that bradykinin has a definite role in the pathophysiology of this syndrome.

Acknowledgments

We thank Ms Annick Cormier for her dedicated technical support. This work was supported by Fonds de la Recherche en Santé du Québec (3348) and by Bayer Inc. Canada.

References

1. Clark SL, Hankins GD, Dudley DA, Dildy GA, Porter TF. Amniotic fluid embolism: analysis of the national registry. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1158-67; discussion 1167-9.
2. Cunningham GF, Gant NF, Leveno KJ, Gelstrap LC, Hawth JC, Wenstrom KD. Obstetrical haemorrhage. In: Cunningham GF, Gant NF, Leveno KJ, Gelstrap LC, Hawth JC, Wenstrom KD, eds. *Williams Obstetrics*. New York: McGraw-Hill, 2001.
3. Locksmith GJ. Amniotic fluid embolism. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1999;26:435-44, vii.
4. Ewald GA, Eisenberg PR. Plasmin-mediated activation of contact system in response to pharmacological thrombolysis. *Circulation* 1995;91:28-36.
5. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992;44:1-80.
6. Kaplan AP, Joseph K, Shibayama Y, et al. Bradykinin formation. Plasma and tissue pathways and cellular interactions. *Clin Rev Allergy Immunol* 1998;16:403-29.
7. Hall JM. Bradykinin receptors. *Gen Pharmacol* 1997;28:1-6.
8. Adam A, Albert A, Boulanger J, Genot D, Demoulin A, Damas J. Influence of oral contraceptives and pregnancy on constituents of the kallikrein-kininogen system in plasma. *Clin Chem* 1985;31:1533-6.
9. Decarie A, Drapeau G, Closset J, Couture R, Adam A. Development of digoxigenin-labeled peptide: application to chemiluminoenzyme immunoassay of bradykinin in inflamed tissues. *Peptides* 1994;15:511-8.
10. Cyr M, Lepage Y, Blais C, Jr., et al. Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H275-83.
11. Raymond P, Drapeau G, Raut R, et al. Quantification of des-Arg9-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation. *J Immunol Methods* 1995;180:247-57.

12. Legris F, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Colman R, Adam A. An ultrasensitive chemiluminoenzyme immunoassay for the quantification of human tissue kininogens: application to synovial membrane and cartilage. *J Immunol Methods* 1994;168:111-21.
13. Cunningham GF, Gant NF, Leveno KJ, Gelstrap LC, Hawth JC, Wenstrom KD. Obstetrical haemorrhage. In: Cunningham GF, Gant NF, Leveno KJ, Gelstrap LC, Hawth JC, Wenstrom KD, eds. *Williams Obstetrics*. New York: McGraw-Hill, 2001.
14. Osterud B, Bjorklid E. The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* 2001;27:605-17.
15. Petroianu GA, Toomes LM, Maleck WM, Friedberg C, Bergler WF, Rufer R. Administration of autologous fetal membranes: Effects on the coagulation in pregnant mini-pigs. *Pediatr Crit Care Med* 2000;1:65-71.
16. Molinaro G, Gervais N, Adam A. Biochemical basis of angioedema associated with recombinant tissue plasminogen activator treatment: an in vitro experimental approach. *Stroke* 2002;33:1712-6.
17. Rojkjaer R, Schmaier AH. Activation of the plasma kallikrein/kinin system on endothelial cells. *Proc Assoc Am Physicians* 1999;111:220-7.

Figure Legends

Figure 1. Immunoreactive bradykinin (BK) released from high molecular kininogen during in vitro activation of the contact system. A) Plasma obtained at different time points: — sample 1, at time of shock; _ _ _ _ sample 2, 30 minutes after shock; sample 3, two days after shock; - . - . - sample 4, nine days after shock. B) Normal distribution expressed in area under the curve of generation of bradykinin in normal female controls. 1, 2, 3, 4 correspond to sample numbers in A).

Figure 2. Immuno-electrophoretic pattern of plasma reacted with a polyclonal antibody to high molecular weight kininogen. Line M corresponds to molecular weights markers. HMWK corresponds to native HMWK. Line 1 to 4 represent plasma obtained at the following time points: 1) at time of shock; 2) 30 minutes after shock; 3) 2 days after shock; 4) nine days after shock.

Table I. Summary of relevant laboratory data

Time	Haemoglobin	aPTT	PT	Fibrinogen	D-dimers
Before surgery	118	37.5	14.6	3.31	0.6
Delivery / shock	45	> 250	> 120	Unmeasurable	> 2.00
End of surgery	87	41.6	13.6	2.58	1.62

Normal values	110-140 g/L	29-43 sec	11.5-15 sec	2-4 g/L	< 0.25 µg/ml
----------------------	--------------------	------------------	--------------------	----------------	------------------------

Figure 1

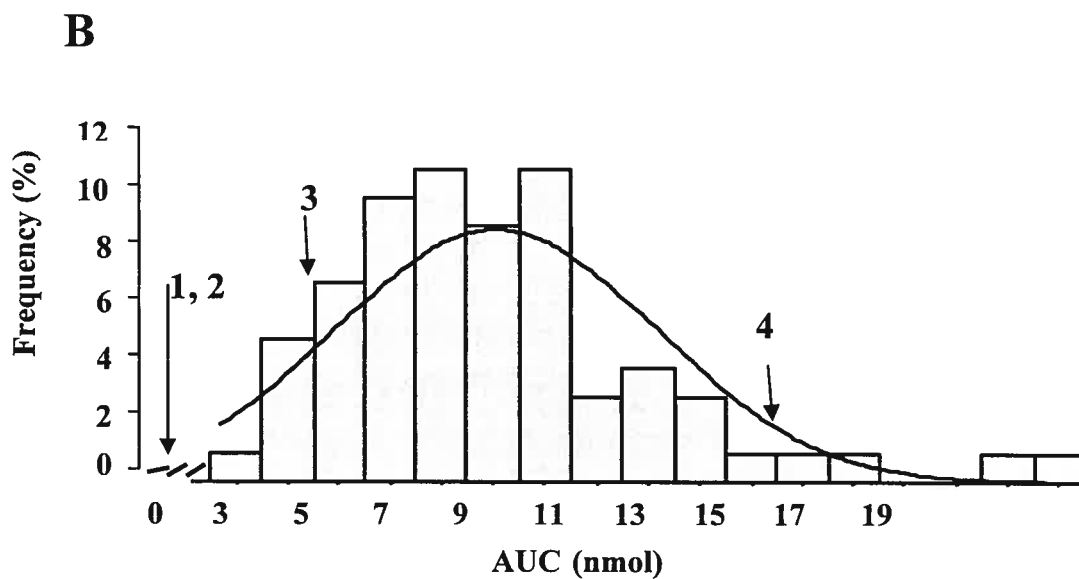
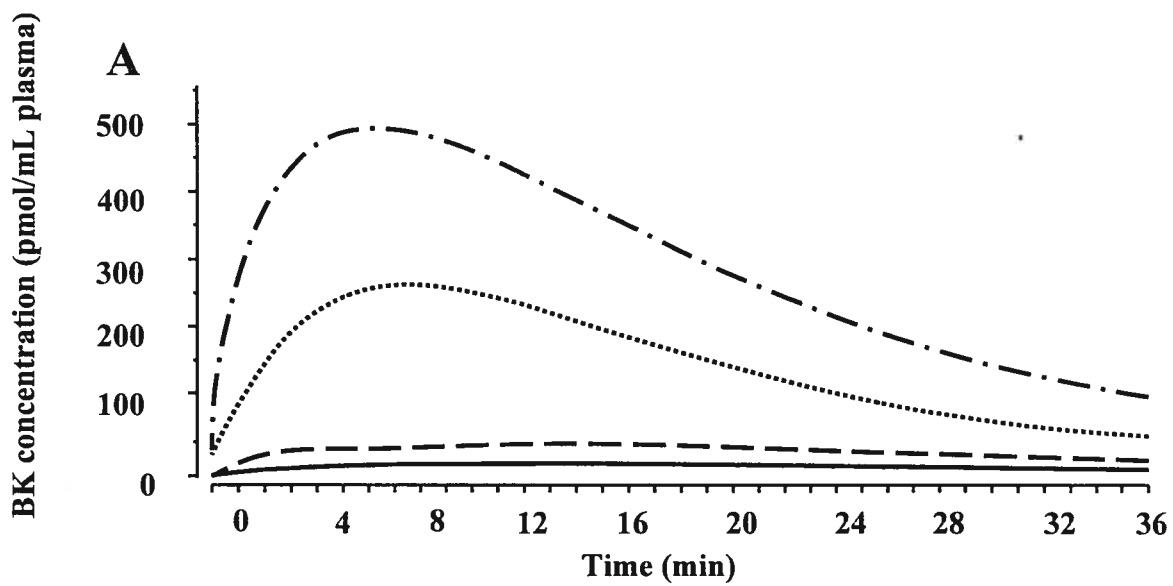


Figure 2

