

Université de Montréal

**Le rôle des kinines, de la substance P et du récepteur B₁
dans la physiopathologie de l'angioedème acquis :
Approche expérimentale et clinique**

Par

Karine Touzin

M. Sc. Pharmaceutiques (Université de Montréal)

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, 2007

© Karine Touzin, 2007



dV
705
U58
2007
v.008

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Le rôle des kinines, de la substance P et du récepteur B₁
dans la physiopathologie de l'angioedème acquis :
Approche expérimentale et clinique

présenté par :

Karine Touzin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-François Bouchard
(président rapporteur)

Albert Adam
(directeur de recherche)

François Marceau
(codirecteur)

Denis Deblois
(Membre du jury)

Résumé

L'angiooedème (AO) est une réaction inflammatoire locale aiguë caractérisée par un gonflement des couches profondes de la peau et/ou des tissus sous-muqueux. L'AO peut être de type héréditaire (type I et II) ou acquis (dû à la prise d'iECA ou d'oestrogènes). Parmi les médiateurs de l'AO, on retrouve la substance P (SP), la bradykinine (BK) et la des-Arg⁹-BK. Après avoir documenté le métabolisme des kinines au niveau du plasma, notre laboratoire a montré que les patients ayant souffert d'un épisode d'AO associé à la prise d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (iECA) présentent, au niveau plasmatique, une anomalie de la dégradation de la des-Arg⁹-BK associée à une activité diminuée ou nulle de l'aminopeptidase P (APP), métallopeptidase impliquée dans l'inactivation de cette kinine.

Notre travail de maîtrise comprend deux parties distinctes. Une première de nature clinique, vise à mieux comprendre la physiopathologie des AO acquis de nature idiopathique ainsi que des AO associés à la prise d'iECA. Pour ce faire, nous documenterons le métabolisme de la BK, de la des-Arg⁹-BK et de la SP au niveau du plasma. Nous doserons aussi l'activité de la dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) et des différentes métallopeptidases incluant l'APP, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), l'aminopeptidase N (APN) et la carboxypeptidase N (CPN), enzymes responsables du métabolisme des kinines et des neurokinines. Une deuxième partie plus fondamentale vise à étudier la régulation de l'expression du récepteur B₁ (B₁R) dans un modèle animal et dans un modèle de culture cellulaire à l'aide de la technique de PCR en temps réel.

Notre travail de maîtrise nous a permis de mettre en évidence la présence d'une anomalie de la dégradation de la BK liée à une diminution d'activité de l'APP et de l'ECA chez un groupe de patients atteints d'AO idiopathique. Nous avons aussi constaté que la présence de facteurs génétiques ou environnementaux diminuant l'activité de la DPPIV pouvait prédisposer les individus à développer un angiooedème acquis (AOA) associé à la prise d'iECA. Finalement, notre étude a

permis de montrer que l'induction du récepteur B₁ par différentes cytokines proinflammatoires était spécifique et pouvait varier selon le type de tissu analysé.

Mots clés : angiooedème, kinines, métabolisme, métallopeptidases, substance P

Abstract

Angioedema (AO) is an acute local inflammatory reaction which is characterized by swelling of the deeper layers of the skin and/or the sub-mucosal tissues. AO can be hereditary (type I or II) or acquired (following the intake of ACEi or estrogen). Among the mediators of AO, substance P (SP), bradykinin (BK) and des-Arg⁹-BK can be found. After having documented the kinin metabolism found in the plasma, our research laboratory has demonstrated that patients having suffered from an AO episode, associated with the intake of Angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi), presented in their plasma, an anomaly in the breakdown of des-Arg⁹-BK associated with an absence or reduction of aminopeptidase P (APP) function. APP is the metallopeptidase associated with the inactivation of the kinin previously mentioned.

Our research is divided into two distinct parts. The first is clinical in nature and aims to better understand the physiopathology of idiopathic AO and acquired AO as well as AO associated with the intake of ACEi. In order to achieve this goal, we will document BK, des-Arg⁹-BK and SP metabolisms found in the plasma. We will also monitor the activities of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) and of the different metallopeptidases including APP, angiotensin converting enzyme (ACE), aminopeptidase N (APN) and carboxypeptidase N (CPN): enzymes responsible of kinin and neurokinin metabolisms. The second part of our research, which is even more fundamental than the first, is aimed at studying the regulation of B₁ receptor (B₁R) expression in an animal test subject and in a cellular environment through real-time PCR techniques.

Our research allowed us to demonstrate the presence of an anomaly in the degradation of BK in relation to a reduction of APP and ACE activity in a group of patients suffering from idiopathic AO. It was also observed that the presence of genetic or environmental factors causing a reduction in DPPIV activity could predispose individuals in developing acquired AO associated with the intake of ACEi. In conclusion, our study showed that induction of the B₁ receptor by different pro-

inflammatory cytokines was a specific process and could vary depending on the type of tissue being analyzed.

Key words: angiooedema, kinin, metabolism, metallopeptidases, substance P

Table des matières

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIV
REMERCIEMENTS	XVIII
I. L'ANGIOEDEME.....	1
1. DÉFINITION.....	1
2. LES DIFFÉRENTS TYPES D'AO.....	1
2.1 L'AO héréditaire (AOH).....	2
2.2 L'AO acquis (AOA)	3
3. LES MÉDIATEURS DE L'AO.....	3
II. LES KININES.....	4
1. DÉFINITION.....	4
2. LES KININOGENES, PRÉCURSEURS DES KININES.....	6
3. LES SYSTÈMES KININO-FORMATEURS	8
3.1 La kalllicréine tissulaire (ou glandulaire) (EC 3.4.21.35).....	8
3.2 La kalllicréine plasmatique (EC 3.4.21.34).....	10
4. LE MÉTABOLISME DES KININES.....	13
4.1 L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA).....	14
4.2 L'aminopeptidase P (APP).....	16
4.3 La carboxypeptidase N (CPN).....	16
4.4 La dipeptidyl peptidase IV (DPPIV).....	17
4.5 L'aminopeptidase N (APN).....	19
4.6 Relation entre les peptidase et l'AO.....	20
5. LES RÉCEPTEURS DES KININES.....	20
5.1 Propriétés communes aux récepteurs B ₁ et B ₂	21
5.1.1 Au niveau génique.....	21
5.1.2 Seconds messagers.....	22
5.1.3 Propriétés pharmacologiques.....	24
5.2 Particularités du récepteur B ₁ (B ₁ R).....	25
5.2.1 Agonistes et antagonistes.....	27
5.3 Particularités du récepteur B ₂ (B ₂ R).....	29
5.3.1 Agonistes et antagonistes.....	29
III. LA SUBSTANCE P.....	30
1. DÉFINITION.....	30

2. SYNTHÈSE	32
3. RÉCEPTEURS ET ACTIVITÉS PHARMACOLOGIQUES	32
4. RÔLE PHYSIOPATHOLOGIQUE	34
5. MÉTABOLISME	35
6. RELATION AVEC LES KININES	36
IV BUT DU TRAVAIL.....	39
V MÉTHODOLOGIE	40
OBJECTIF 1 :	40
1. ÉCHANTILLONS DE PLASMA	40
2. DÉFINITION DE LA DEMI-VIE DE DÉGRADATION DE LA BK ET DE LA DES-ARG ⁹ -BK	41
2.1 Procédure d'incubation	41
2.2 Quantification de la BK et de la des-Arg ⁹ -BK	41
2.3 Paramètres cinétiques	42
3. DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES MÉTALLOPEPTIDASES (APP, ECA ET CPN) RESPONSABLES DU CATABOLISME DE LA BK ET LA DES-ARG ⁹ -BK	42
3.1 L'aminopeptidase P	42
3.2 L'enzyme de conversion de l'angiotensine	43
3.3 La carboxypeptidase N	43
4. DOSAGE DE LA SP DANS LES URINES RECUEILLIES DANS LE DÉCOURS D'UN ÉPISODE D'AO	44
4.1 Échantillons d'urine	44
4.2 Extraction des neurokinines urinaires	44
4.3 Dosage de la SP urinaire	45
4.3.1 Principe du dosage	45
5. TRAITEMENT STATISTIQUE DES RÉSULTATS	45
OBJECTIF 2 :	46
1. ÉCHANTILLONS DE PLASMA	46
2. MÉTHODES ANALYTIQUES	47
2.1 Définition de la demi-vie de dégradation de BK et des-Arg ⁹ -BK	47
2.2 Définition de la demi-vie de dégradation de la SP	47
2.2.1 Incubation	47
2.2.2 Dosage de la substance P par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	48
2.3 Dosage de l'activité enzymatique des métallopeptidases (APP, ECA et APN) responsables du catabolisme de BK et de des-Arg ⁹ -BK	48
2.3.1 L'aminopeptidase N	49
2.4 Dosage de la DPPIV	49
2.4.1 Dosage de l'activité enzymatique de la DPPIV responsable du catabolisme de la BK, de la des- Arg ⁹ -BK et de la SP	49
2.4.2 Dosage de la DPPIV immunoréactive	49
3. TRAITEMENT STATISTIQUE DES RÉSULTATS	50
OBJECTIF 3 :	50
1.1 Protocoles expérimentaux	50
1.1.1 In vitro : culture de fibroblastes, de muscle lisse vasculaire et essai de liaison	50
1.2 Extraction de l'ARN	51

1.2.1 Fibroblastes	51
2. LA TECHNIQUE DE PCR EN TEMPS RÉEL (REAL-TIME PCR, RT-PCR).....	52
2.1 <i>Transcription de l'ARN en ADNc</i>	52
2.2 <i>Amplification de l'ADNc du récepteur B₁ par RT-PCR</i>	53
3. TRAITEMENT DES RÉSULTATS.....	54
VI RÉSULTATS	55
OBJECTIF 1 :	55
1. DÉFINITION DE LA DEMI-VIE DE DÉGRADATION DE LA BK ET DE LA DES-ARG ⁹ -BK	55
2. DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES MÉTALLOPEPTIDASES (APP, ECA ET CPN) RESPONSABLES DU CATABOLISME DE LA BK ET DE LA DES-ARG ⁹ -BK	57
3. DOSAGE DE LA SUBSTANCE P DANS LES URINES RECUEILLIES DANS LE DÉCOURS D'UN ÉPISODE D'AO	59
OBJECTIF 2 :	60
1. DÉFINITION DE LA DEMI-VIE DE DÉGRADATION DE LA BK ET DE LA DES-ARG ⁹ -BK.....	60
2. DÉFINITION DE LA DEMI-VIE DE DÉGRADATION DE LA SP	62
3. DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES MÉTALLOPEPTIDASES (APP, ECA, APN) RESPONSABLES DU CATABOLISME DE BK ET DE LA DES-ARG ⁹ -BK	63
4. DOSAGE DE LA DPPIV	65
4.1 <i>Dosage de l'activité enzymatique de la DPPIV responsable du catabolisme de la BK, de la des-Arg⁹-BK et de la SP</i>	65
4.2 <i>Dosage de la DPPIV immunoréactive</i>	66
OBJECTIF 3 :	67
1. EXPRESSION DU RÉCEPTEUR B ₁ POUR LES ÉCHANTILLONS D'ADN DE FIBROBLASTES DERMIFIQUES DE LAPIN ET DE MUSCLES LISSES D'AORTE DE LAPIN AMPLIFIÉS PAR PCR.....	67
1.1 <i>Effets des différents traitements pharmacologiques sur l'expression de surface du B₁R</i>	70
1.2 <i>Effet des cytokines et/ou leurs antagonistes sur le rapport ARNm B₁R / ARNm GAPDH déterminé par RT-PCR en temps réel sur des fibroblastes dermiques de lapin et des cellules de muscles lisses d'aorte de lapin</i>	71
VII DISCUSSION	75
VIII CONCLUSION	83
RÉFÉRENCES	85

Liste des figures et des tableaux

Figures

Figure 1	5
Séquence d'acides aminés des différentes kinines.	
Figure 2	8
Représentation des 6 domaines du KHPM et leur fonction primaire.	
Figure 3	10
Origine de la BK et de la KD.	
Figure 4	12
Le système kinino-formateur et le système kallibréine-kinines.	
Figure 5	14
Le métabolisme de la BK.	
Figure 6	24
Les récepteurs des kinines et leurs voies de signalisation.	
Figure 7	34
La famille des tachykinines, le produit de deux gènes.	
Figure 8	36
Le métabolisme de la substance P en relation avec celui de la BK.	
Figure 9	38
Vasodilatation et bronchoconstriction activée par des protons.	
Figure 10	58
Demi-vie de dégradation de la BK dans le groupe de patients atteints d'AOA de nature idiopathique et dans le groupe témoin.	
Figure 11	58
Demi-vie de dégradation de des-Arg ⁹ -BK dans le groupe de patients atteints d'AOA de nature idiopathique et dans le groupe témoin.	
Figure 12	59
Activité de l'APP dans le groupe de patients atteints d'AOA idiopathique et dans le groupe témoin.	

Figure 13	60
Activité de l'ECA dans le groupe de patients atteints d'AOA de nature idiopathique et dans le groupe témoin.	
Figure 14	60
Activité de la CPN dans le groupe de patients atteints d'AOA idiopathique et dans le groupe témoin.	
Figure 15	61
Concentration urinaire de SP dans le groupe de patients atteints d'AOA de nature idiopathique et dans le groupe témoin.	
Figure 16	63
Demi-vie de dégradation de BK dans le groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et dans le groupe de témoins traités ou non aux iECA.	
Figure 17	63
Demi-vie de dégradation de des-Arg ⁹ -BK dans le groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et dans le groupe de témoins traités ou non aux iECA.	
Figure 18	64
Demi-vie de dégradation de la SP dans le groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et dans le groupe de témoins traités ou non aux iECA.	
Figure 19	65
Activité de l'APP dans le groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et dans le groupe de témoins traités ou non aux iECA.	
Figure 20	66
Activité de l'ECA dans le groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et dans le groupe de témoins traités ou non aux iECA.	
Figure 21	67
Activité de l'APN dans le groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et dans le groupe de témoins traités ou non aux iECA.	
Figure 22	68
Activité de la DPPIV dans un groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et dans un groupe de témoins traités ou non aux iECA.	

Figure 23	69
Concentration de DPPIV immunoréactive dans un groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et un groupe de témoins traités ou non aux iECA.	
Figure 24	70
La courbe de dissociation de chacun des produits de PCR pour les fibroblastes et les cellules de muscles lisses d'aorte de lapin.	
Figure 25	71
La spécificité de l'amplification par le PCR en temps réel provenant des fibroblastes dermique de lapin.	
Figure 26	72
La spécificité de l'amplification par le PCR en temps réel provenant des cellules de muscles lisses d'aorte de lapin.	
Figure 27	75
Effet de stimulations de 4 h avec des cytokines ou du LPS (10 µg/ml) sur l'expression de surface du B ₁ R dans deux types cellulaires du lapin.	
Figure 28	76
A. Effet d'une drogue inhibitrice (co-traitement d'une durée de 4.5 h) sur l'expression du récepteur B ₁ des kinines dans des fibroblastes de lapin en culture stimulés par des cytokines (4 h). B. Comparaison des effets du sel sodique du phosphate de dexaméthasone avec le dexaméthasone authentique sur l'action inductrice de l'IL-1β dans les fibroblastes de lapin (n = 2).	
Figure 29	77
Effet des cytokines et/ou leurs antagonistes sur le rapport ARNm B ₁ R/ARNm GAPDH déterminé par RT-PCR en temps réel sur des fibroblastes dermiques de lapin (A) et des cellules de muscles lisses d'aorte de lapin (B).	

Tableaux

Tableau I	28
Les différents antagonistes du B ₁ R et du B ₂ R.	
Tableau II	30
Séquences des cinq peptides constituant la famille des tachykinines.	
Tableau III	47
Caractéristiques particulières des patients et des témoins de l'étude.	
Tableau IV	54
Séquences des oligonucléotides utilisés pour le RT-PCR de l'ARN provenant des fibroblastes dermiques de lapin et des cellules de muscles lisses d'aorte de lapin.	

Liste des abréviations

aa	Acide aminé
ADNc	ADN complémentaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AO	Angiooedème
AOA	Angiooedème acquis
AOH	Angiooedème héréditaire
ANF	Peptide natriurétique de l'oreillette
Ang I ou II	Angiotensine I ou II
Ang₍₁₋₇₎	Fragment (1-7) de l'angiotensine
APN	Aminopeptidase N
APP	Aminopeptidase P
APPc	Aminopeptidase P cytosolique
APPm	Aminopeptidase membranaire
Arg	Arginine
Asp	Acide aspartique
B1R	Récepteur B ₁
B2R	Récepteur B ₂
BK	Bradykinine
BK₍₁₋₅₎	Fragment (1-5) de la bradykinine
BK₍₁₋₇₎	Fragment (1-7) de la bradykinine
BK₍₂₋₈₎	Fragment (2-8) de la bradykinine
BK₍₂₋₉₎	Fragment (2-9) de la bradykinine
Ca²⁺	Calcium
C1INH	C1 inhibiteur
Cl⁻	Chlore
CK 1	Cytokératine
CMA	Complexe membranaire d'attaque
CPM	Carboxypeptidase M
CPN	Carboxypeptidase N (kininase II)

Cys	Cystéine
DAG	Diacylglycérol
Des-Arg⁹-BK	Des-Arginine ⁹ -bradykinine
Des-Arg¹⁰-KD	Des-Arginine ¹⁰ -kallidine
DPPIV	Dipeptidyl peptidase IV
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine II (kininase II)
EPN	Endopeptidase neutre
FXI	Facteur XI
FXIa	Facteur XI activé
FXII	Facteur XII
FXIIa	Facteur XII activé
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate désydrégénase
GC	Guanine-cytosine
GIP	Glycosylphosphatidyinositol
Gln	Glutamine
GLP-1	Glucagon-like-peptide 1
Gly	Glycine
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
His	Histidine
iECA	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II
IL-Iβ	Interleukine I β
IP3	Phosphoinositol
JAK	Janus kinase
KK	Kallicréine
KD	Kallidine
kDa	Kilo Dalton
KFPM	Kininogène de faible poids moléculaire
KHPM	Kininogène de haut poids moléculaire
L-Arg	L-Arginine
Leu	Leucine

LPS	Lipopolysaccharide
Lys	Lysine
MAPK	MAP-kinase
MASPs	Protéases à sérine associées à la MBL
MBL	Mannose binding lectin
Met	Méthionine
MM	Masse moléculaire
NK A	Neurokinine A
NK B	Neurokinine B
NK-1R	Récepteur 1 des neurokinines
NK-2R	Récepteur 2 des neurokinines
NK-3R	Récepteur 3 des neurokinines
NO	Oxyde nitrique
NOS	NO synthase
PGs	Prostaglandine
PGI₂	Prostaglandine I ₂ (prostacycline)
Phe	Phénylalanine
PI_PLC	Phosphatidylinositol-spécifique
pKK	Prékallicréine
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PPT-A ou B	Préprotachykinine A ou B
Pro	Proline
RCNGs	Récepteurs couplés à la guanine
RCPG	Récepteurs couplés à une protéine G
Ser	Sérine
SNC	Système nerveux central
SP	Substance P
SP₍₃₋₁₁₎	Fragment (3-11) de la SP
SP₍₅₋₁₁₎	Fragment (5-11) de la SP

STAT	Signaux transducteurs et activateurs de la voie de la transcription
TF	Facteur tissulaire
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale α
Tyr	Tyrosine
U-PAR	Récepteur de l'activateur du plasminogène urokinase
Zn²⁺	Zinc

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Albert Adam pour son soutien tout au long de ma maîtrise ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée. Grâce à ses judicieux conseils, il a partagé avec moi une partie de son précieux savoir et il m'a permis de m'accomplir énormément autant sur le plan intellectuel que personnel, et il m'a permis d'approfondir mes connaissances scientifiques. L'accomplissement de mon travail de maîtrise et la rédaction de ce mémoire n'aurait pas été aussi enrichissant pour moi sans sa présence tant appréciée.

Je veux aussi remercier Mme Marie Ève Moreau, étudiante au doctorat, pour son soutien tout au long de ma maîtrise et pour son aide. Elle m'a permis de maîtriser la technique de RT-PC et de compléter la deuxième partie de mon travail de maîtrise avec brio. Sa présence a été indispensable à l'accomplissement de mon travail. Je tiens aussi à remercier Mme Anik Desormeaux, assistante de recherche, pour m'avoir aidé à perfectionner les techniques de laboratoires que j'ai utilisées durant mon travail de maîtrise et pour son support continu. Ces conseils ont été très précieux pour moi.

Je tiens à remercier Mme Nicole Gervais, l'assistante de recherche, pour m'avoir aidé à maîtriser les techniques de laboratoires ainsi que pour sa patience et son support quotidien. Je veux aussi remercier Dr. Nancy Brown, M. Christian Drouet ainsi que M. François Marceau pour leur implication dans mon travail de maîtrise.

Je tiens finalement à remercier mes amis et mes proches qui m'ont encouragé et qui m'ont constamment soutenue tout au long de ma maîtrise.

I. L'angiooedème

1. Définition

L'angiooedème (AO) est une réaction inflammatoire locale aiguë caractérisée par un gonflement des couches profondes de la peau et/ou des tissus sous-muqueux. Généralement, les parties du corps les plus affectées sont le visage, les bras, les mains, les jambes, les pieds, la cavité intra-abdominale et les organes génitaux (Greaves and Lawlor, 1991; Kaplan and Greaves, 2005). L'AO peut entraîner une obstruction respiratoire et représenter un danger pour la survie de l'individu si sa localisation implique les voies respiratoires supérieures (Kaplan and Greaves, 2005). L'épisode d'AO résulte d'une augmentation locale de la perméabilité des capillaires et des veinules post-capillaires dans la zone sous-cutanée ou sous-muqueuse, menant à une extravasation de plasma et à un gonflement (Kaplan and Greaves, 2005).

2. Les différents types d'AO

Plusieurs publications parues au début du XIXe siècle ont rapporté des observations cliniques semblables ou identiques à l'AO que l'on connaît aujourd'hui. La première description médicale détaillée fut publiée dans le Journal de Médecine d'Edinburgh, en 1876, par le Dr. John Laws Milton, fondateur de l'Hôpital St-John. Dans cet article intitulé «On Giant Urticaria», le Dr. Milton a rapporté la description détaillée de l'état de six patients atteints d'AO (Milton, 1876). Douze années plus tard, le Dr. William Osler fit la distinction entre l'AO de type héréditaire (AOH) et sa forme acquise (AOA), après avoir étudié les différents épisodes d'AO des membres de cinq générations d'une même famille (Osler, 1888). La présence d'une anomalie biochimique chez les individus atteints d'AOH, caractérisée par une déficience en C1 estérase inhibiteur (C1INH), fut identifiée et caractérisée en 1963 par Donaldson et Evans (Donaldson and Evans, 1963). L'AOA causé par une déficience acquise en C1INH a été décrit pour la première fois par Caldwell et ses collaborateurs (Caldwell et al., 1972).

2.1 L'AO héréditaire (AOH)

L'AOH représente une maladie génétique à transmission autosomale dominante à forme hétérozygote exclusive (Davis, 2005). Il est causé par un déficit ou une altération du gène codant pour l'inhibiteur du C1INH, au locus q12-q13.1 du chromosome 11. Le C1INH est l'inhibiteur potentiel de différentes protéases à sérine. Les principales sont cependant les facteurs C1r et C1s du complément, la kallikréine plasmatique, les facteurs XIIa et XIa de la coagulation et la plasmine (Donaldson et al., 1977; Landerman et al., 1962; Longhurst, 2005).

Une déficience en C1INH entraîne une diminution de la synthèse de diverses protéines fonctionnelles (Davis, 1988) et les manifestations physiopathologiques de l'AOH qui en découlent résultent d'une large variété de mutations du gène C1INH (Davis, 2005). La prévalence de l'AOH dans la population générale a été estimée à 1 :50 000 (Agostoni and Cicardi, 1992). Par contre, une déficience complète en C1INH n'a jamais été rapportée jusqu'à aujourd'hui.

Il existe deux types d'AOH (Rosen et al., 1965). L'AOH de type I (présent dans approximativement 80-85% des cas d'AOH) est causé par une mutation dans le gène codant pour le C1INH qui occasionne une diminution de sa production et, par le fait même, une réduction de l'activité antiprotéasique plasmatique caractéristique au C1INH (Rosen et al., 1965). L'AOH de type II, par contre, se caractérise par une concentration normale du C1INH combinée à une activité antiprotéasique diminuée ou nulle due à une mutation génique produisant une protéine C1INH dysfonctionnelle. Ce type d'AO représente 15% des cas d'AOH (Rosen et al., 1971).

Ces anomalies du C1INH caractérisant les deux types d'AOH ont deux types de conséquences. D'une part, elles sont responsables d'une activation anormale de la voie classique du complément accompagnée d'une consommation accrue des facteurs C2 et C4 alors que les niveaux de C3 sont normaux. (Agostoni and Cicardi, 1992; Cicardi et al., 1982; Prada et al., 1998). Les concentrations de C1q, quant à elles, sont à un niveau normal en dehors des crises d'AO (Agostoni et al., 2004; Kaplan and

Greaves, 2005). D'autre part, cette perte d'activité antiprotéasique s'accompagne d'une activation du système de contact du plasma et donc de la transformation de la prékallicréine en kallicréine. Celle-ci libère la bradykinine (BK) à partir du kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) (Kaplan and Greaves, 2005).

2.2 L'AO acquis (AOA)

La forme acquise de l'AO, considérée comme non transmissible du moins jusqu'à présent, regroupe des AO dû à différentes causes. Les premiers sont dûs à une consommation anormalement élevée du C1INH. Cette consommation est de nature idiopathique, autoimmune ou associée à des phénomènes de nature lymphoproliférative (Greaves and Lawlor, 1991; Melamed et al., 1986; Nzeako et al., 2001). L'AOA est également associée à la prise de certains médicaments. Les médicaments les plus souvent en cause sont d'une part les oestrogènes utilisés en contraception ou à titre substitutif (Cicardi et al., 1996; Cicardi et al., 1985; Frigas, 1989; Gelfand et al., 1979) et, d'autre part, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (iECA). L'incidence des AOA associée à la prise d'iECA a récemment été revue à la lumière d'études cliniques. En effet, une étude clinique de phase III nommée OVERTURE, ayant inclus plus de 4 000 patients souffrants d'insuffisance cardiaque, évalue actuellement les effets sur la morbidité-mortalité, d'un traitement par omapatrilate en comparaison avec un iECA de référence, l'énalapril. En 2002, Giuseppe Molinaro et ses collaborateurs ont aussi mis en évidence la présence d'une anomalie au niveau de la dégradation de la des-Arg⁹-BK endogène chez ce type de patient (Molinaro et al., 2002).

3. Les médiateurs de l'AO

La capacité de différents peptides vasoactifs dont les kinines, les neurokinines et certains facteurs du complément, à agir de concert au niveau de foyer inflammatoire expérimental, en font des facteurs potentiels pouvant expliquer la physiopathologie des symptômes associés aux épisodes d'AO. Dans cette deuxième partie de notre

introduction, nous nous attarderons à définir et à étudier les propriétés des kinines et des neurokinines. En effet, le rôle des premières fait l'objet d'études approfondies dans notre laboratoire d'accueil qui seront poursuivies dans notre mémoire. Quant aux secondes, elles constituent, une voie nouvelle explorée dans notre travail de maîtrise. En ce qui concerne les facteurs du complément, non envisagés dans notre travail de maîtrise, nous renvoyons le lecteur à d'excellentes revues récentes (Fiedler et al., 2005; Szeplaki et al., 2006).

II. Les kinines

1. Définition

Les kinines sont des peptides vasodilatateurs, proinflammatoires et algogènes. Parmi les membres de cette grande famille, on retrouve la bradykinine (BK), la kallidine (KD) et leurs métabolites actifs soit la des-Arginine⁹-bradykinine (des-Arg⁹-BK) et la des-Arginine¹⁰-kallidine (des-Arg¹⁰-KD) (Kaplan et al., 2002). Leurs séquences peptidiques sont représentées à la figure 1 (Kaplan et al., 2002). Il existe d'autres kinines uniquement identifiées chez certains rongeurs, ce sont la Ile-Ser-bradykinine (T-kinine) et la Met-Ile-Ser-bradykinine (Kato et al., 1988; Maier et al., 1988; Sakamoto et al., 1987).

Les kinines participent au processus inflammatoire par leur capacité d'activer les cellules endothéliales. En effet, cette activation conduit à la production du monoxyde d'azote (NO) et à la mobilisation d'acide arachidonique (Kaplan et al., 2002) responsable d'une vasodilatation accrue et d'une augmentation de la perméabilité vasculaire.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BK	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg-OH
KD	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe-Arg-OH
des-Arg⁹-BK	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe-OH	
des-Arg¹⁰-KD	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe-OH

Figure 1. Séquence d'acides aminés des différentes kinines (Blais et al., 2000).

Les propriétés pharmacologiques de la BK furent mises en évidence en 1949 par Rocha e Silvia et ses collaborateurs et ce, par incubation du plasma bovin en présence de venin de serpent (*Bothrops jararaca*) ou de la trypsine (Silva et al., 1949). Ces auteurs ont ainsi montré qu'une substance, la BK, libérée par hydrolyse de substrats plasmatiques, est capable de contracter l'iléon isolé du cochon d'Inde, le duodénum de lapin et l'utérus de rat, et qu'elle pouvait diminuer la pression sanguine lorsque injectée par voie intraveineuse chez le chat, le chien et le lapin. La BK doit donc son nom à son action pharmacologique lente au niveau de la contraction du muscle lisse (*brady* signifie lent en grec, *kinine* signifie mouvement) (Silva et al., 1949) et ce, par opposition à une autre classe de peptides, les tachykinines (voir ci-dessous).

En 1960, la BK a été isolée biochimiquement pour la première fois par Elliot et ses collaborateurs en utilisant un substrat de protéines précipitées à partir d'un sérum saturé en sulfate d'ammonium et a été synthétisée et identifiée comme un nonapeptide par Boissonnas et ses collaborateurs (Boissonnas et al., 1960; Elliott et al., 1960). Quelques années plus tard, la structure décapeptidique de la KD fut mise en évidence (Webster and Pierce, 1963).

2. Les kininogènes, précurseurs des kinines

Les kininogènes sont des glycoprotéines multifonctionnelles synthétisées principalement par le foie, mais aussi par les reins, les glandes salivaires et les cellules endothéliales (Blais et al., 2000). Les kinines sont produites à partir des kininogènes sous l'action d'enzymes protéolytiques connues sous le nom de kininogénases. Le rôle du kininogène comme précurseur potentiel des kinines a été suggéré pour la première fois par Werle et ses collaborateurs (Werle, 1963).

Leur masse moléculaire permet de distinguer trois formes de kininogène chez les mammifères (Müller-Esterl et al., 1986). Ce sont respectivement le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM, masse moléculaire (MM) : 88 à 120 kDa) (Adam et al., 1985; Blais et al., 2000), le kininogène de faible poids moléculaire (KFPM, MM : 50 à 68kDa) (Adam et al., 1985; Blais et al., 2000; Muller-Esterl et al., 1982) et le T-kininogène (MM : 68 kDa), ce dernier étant spécifique au rat (Okamoto and Greenbaum, 1983).

Le KFPM et le KHPM possèdent tous deux une chaîne lourde N-terminale commune (MM : 50-60 kDa) et une chaîne légère C-terminale de masse moléculaire différente entre lesquelles se trouve enclavée la séquence kininomatrice de 12 acides aminés (aa) (Blais et al., 2000). La structure du KHPM est représentée de façon schématique à la figure 2.

Les KFPM et KHPM sont les produits de l'épissage alternatif de l'ARN d'un seul gène structural présent sur le chromosome 3q26-qter (Cheung et al., 1992; Fong et al., 1991; Rizzu and Baldini, 1995). Ce gène est composé de onze exons constitués d'environ 27 000 paires de base (Blais et al., 2000). Les 9 premiers exons codent pour la chaîne lourde commune et le 10^e exon code pour la séquence kininomatrice (Kitamura et al., 1985; Takagaki et al., 1985). La chaîne légère du KFPM, quant à elle, est codée par l'exon 11. Ces deux kininogènes plasmatiques sont composés de plusieurs domaines, étant chacun associé à une activité spécifique de la protéine et formant ainsi une structure complexe (voir figure 2).

La chaîne lourde commune aux deux types de kininogènes est formée de trois domaines (D1, D2 et D3) (Kellermann et al., 1986; Salvesen et al., 1986). Le domaine 1, dont le rôle physiologique demeure inconnu, contient un site de liaison de faible affinité pour le calcium (Higashiyama et al., 1987). Les domaines 2 et 3 possèdent une séquence peptidique (Gln-Val-Val-Ala-Gly) commune qui leur confère un pouvoir inhibiteur vis-à-vis des protéases à cystéines telles que la papaïne et la cathepsine. Le domaine 3 a la capacité de se lier aux plaquettes et aux cellules endothéliales. Cette région peut également inhiber l'effet activateur de la thrombine vis-à-vis des plaquettes (Herwald et al., 1995; Jiang et al., 1992; Meloni and Schmaier, 1991).

Le quatrième domaine (D4) est responsable du pouvoir kininogénase des deux types de kininogènes. Les domaines 5 et 6 (D5 et D6) sont spécifiques aux KHPM et forment sa chaîne légère responsable des propriétés procoagulantes de ce dernier (DeLa Cadena and Colman, 1991; Müller-Esterl et al., 1986). En effet, le domaine 5, riche en résidus histidine, proline et lysine permet au KHPM de se fixer aux surfaces chargées négativement et aux surfaces cellulaires. Le domaine 5 possède également des propriétés antiangiogéniques et la capacité de lier l'héparine (Colman et al., 2000; Hasan et al., 1995; Lin et al., 2000). Le domaine 6 sert à l'interaction du KHPM avec la prékallicréine plasmatique et le facteur XI (Mandle et al., 1976; Tait and Fujikawa, 1987; Thompson et al., 1977).

La chaîne légère du KFPM (MM : 4-5kDa) constitue le domaine 5 de ce dernier et sa fonction demeure inconnue à ce jour.

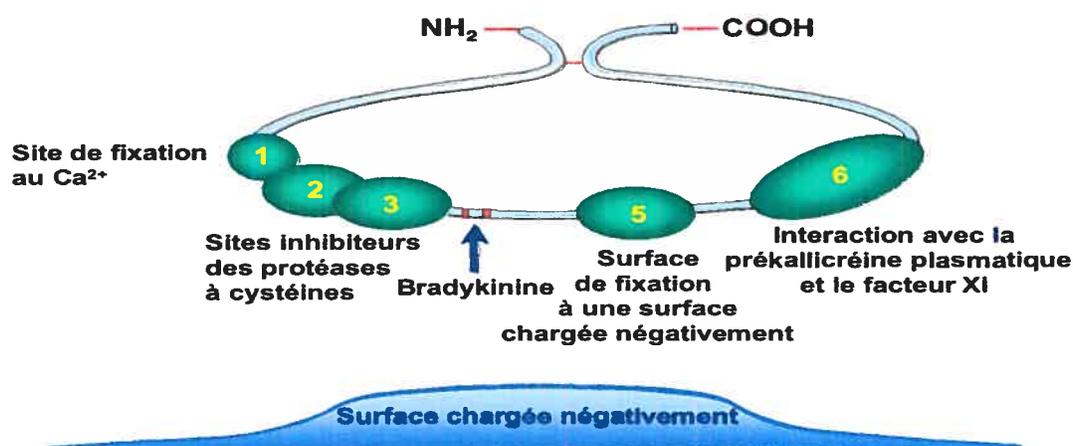


Figure 2. Représentation des 6 domaines du KHPM et leur fonction primaire. Les domaines 1,2 et 3 constituent la chaîne lourde, le domaine 4 comporte la partie kininogénase et les domaines 5 et 6 représentent la chaîne légère (Kaplan et al., 2002).

3. Les systèmes kinino-formateurs

Classiquement, il est considéré que deux voies métaboliques spécifiques peuvent conduire à la libération des kinines. La première est tissulaire et implique la kallibréine tissulaire. La seconde implique la kallibréine plasmatique. Elle a lieu dans le plasma comme son nom l'indique, mais aussi à la surface de certaines cellules. À côté de ces deux voies kininogénases spécifiques, il en existe d'autres non spécifiques médiées par les facteurs de la coagulation, de la fibrinolyse ou encore par diverses protéases de nature microbienne (Moreau et al., 2005).

3.1 La kallibréine tissulaire (ou glandulaire) (EC 3.4.21.35)

La kallibréine tissulaire (glandulaire) est une glycoprotéine acide à chaîne simple hautement glycosylée (MM : 25 à 45 kDa). Elle diffère de la kallibréine plasmatique

(Bhoola et al., 1992; Blais et al., 2000) par sa masse moléculaire, sa composition en acides aminés et la nature de la kinine qu'elle libère. La kallibréine tissulaire humaine est encodée par le gène *KLK1*, localisé aux locus q13.2-q13.4 du chromosome 19 (Clements et al., 2001; Mahabeer and Bhoola, 2000).

La kallibréine tissulaire est largement distribuée dans l'organisme puisqu'elle se retrouve au niveau du rein, des vaisseaux sanguins, du système nerveux central, du pancréas, de l'intestin, des glandes salivaires, de la rate, des glandes surrénales et des polynucléaires neutrophiles. Cette distribution importante lui suggère un rôle paracrine (Bhoola et al., 1992; Mahabeer and Bhoola, 2000). La kallibréine tissulaire est synthétisée sous forme de proenzyme, la prokallibréine (Kaplan et al., 1998; Margolius, 1996). La kallibréine tissulaire possède une forte activité kininogénasique et son substrat préféré est le KFPM, qu'elle clive au niveau des liaisons Met³⁷⁹-Lys³⁸⁰ et Arg³⁸⁹-Ser³⁹⁰ pour en libérer la KD (figure 3) (Fogaca et al., 2004; Mahabeer and Bhoola, 2000). L'activité protéasique de la kallibréine tissulaire circulante est inhibée par différentes antiprotéases dont principalement l' α_1 -antitrypsine, l'aprotinine et la kallistatine (Margolius, 1996; Zhou et al., 1992).

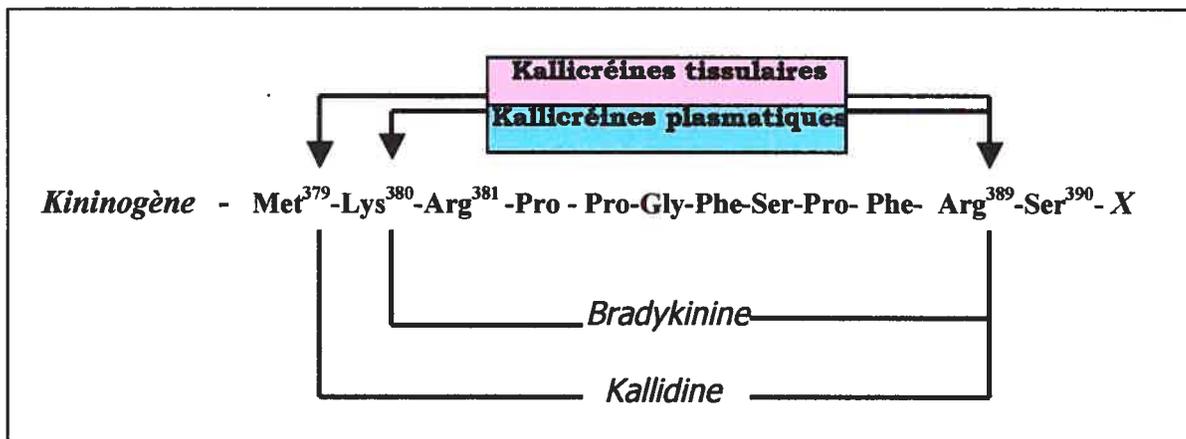


Figure 3. Origine de la BK et de la KD. La BK est formée par l'hydrolyse des liens Lys³⁸⁰-Arg³⁸¹ et Arg³⁸⁹-Ser³⁹⁰ du KHPM par la kalicréine plasmatique. La KD est formée par le clivage des liens Met³⁷⁹-Lys³⁸⁰ et Arg³⁸⁹-Ser³⁹⁰ du KFPM par les kalicréines tissulaires (Campbell, 2001).

3.2 La kalicréine plasmatique (EC 3.4.21.34)

La kalicréine plasmatique est synthétisée principalement au niveau du foie sous forme d'un précurseur inactif, la prékalicréine (pKK). Cette pKK est codée par le gène *KLKB1*, localisé au locus q34-q35 du chromosome 4, composé de 15 exons et de 14 introns (Beaubien et al., 1991).

La pKK est une α -globuline dont la forme plasmatique circulante est complexée au domaine 6 du KHPM (Mandle et al., 1976; Wiggins et al., 1977). La transformation de la pKK en KK, sa forme active, a lieu lors de l'activation du système de contact du plasma. Celle-ci est représentée de façon schématique à la figure 4.

Le système de contact du plasma est formé de trois proenzymes (le facteur XII ou facteur de Hageman, le facteur XI de la coagulation et la pKK) et d'un cofacteur, le

KHPM. La pKK et le facteur XI de la coagulation circulent complexés au domaine 6 du KHPM.

La mise en contact du plasma avec une surface chargée négativement (membrane de dialyse, bille de verre, kaolin) concentre le facteur de Hageman et le KHPM au niveau de cette surface et conduit à l'auto-activation du facteur XII (FXII) en facteur XIIa, à l'activation du facteur XI et de la prékallicroïne par le FXIIa, au clivage du KHPM par la kallicroïne et, enfin, à la libération de la BK (Kaplan et al., 1997; McMillin et al., 1974; Ratnoff and Saito, 1979; Saito, 1980; Silverberg et al., 1980). L'activation de la pKK par le clivage de la liaison Arg³⁷¹-Ile³⁷² génère une protéase active, la KK, composée d'une chaîne lourde N-terminale de 371 acides aminés (MM : 55 kDa) et d'une chaîne légère C-terminale de 248 acides aminés (MM : 30 à 36 kDa), reliées entre elles par un pont disulfure. Le site actif de l'enzyme, composé de trois acides aminés importants (His⁴¹⁵, Asp⁴⁶⁴ et Ser⁵⁵⁹), se retrouve sur la chaîne légère et est directement impliqué dans la catalyse (Kaplan et al., 2002). Le clivage du KHPM par la KK pour en libérer la BK s'effectue en deux étapes. En premier lieu, la liaison Arg³⁸⁹-Ser³⁹⁰ située à l'extrémité C-terminale de la séquence de la BK est hydrolysée, la laissant liée à la chaîne lourde du KHPM par sa partie N-terminale. La séquence Leu³⁷⁸-Met-Lys-Arg³⁸¹ est ensuite clivée au lien Lys³⁸⁰-Arg³⁸¹ pour libérer la BK (Mori et al., 1981). La portion restante du KHPM est appelée KHPMa et acquiert de nouvelles propriétés suite à cette cascade permettant la libération de la BK (Guo and Colman, 2005).

L'activité protéasique de la KK plasmatique est principalement neutralisée par le C1INH (Gigli et al., 1970; Schapira et al., 1982; van der Graaf et al., 1983). Elle peut aussi être modulée par d'autres antiprotéases : α_2 -macroglobuline, l'antithrombine III, α_1 -antitrypsine et α_2 -antiplasmine (Schapira et al., 1982; van der Graaf et al., 1983). En absence de C1INH, l'activation du système de contact devient incontrôlée de même que la libération de la BK (Blais et al., 2000; Dunn et al., 1982; Tankersley and Finlayson, 1984).

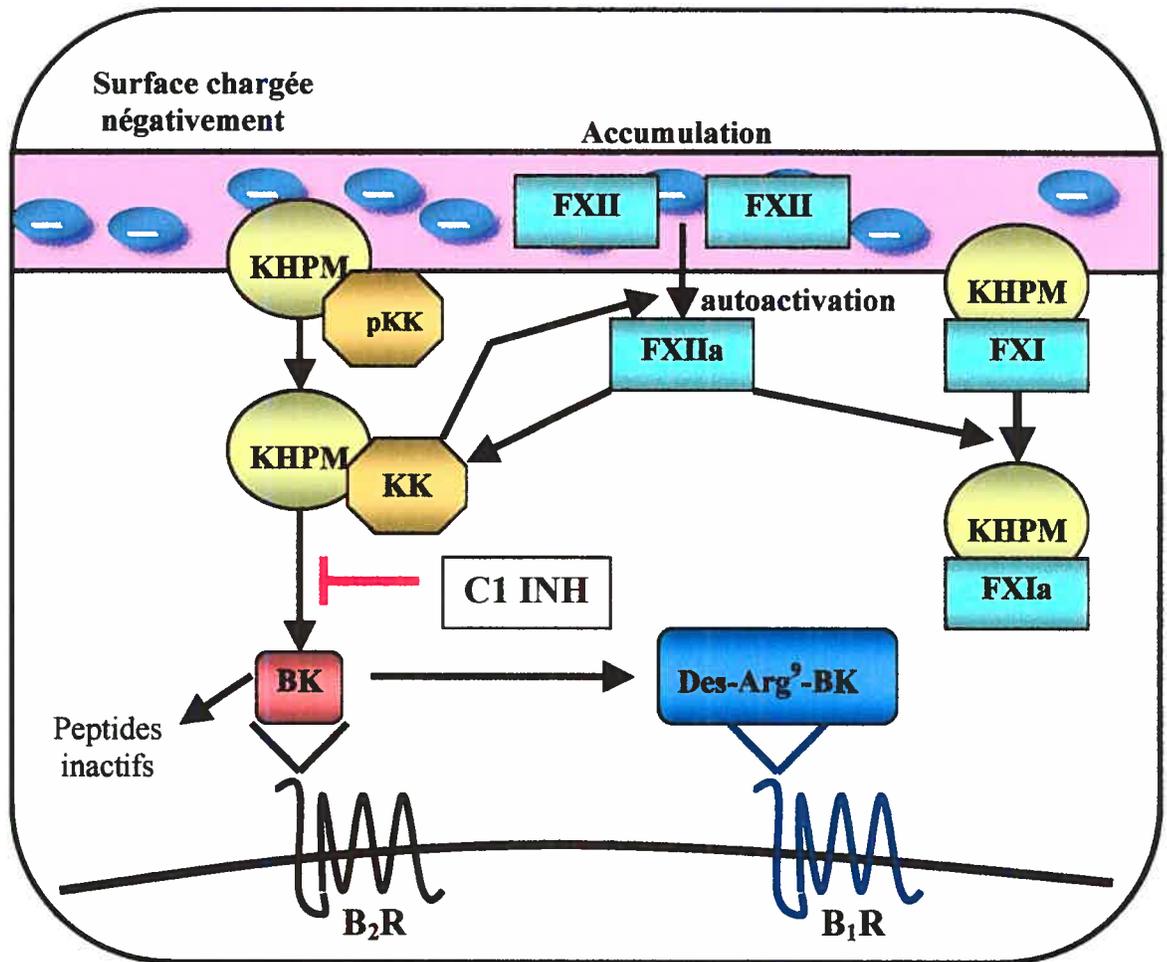


Figure 4. Le système kinino-formateur et le système kallibréine-kinines. L'accumulation de FXII à la surface négative conduit à l'autoactivation du FXIIa. FXIIa active la KK et FXIa, tous deux liés individuellement au KHPM qui les apporte à la surface négative. Une fois activée, la KK amplifie l'activation de FXIIa et libère la BK de son précurseur, le KHPM. La libération de la BK peut être bloquée par le C1INH. La BK se lie ensuite au récepteur constitutif B₂ et active sa voie signalitique. La BK peut aussi être métabolisée en peptides inactifs ou en des-Arg⁹-BK, qui transmet son signal via le récepteur inductible B₁. pKK : prékallibréine, KHPM : kininogène de haut poids moléculaire, BK : bradykinine, C1INH : C1 inhibiteur, KK : kallibréine (Moreau et al., 2005).

Plus récemment, un système d'activation similaire au système plasmatique a été mis en évidence à la surface de certaines cellules (leucocytes, plaquettes, cellules endothéliales, myocytes) (Zhao et al., 2001). En effet, le KHPM peut se lier aux cellules endothéliales et aux plaquettes par une réaction saturable, réversible et zinc-dépendante (Schmaier et al., 1988; van Iwaarden et al., 1988), et ses deux chaînes sont impliquées dans cette liaison (Reddigari et al., 1993). La liaison du KHPM aux cellules endothéliales conduit à l'activation de la pKK en KK et, tel que présumé, à la relâche de la BK à partir du KHPM (Lin et al., 2000; Motta et al., 1998; Nishikawa et al., 1992; Zhao et al., 2001; Zhao et al., 2001). Les principales protéines qui constituent le complexe membranaire responsable de cette liaison sont la cytokératine 1 (CK1), le récepteur du gC1q (gC1qR) et le récepteur de l'activateur du plasminogène urokinase (u-PAR) et elles se localisent toutes les trois sur la membrane des cellules endothéliales (Colman et al., 1997; Hasan et al., 1998; Herwald et al., 1996; Herwald et al., 1996; Joseph et al., 1996; Schmaier, 2000; Shariat-Madar et al., 1999).

4. Le métabolisme des kinines

Formées localement au contact d'une surface chargée négativement, les kinines sont considérées comme des substances autocrines ou paracrines plutôt que comme des hormones au niveau cellulaire. Elles exercent leurs propriétés pharmacologiques au niveau ou près du site de leur formation, et ce, du moins dans des conditions physiologiques. Elles doivent ces propriétés à un métabolisme intense qui en limite la demi-vie. Des travaux précédemment menés dans notre laboratoire ont montré que ce métabolisme dépend non seulement de l'espèce animale étudiée mais aussi du milieu biologique et de l'état pathologique. Dans cette partie de notre introduction, nous limiterons notre propos aux peptidases responsables du métabolisme plasmatique des kinines puisque ce sont ces dernières que nous avons investiguées. Ces différentes enzymes sont appelées kininases (Erdös and Skidgel, 1997). Ce sont des métallopeptidases qui possèdent toutes un atome de zinc nécessaire à leur activité

(hydrolyse des substrats) au niveau de leur site catalytique. Ces enzymes sont aussi, pour la plupart, des glycoprotéines à chaîne unique d'origine membranaire.

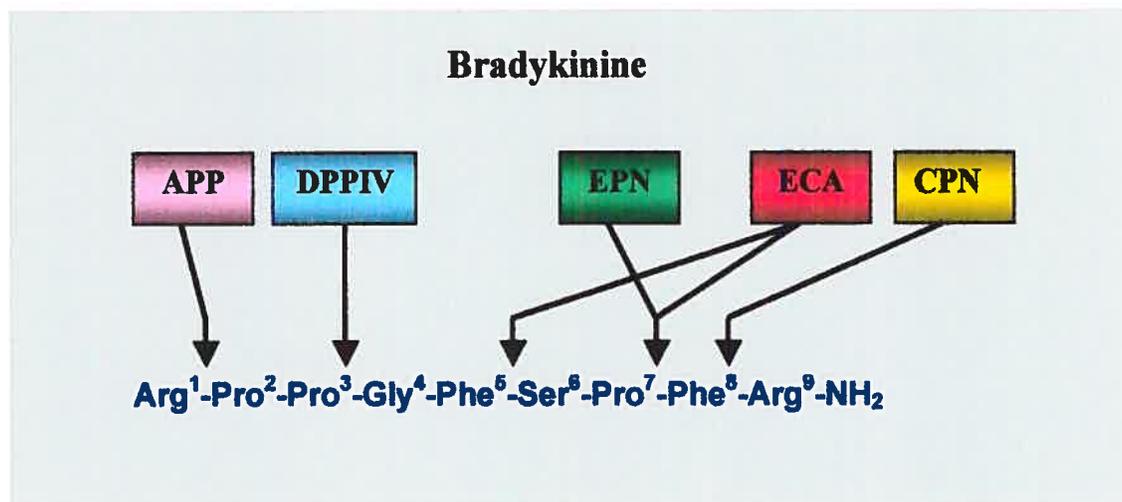


Figure 5. Le métabolisme de la BK

4.1 L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA, kininase II, EC 3.4.15.1) est une dipeptidylpeptidase zinc-dépendante membranaire (ectoenzyme) (Turner and Hooper, 2002). Chez l'humain, l'ECA existe sous deux formes : une forme somatique (MM : 150-180 kDa, 1300 aa) et une forme germinale (MM : 100-110 kDa, 730 aa). La forme somatique de l'ECA est composée de deux domaines métalloprotéinases homologues (C-terminal et N-terminal) contrairement à la forme germinale qui n'est formée que d'un seul domaine C-terminal, identique à celui de l'ECA somatique (Andujar-Sanchez et al., 2004; Georgiadis et al., 2003; Soubrier et al., 1988). On retrouve l'ECA somatique dans de nombreux tissus comme l'endothélium vasculaire, le tissu cardiaque ou encore les cellules épithéliales du tubule rénal proximal. Contrairement à la forme somatique, la forme germinale a une distribution restreinte. En effet, elle n'est présente que dans les testicules, où elle jouerait un rôle dans la fertilité mâle (Hagaman et al., 1998; Turner and Hooper, 2002). Ces deux formes distinctes d'ECA, ancrées au niveau de la membrane cellulaire, ont leur site catalytique exposé vers l'espace extracellulaire (Soubrier et al., 1988; Wei et al.,

1991). L'ECA somatique et germinale sont codées par un même gène situé au locus 17q23 alors que leur transcription est effectuée par des promoteurs différents (Hubert et al., 1991).

L'expression de ces deux formes d'ECA est régulée par différents contrôles hormonaux; par exemple, l'enzyme exprimée au niveau endothélial est induite par les glucocorticoïdes et la forme testiculaire de l'enzyme est stimulée par les androgènes (Hubert et al., 1991).

On reconnaît deux fonctions physiologiques principales à l'ECA. L'ECA inactive la BK en clivant le dipeptide C-terminal Phe⁸-Arg⁹ d'abord et la liaison Phe⁵-Ser⁶ par la suite (Yang et al., 1970; Yang et al., 1971). Ces deux hydrolyses successives aboutissent à la formation d'un résidu BK₍₁₋₅₎ inactif. L'ECA peut aussi dégrader la des-Arg⁹-BK en relâchant le tripeptide Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸ (Inokuchi and Nagamatsu, 1981; Oshima et al., 1985). En plus de cette activité kininasique, l'ECA a un rôle d'angiotensinase puisqu'elle forme l'angiotensine II vasoconstrictive en clivant le lien His⁹-Leu¹⁰ de l'angiotensine I (Skeggs et al., 1956).

Récemment, une isoforme de l'ECA, appelée l'ECA2 a été mise en évidence. De structure relativement semblable à celle de l'ECA, elle possède un seul domaine actif similaire à la portion N-terminale de l'ECA somatique. L'ECA2 est une glycoprotéine membranaire présente à la surface des cellules endothéliales et épithéliales. Elle a cependant une distribution tissulaire (testicules, cœur, rein) plus limitée que l'ECA (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000). L'ECA2 a une activité catalytique très efficace, mais les substrats qu'elle active sont plus limités. En effet, l'ECA2 inactive la des-Arg⁹-BK, mais est dénuée d'activité peptidasique pour la BK.

4.2 L'aminopeptidase P (APP)

L'aminopeptidase P (X-prolyl aminopeptidase, EC 3.4.11.9) est une peptidase ubiquitaire catalysant le clivage spécifique du lien peptidique N-terminal de protéine ayant un résidu proline en deuxième position (Dehm and Nordwig, 1970; Rawlings and Barrett, 2000; Yaron and Mlynar, 1968). L'APP existe sous deux formes, soit sous forme cytosolique (APPC), codée par le gène *XPNPEP2* et située au locus Xq25-26.1 ou sous forme membranaire (APPM), codée par le gène *XPNPEPL* et située au locus 10q25.3. (Sprinkle et al., 2000). Il existe une homologie d'environ 43% entre ces deux formes d'APP (Cottrell et al., 2000; Venema et al., 1997).

L'APPM est une métallopeptidase à zinc fortement glycosylée ancrée à la surface de la membrane plasmique des cellules endothéliales et épithéliales par un pont glycosylphosphatidylinositol (GPI). Ce pont GPI peut être hydrolysé par une phospholipase C phosphatidylinositol-spécifique (PI-PLC), responsable de son passage dans la circulation sanguine (Caras and Weddell, 1989; Hooper and Turner, 1988; Orawski and Simmons, 1995; Simmons and Orawski, 1992).

L'APP joue un rôle important dans le métabolisme de la BK en libérant le résidu Arg¹ et elle transforme ainsi la BK en un métabolite inactif, la BK₍₂₋₉₎. L'APP est aussi impliquée dans le métabolisme de la des-Arg⁹-BK comme principale voie métabolique produisant le peptide inactif BK₍₂₋₈₎ (Blais et al., 1999; Decarie et al., 1996; Erdös and Skidgel, 1997).

4.3 La carboxypeptidase N (CPN)

La carboxypeptidase N (kininase I, EC 3.4.17.3) est une métallopeptidase à zinc formée de deux petites sous-unités (MM : 55 kDa chacune) possédant une activité enzymatique et de deux grosses sous-unités (MM : 83 kDa chacune) hautement glycosylées protégeant l'enzyme contre sa dégradation dans la circulation sanguine. Ces quatre sous-unités sont liées ensemble par des interactions non-covalentes et

forment une glycoprotéine tétramérique d'environ 280 kDa (Levin et al., 1982; Oshima et al., 1975; Plummer and Hurwitz, 1978; Skidgel, 1988).

La CPN est produite par le foie et sécrétée directement dans le sang où elle clive les résidus Arg ou Lys situés à l'extrémité C-terminale des peptides biologiquement actifs du sang comme la kallidine, les kinines et les fibrinopeptides. La CPN clive préférentiellement les résidus Lys (Skidgel, 1988) mais, de façon spécifique, elle clive le résidu Arg C-terminal de la BK pour générer son métabolite actif, la des-Arg⁹-BK. La CPN peut aussi cliver le résidu Arg C-terminal des anaphylatoxines C3a et C5a du complément pour ainsi diminuer de façon significative leur activité biologique. Ces deux peptides (C3a et C5a), générés suite à l'activation de la cascade du complément, peuvent induire la contraction des muscles lisses, la vasodilatation, le chimiotactisme des leucocytes et la production d'histamine par les mastocytes (Skidgel, 1988).

4.4 La dipeptidyl peptidase IV (DPPIV)

La dipeptidylpeptidase IV (DPP IV/CD26; EC 3.4.14.5) est une prolyl oligopeptidase de 110 kDa de la famille des sérines protéases. Elle est codée par un gène d'environ 90 kb situé sur le bras long du chromosome 2 qui possède une région riche en GC, représentant un site de liaison pour des facteurs de transcription. (Blais et al., 1999; de Meester et al., 2003; Lambeir et al., 2003). Cette ectoenzyme est exprimée à la surface apicale de cellules aussi différentes que les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins, les cellules alvéolaires et les glandes séreuses sous-muqueuses des poumons, qu'au niveau de la membrane basale des podocytes glomérulaires et des microvillosités formant la bordure en brosse du tubule proximal (Fukasawa et al., 1981; Kenny et al., 1976; Kenny et al., 1977; Kettmann et al., 1992; Lojda, 1979; Mentzel et al., 1996; van der Velden et al., 1998). En fait, la protéine DPPIV est exprimée principalement dans le rein et l'intestin grêle, mais elle est aussi présente dans les poumons, la moëlle osseuse, le foie et la rate. (de Meester et al., 2003; Gorrell et al., 2001; Vanhoof et al., 1992).

Une forme soluble circulante de la DPPIV est aussi présente dans le plasma ainsi que dans différents liquides biologiques de l'organisme puisque son action est détectable de façon significative au niveau du plasma.

La DPPIV possède plusieurs fonctions physiologiques. D'une part, par son activité peptidasique, elle module l'activité de plusieurs peptides. Ainsi, elle inactive les kinines en scindant les dipeptides situés en N-terminal de polypeptides possédant un résidu Pro ou Ala en deuxième position. Elle clive préférentiellement les dipeptides à partir de substrats composés de 30 aa ou moins ou des dipeptides liés à un composé chromogénique ou fluorogénique, tel que le p-nitroanilide (p-NA). (Gorrell et al., 2001; Hildebrandt et al., 2000). Parmi les principaux peptides clivés par cette enzyme, on retrouve les chimiokines, les neuropeptides (neuropeptide Y), la substance P (SP) ainsi que certaines hormones peptidiques circulant dans le sang (Lambeir et al., 2003). La DPPIV joue donc un rôle majeur dans la régulation de plusieurs processus physiologiques. Elle est considérée comme un marqueur de pronostic ou de diagnostic dans une variété de tumeurs, de désordres inflammatoires, immunologiques et d'infections virales. Elle est aussi impliquée dans l'inflammation ainsi que dans certaines fonctions endocrines tel que le maintien de l'homéostasie du glucose via sa capacité à inactiver et dégrader le peptide-1 glucagon-like (GLP-1) de l'intestin (Lambeir et al., 2003).

Outre son activité peptidasique, la DPPIV est identique à la glycoprotéine CD26 originellement considérée comme une molécule impliquée dans l'activation des cellules T et maintenant considérée comme un antigène non linéaire dont l'expression est régulée par le statut d'activation et de différenciation des cellules immunes. Ceci explique pourquoi la DPPIV a une activité de co-stimulation sur la prolifération des granulocytes et des macrophages (Lambeir et al., 2003).

4.5 L'aminopeptidase N (APN)

L'aminopeptidase N, identique au CD13 (APN, CD13; EC 3.4.11.2), est une protéase transmembranaire de 150 kDa exprimée dans une grande variété de tissus et de types cellulaires (leucocytes, fibroblastes, cellules endothéliales et épithéliales) tout en étant hautement présente dans l'intestin, le placenta et dans la bordure en brosse du tubule proximal rénal (Antczak et al., 2001; Kehlen et al., 2003; Pfeleiderer and Celliers, 1963; Shipp and Look, 1993). C'est une enzyme membranaire composée de 967 aa et caractérisée par une séquence C-terminale extracellulaire renfermant le site catalytique, une partie transmembranaire et une courte queue cytoplasmique en partie N-terminale (Olsen et al., 1988). L'APN est ancrée à la membrane plasmique via une séquence signal situé en C-terminal du côté extracellulaire (Antczak et al., 2001). Une forme soluble de l'APN est aussi présente dans le plasma et le sérum, mais le mécanisme responsable de la relâche de cette enzyme au niveau membranaire demeure inconnu.

L'APN catalyse l'hydrolyse de résidus d'acides aminés neutres situés en position N-terminale de différents peptides (Riemann et al., 1999; Shipp and Look, 1993). Les principaux substrats biologiques de cette métallopeptidase sont des neuropeptides (neurokinine A, endorphines, Met-Lys-BK), des peptides vasoactifs (kallidine, angiotensine, somatostatines) et des peptides chimiotactiques (Ahmad et al., 1992; Ahmad et al., 1992; Ahmad and Ward, 1990; Chansel et al., 1998; Furuhashi et al., 1988; Giros et al., 1986; Lendeckel et al., 1999; Lendeckel et al., 2000; Llorens-Cortes, 1998; Lucius et al., 1995; Miller et al., 1994; Mizutani et al., 1987; Montiel et al., 1997; Robertson et al., 1992; Waksman et al., 1984; Wang et al., 1991; Yamamoto et al., 1998; Zini et al., 1996). L'APN sert aussi de récepteur pour les coronaravirus (Delmas et al., 1994; Yeager et al., 1992). L'activité de cette enzyme peut aussi être inhibée par l'amastatine, par un anticorps monoclonal inhibiteur du site actif (WM-15) et par la présence en concentration élevée, de leucine, de proline, de L-alanine, de L-arginine, de L-méthionine ainsi que de divers cations divalents (Lendeckel et al., 2000).

4.6 Relation entre les peptidase et l'AO

Plusieurs travaux de recherche menés dans notre laboratoire au cours des dernières années ont permis de contribuer à la compréhension du métabolisme plasmatique des kinines. En effet, on a rapporté l'implication de 3 peptidases présentes *in vivo* et responsables du métabolisme de la BK, soit la kininase I, transformant la BK en son métabolite actif, la des-Arg⁹-BK, la kininase II et l'endopeptidase neutre inactivant la BK et la des-Arg⁹-BK (Decarie et al., 1996).

Par la suite, il a été démontré que l'AOA associé à la prise d'iECA était caractérisé par une dégradation anormale de la des-Arg⁹-BK et par une faible activité plasmatique de l'aminopeptidase P (Molinaro et al., 2002). Il a aussi été démontré lors d'une autre étude menée au sein de notre laboratoire de recherche, que l'on retrouvait une activité d'APP plus faible chez les patients ayant déjà présenté un épisode d'AO comparativement à ceux n'en ayant jamais présenté. Ces résultats suggèrent qu'une faible concentration en APP pourrait être considérée comme un facteur prédisposant pour le développement d'AOA chez les patients traités aux iECA (Adam et al., 2002).

Finalement, ce n'est que l'an dernier qu'une forme sécrétée d'APP membranaire humain a été synthétisée et caractérisée pour la première fois dans notre laboratoire (Molinaro et al., 2005).

5. Les récepteurs des kinines

Les effets pharmacologiques des kinines résultent de l'activation de deux types de récepteurs couplés aux protéines G ($G\alpha_q/11$ et $G\alpha_i$) soit : le récepteur B₁ (B₁R) et le récepteur B₂ (B₂R) (Drouin et al., 1979; Drouin et al., 1979; Marceau et al., 1998; Regoli et al., 1977; Regoli et al., 1978). L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes peptidiques a permis de définir le profil pharmacologiques de chacun de ces deux récepteurs spécifiques aux kinines (Marceau et al., 1998; Regoli and Barabe, 1980; Regoli et al., 1977; Vavrek and Stewart, 1985).

5.1 Propriétés communes aux récepteurs B₁ et B₂

5.1.1 Au niveau génique

Les gènes codant pour les récepteurs B₁ et B₂ sont localisés en tandem sur le même locus du chromosome 14 (14q32.1-q32.2) où ils ne sont séparés que par 20 000 paires de base (Bachvarov et al., 1998; Chai et al., 1996; Ma et al., 1994). L'homologie entre la séquence d'acides aminés du récepteur B₁ et celle du récepteur B₂ dépend de l'espèce animale et n'est que de 36% chez l'homme (Fredriksson et al., 2003; Leeb-Lundberg et al., 2005).

Le gène (*BDKRB1*) codant pour le B₁R chez l'humain possède une structure composée exclusivement de trois exons (Bachvarov et al., 1996; Yang and Polgar, 1996). Il est composé de 353 aa et possède trois sites consensus de glycosylation dans son domaine extracellulaire, les motifs DRY (Asp-Arg-Tyr) et NPXXY (Asn-Pro-XX-Tyr) ainsi qu'un site de phosphorylation et d'acylation (Gabra et al., 2003).

Chez l'humain, la protéine B₂R, codée par le gène *BDKRB2*, est composée de 364 aa. La structure de B₂R, similaire à celle du B₁R, est formée d'une chaîne simple polypeptidique à sept passages transmembranaires, d'un domaine N-terminal extracellulaire et d'un domaine C-terminal intracellulaire (Gabra et al., 2003). De plus, la structure de ce second sous-type de récepteur est également composée de trois sites consensus de glycosylation au niveau extracellulaire ainsi que des motifs DRY et NPXXY dans son domaine cytosolique (Fredriksson et al., 2003; Moreau et al., 2005). La particularité du B₂R est la présence de sites putatifs de phosphorylation et d'acylation au niveau de sa queue C-terminale, contenant des résidus sérine et thréonine (Leeb-Lundberg et al., 2005).

5.1.2 Seconds messagers

Selon le type cellulaire, les récepteurs des kinines transmettent leur réponse au niveau intracellulaire en activant différentes voies de signalisation, lesquelles utilisant plusieurs seconds messagers.

La famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), comprend plus d'un millier de membres qui peuvent être activés par une très grande variété de messagers chimiques. Les RCPG sont constitués par une seule chaîne polypeptidique comportant sept régions hydrophobes transmembranaires, associée à un groupe hétéro-trimérique de protéines intracellulaires soit : les protéines G. Ces protéines G sont constituées d'une sous-unité α liée au GDP, et de deux sous-unités β et γ indissociables. Elles sont fixées à la membrane plasmique par une ancre lipidique (Milligan and Grassie, 1997).

Lorsqu'ils sont activés par leur ligand, les RCPG catalysent l'échange du GDP par du GTP ; les protéines α d'une part, et $\beta\gamma$ d'autre part, deviennent alors capables de moduler l'activité de différents effecteurs intracellulaires : enzymes, canaux et échangeurs ioniques (Bockaert and Pin, 1999). Il existe différents types de protéines G pouvant être liées au récepteur. Parmi ceux-ci, on retrouve la protéine $G\alpha_q$, la $G\alpha_i$, la $G\alpha_s$ et la $G\alpha_{12/13}$. Le signal émit par le récepteur peut donc être inhibiteur ou activateur selon le type de protéine à laquelle le récepteur est couplé. En effet, le B_2R n'implique pas l'activation de la protéine $G\alpha_q$, mais interagit avec d'autres types de protéine G incluant la $G\alpha_i$, la $G\alpha_s$ et la $G\alpha_{12/13}$ (Ewald et al., 1989; Gohla et al., 1999; Gutowski et al., 1991; Jones et al., 1995; Liebmann et al., 1996; Linder et al., 1990; Wilk-Balszaczak et al., 1994).

La liaison de B_1R et de B_2R à leurs agonistes provoque l'activation de la phospholipase C qui induit la libération des seconds messagers inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG) (Yusuf et al.) (Moreau et al., 2005). L' IP_3 est responsable de la libération biphasique de calcium intracellulaire soit par le réticulum endoplasmique et l'activation des canaux calciques (Leeb-Lundberg et al.,

2005; Marceau, 2005; Yusuf et al., 2000). Le Ca^{2+} ainsi libéré active la NO-synthase endothéliale, initiant la formation de NO. Le NO diffuse à l'extérieur des cellules et stimule la guanylate cyclase sur les cellules musculaires lisses (CML). La guanylate cyclase produit du GMPc qui stimule la relaxation des CML ayant comme effet la dilatation des vaisseaux (Busse and Fleming, 1996; Leeb-Lundberg et al., 2005; Marceau, 2005). De son côté, le DAG active la protéine kinase C responsable de l'activation des MAPK. La MAPK activée, tout comme l'accumulation de Ca^{2+} par l' IP_3 , stimule la phospholipase A_2 . La phospholipase A_2 engendre la libération de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires métabolisés en eicosanoïdes : les prostaglandines E_2 et I_2 et les leucotriènes (Leeb-Lundberg et al., 2005). Les prostaglandines ainsi formées activent, via leur récepteur, les adénylates cyclases membranaires afin de produire l'AMPc. L'accumulation d'AMPc dans les CML entraîne aussi une relaxation vasculaire. L'activation du B_2R , en conduisant à la phosphorylation des MAPK, peut aussi promouvoir la phosphorylation de la PLC et du Hsp90 pour ainsi intervenir dans le contrôle de la production de NO via la NO-synthase (Fleming et al., 1995; Fleming et al., 1996; Harris et al., 2000; Ju et al., 2000; Marrero et al., 1999).

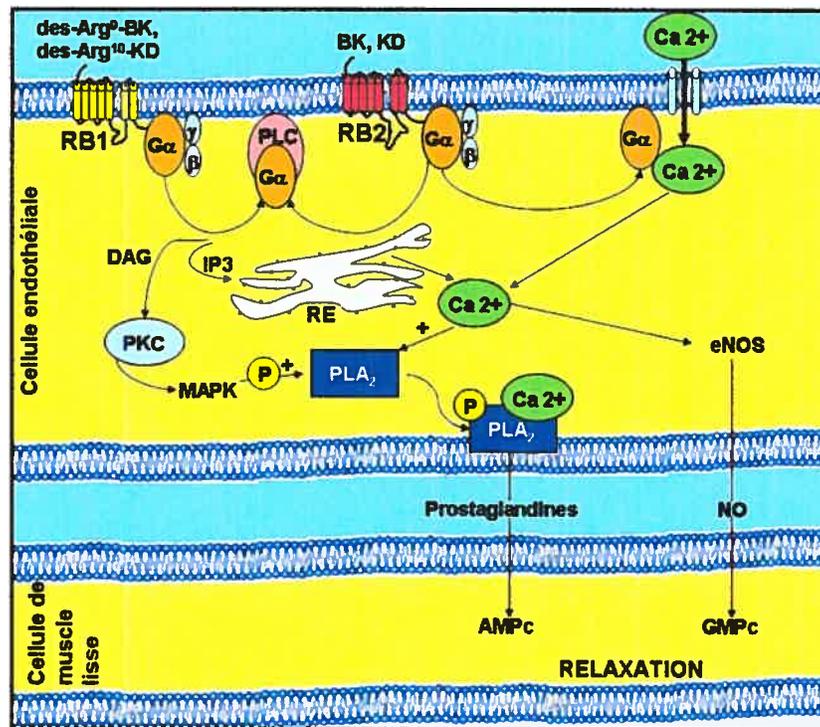


Figure 6. Les récepteurs des kinines et leurs voies de signalisation (Moreau et al., 2005).

5.1.3 Propriétés pharmacologiques

La localisation des récepteurs des kinines au niveau de différents tissus et types cellulaires, entres autres dans le système cardiovasculaire ainsi que le tractus urinaire et intestinal est responsable de la variation de leurs activités pharmacologiques. La réponse associée à leur stimulation via les kinines est la cause de plusieurs processus biologiques comme la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la stimulation des fibres nociceptives ainsi que la contraction des fibres musculaires lisses (Leeb-Lundberg et al., 2005; Regoli and Barabe, 1980). Les récepteurs B_2 et B_1 des kinines seraient impliqués respectivement dans la phase aiguë et chronique de la douleur et de la réponse inflammatoire.

L'activation du récepteur B_2 est en partie à l'origine des effets bénéfiques des iECA utilisés dans le traitement des maladies cardiovasculaires. En fait, le rôle

bénéfique des kinines dans les effets cardioprotecteurs et antihypertenseurs des iECA ainsi que leur utilisation dans le traitement d'autres maladies incluant le diabète est bien documenté. L'implication du B₂R se situe dans la plupart des signes cardinaux de l'inflammation dont l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la dilatation artérielle, l'œdème, la douleur et la libération de médiateurs proinflammatoires comme les prostaglandines (Marceau, 1995).

Le récepteur B₁ participe, quant à lui, à la phase chronique de ces récepteurs et semble jouer un rôle stratégique dans les maladies inflammatoires ayant une forte composante immune telle que l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, le choc septique ou le diabète (Couture et al., 2001).

5.2 Particularités du récepteur B₁ (B₁R)

Le récepteur B₁ est exprimé dans divers types cellulaires incluant les fibroblastes, les cellules mésangiales, les cellules endothéliales (au niveau de l'artère pulmonaire et de l'aorte), les macrophages, les cellules musculaires lisses et les ostéoblastes (Bhoola et al., 1992; Couture et al., 2001). Ce récepteur est principalement activé par les métabolites actifs des kinines soit la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD (Marceau et al., 1998).

Le B₁R est un récepteur inductible puisqu'il n'est généralement pas présent dans les tissus sains. Son expression est induite en présence de cytokines, principalement l'interleukine-1 β , l'interleukine-6 et le facteur de nécrose tumorale (IL- 1 β , Il-6 et TNF- α), d'endotoxines ou suite à un traumatisme comme une lésion tissulaire (Bouthillier et al., 1987; deBlois et al., 1988; deBlois et al., 1989; Levesque et al., 1995). L'induction du B₁R par les cytokines est contrôlée par la voie des MAPK (p38 et JNK) ainsi que via le facteur de transcription nucléaire- κ B (Campos et al., 1998; Ganju et al., 2001; Larrivee et al., 1998; Leeb-Lundberg et al., 2005; Medeiros et al., 2004). En plus, de récentes études avancent l'hypothèse que l'activation du récepteur constitutif B₂ induirait l'expression du récepteur B₁. En effet, suite à l'activation du

B₂R, de nombreuses cytokines proinflammatoires sont libérées au site lésé, pouvant ainsi mener à l'induction de l'expression du B₁R (McLean et al., 2000). Cette hypothèse proposant l'induction du récepteur B₁ par le récepteur B₂ demeure tout de même controversée dans la littérature. Une autre étude portant sur les effets d'un traitement chronique aux iECA chez le rat et sur l'expression fonctionnelle du B₁R et du B₂R, responsable des effets biologiques des kinines, a rapporté une première évidence reliant ces deux phénomènes. En effet, l'administration d'un traitement chronique aux iECA chez des rats et des souris souffrant d'hypertension a mené à une augmentation de la concentration de BK et de l'expression du récepteur B₁ au niveau rénal et vasculaire (Marin-Castano et al., 2002). Une étude a aussi été effectuée chez le cochon afin de vérifier la présence ainsi que la variation de l'expression, au niveau des tissus oropharyngiens, des récepteurs des kinines (B₁R et B₂R) et de différentes métallopeptidases responsables du métabolisme des kinines, suite à un traitement aux iECA. Les résultats de cette étude ont démontré que l'expression génique des récepteurs B₁ et B₂ des kinines ainsi que la concentration de BK sont augmentées au niveau des tissus oropharyngiens suite à un traitement de 7 jours aux iECA chez les animaux (Moreau et al., 2005). Les résultats de ces deux études nous permettent donc de constater que le traitement aux iECA, accompagné d'une augmentation de la concentration de BK, entraîne une augmentation de l'expression génique du récepteur B₁.

Le B₁R n'est pas propice à une désensibilisation, un mécanisme d'adaptation du récepteur caractérisé par une réduction du nombre et/ou de l'efficacité des récepteurs et par une réduction de leur affinité pour un agoniste (Blaukat et al., 1999). L'incapacité de ce sous-type de récepteur à se désensibiliser peut être expliqué par le fait que le B₁R ne peut pas être phosphorylé ni internalisé suite à une stimulation via un de ses agonistes spécifiques et ce, causé par l'absence d'une séquence spécifique située à l'extrémité C-terminale du domaine cytoplasmique du récepteur et qui serait aussi responsable de l'internalisation et de la séquestration du récepteur B₂ (Faussner et al., 1996). L'absence de désensibilisation du récepteur B₁ en présence de son

agoniste entraîne des réponses persistantes et des effets biologiques prolongés lors de la liaison de ligands.

5.2.1 Agonistes et antagonistes

Durant les deux dernières décennies, plusieurs études ont porté sur le développement d'agonistes et d'antagonistes spécifiques aux récepteurs des kinines afin de mieux définir ces deux sous-types, B₁R et B₂R (Stewart, 1995). La particularité structurale des agonistes de haute affinité pour le récepteur B₁ se base sur l'absence du résidu Arg situé à l'extrémité C-terminale. Cette particularité est présente au niveau de la structure de la des-Arg⁹-BK, de la des-Arg¹⁰-KD, de la Sar-[D-Phe⁸]-des-Arg⁹-BK et de la Tyr-Gly-Lys-Aca-Lys-des-Arg⁹-BK, ayant aussi une haute affinité pour le B₁R.

La première séquence prototype d'antagoniste du B₁R a été définie par Regoli et ses collaborateurs comme étant [Leu⁸] des-Arg⁹-BK (Regoli et al., 1977). En contre partie, suite à des études chez diverses espèces animales (rat, souris et cochon d'Inde), ce prototype ne s'est pas montré actif dans différents essais biologiques pré-établis tels que la production d'hypotension *in vivo* ou alors la contraction de l'utérus de rat ou de l'iléum de cochon d'Inde *in vitro* (Regoli and Barabe, 1980). Plusieurs antagonistes de potentiel variable ont été synthétisés suite à la substitution du résidu Phe⁸, dans la séquence originale de la des-Arg⁹-BK, par un résidu aliphatique ou par une chaîne hydrocarbonée saturée (Regoli and Barabe, 1980). L'ajout d'un résidu Lys à l'extrémité N-terminale de ce prototype de base permet aussi la formation de l'antagoniste naturel optimal du B₁R, soit le Lys- [Leu⁸] des-Arg⁹-BK, en lui permettant d'acquérir une affinité très forte pour ce sous-type de récepteur chez l'humain, le lapin ainsi que d'autres espèces excluant le rat (Marceau et al., 1998). Des modifications de ce nouveau prototype de haute affinité pour le B₁R ont aussi été effectuées afin d'améliorer la stabilité et la sélectivité des antagonistes du B₁R, pour ainsi permettre l'investigation et l'application thérapeutique de ce dernier (Marceau et al., 1998). Plusieurs antagonistes non-peptidiques ont aussi été étudiés dans les

dernières années en utilisant des modèles d'inflammation et de douleur, sans toutefois apporter les résultats escomptés. Ils sont d'ailleurs toujours en développement. Les principaux antagonistes du B₁R sont inscrits dans le tableau récapitulatif présenté ci-dessous (Tableau I).

Antagonistes des récepteurs B₁ et B₂			
Antagonistes	B₁	B₂	Références
1 ^{ère} génération	[Leu ⁸] des-Arg ⁹ -BK Lys- [Leu ⁸] des-Arg ⁹ -BK	[D-Phe ⁷]-BK [Thi ^{5,8} , D-Phe ⁷]-BK	(Regoli et al., 1977) (Marceau et al., 1998) (Vavrek et Stewart, 1985)
2 ^e génération	Des-Arg ¹⁰ -HOE 140 D-Arg- [Hyp ³ , Igl ⁵ , D-Igl ⁷ , Oic ⁸] -BK R-715 : Ac-Lys-Arg-Pro- Gly-Phe-Ser- βD- Nal-Ile B-9958 : Lys-Lys-Arg-Pro- Hyp-Gly-CpG-Ser- D-Tic-CpG	D-Arg [Hyp ³ , Thi ⁵ , D- Tic ⁷ , Oic ⁸]-BK NPC-17731: D-Arg-Arg-Pro-Hyp- Gly-Phe-Ser-Y-Oic- Arg Hoe 140 (Icatibant): D-Arg-Arg-Pro-Hyp- Gly-Thi-Ser-Tic-Oic- Arg	(Rhaleb et al., 1992) (Burkard et al., 1996) (Hock et al., 1991) (Gobeil et al., 1996) (Gobeil et al., 1996) (Larrivee et al., 2000) (Marceau et al., 1998) (Lembeck et al., 1991)
3 ^e génération	Composés non-peptidiques : - Compound 11 - SSR240612 - Compound 12	Composés non-peptidiques : - WIN64338 - WIN62318	(Salvino et al., 1993), (Regoli et al., 1998) (Altamura et al., 1999) (Su et al., 2003) (Gougat et al., 2004) (Ritchie et al., 2004)

Tableau I. Les différents antagonistes du B₁R et du B₂.

5.3 Particularités du récepteur B₂ (B₂R)

Le B₂R est un récepteur constitutif responsable de la plupart des réponses pharmacologiques des kinines observées lors des processus inflammatoires et nociceptifs, mais également des effets vasoactifs attribués à la BK. La distribution de ce récepteur est ubiquitaire : il a été identifié sur les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules mésangiales et épithéliales, les neutrophiles polynucléaires, les cellules musculaires lisses, les astrocytes et certains neurones (Bhoola et al., 1992; Couture et al., 2001).

Le B₂R est activé préférentiellement par la BK et la KD et subira une désensibilisation induite par la liaison de son agoniste spécifique impliquant une phosphorylation des résidus Ser et Tyr, situés à son extrémité C-terminale (Leeb-Lundberg et al., 2005). Une internalisation du récepteur suivra la désensibilisation via l'association transitoire, favorisée par la BK, la protéines G α_i avec les cavéoles (de Weerd and Leeb-Lundberg, 1997). En effet, suite à son activation par la BK, le B₂R ainsi que la sous-unité α de la protéine G qui lui est associée subissent une internalisation (Austin et al., 1997; de Weerd and Leeb-Lundberg, 1997). La présence d'un résidu Cys³²⁴ dans la partie cytoplasmique C-terminale du B₂R serait en grande partie responsable de l'internalisation et de la séquestration du récepteur contrôlée par son ligand (Faussner et al., 1996; Moreau et al., 2005). Une étude réalisée par Prado et ses collaborateurs a elle aussi confirmé l'importance de la partie cytoplasmique C-terminale du B₂R dans l'internalisation du récepteur (Prado et al., 1997).

5.3.1 Agonistes et antagonistes

Plusieurs agonistes et antagonistes sélectifs du récepteur B₂, de nature peptidique ou non, ont été développés (Leeb-Lundberg et al., 2005). Les principaux agonistes ayant une grande affinité pour le récepteur B₂ sont les kinines présentes sous forme native dans l'organisme, incluant la BK, la KD et la Met-Lys-BK. En effet, la KD a une affinité significativement élevée pour le récepteur B₂ de l'humain et du lapin, mais moindre pour le B₂R de souris.

La première génération d'antagonistes aux B₂R était basée sur la structure suivante : [D-Phe⁷]-BK mais, après de plus amples études sur ce prototype, son potentiel se démontra plutôt faible (Vavrek and Stewart, 1985). Une deuxième génération d'antagonistes aux B₂R, dont le HOE 140 (icatibant), ayant une durée d'action d'environ quatre heures dans les modèles animaux, fut donc découverte via l'introduction d'un résidu d'acide aminé non-naturel à la séquence de base de ce prototype afin de remédier au problème (Hock et al., 1991). Ce n'est que quelques années plus tard qu'une troisième génération d'antagonistes aux récepteurs B₂ des kinines, disponibles oralement, étant plus lipophile et ayant un poids moléculaire moins élevé, a été mise au point (voir Tableau I).

III. La substance P

1. Définition

La substance P est un peptide de 11 aa qui appartient à la famille des tachykinines. On retrouve ce neuropeptide surtout au niveau du système nerveux central et périphérique, où il agit comme un neurotransmetteur et un neuromodulateur (Maggi et al., 1993; Otsuka and Yoshioka, 1993). Les tachykinines regroupent en fait cinq peptides; la substance P (SP), la neurokinine A (Nk A), la neurokinine B (Nk B), le neuropeptide K et le neuropeptide γ (O'Connor et al., 2004). Leurs séquences d'aa sont représentées au tableau II.

Neuropeptides	Séquences d'acides aminés
SP	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
Nk A	Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val- Gly-Leu-Met-NH ₂
Nk B	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
Neuropeptide γ	Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-Asp-Leu-Ala-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH ₂
Neuropeptide K	Asp-Ala-Asp-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Gln-Val-Ala-Leu-Leu-Lys-Ala-Leu-Tyr-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂

Tableau II. Séquence des cinq peptides constituant la famille des tachykinines

La SP fut découverte en 1931 par von Euler et ses collaborateurs. Ils rapportèrent que des extraits de cerveau et d'intestin de cheval contenaient une substance hypotensive et spasmogénique capable de stimuler les muscles lisses et d'abaisser la pression sanguine (Euler and Gaddum, 1931). La SP a été identifiée comme une tachykinine par Chang et Leeman puisqu'elle induit une réponse contractile du muscle lisse et elle a été isolée ainsi que caractérisée pour la première fois en 1970-1971 à partir d'un tissu hypothalamique bovin (Chang and Leeman, 1970; Chang et al., 1971). Ce neuropeptide est impliqué dans un grand nombre de processus biologiques (Ho and Douglas, 2004). La SP est reconnue comme étant le principal médiateur de l'inflammation neurogénique puisqu'elle induit la synthèse de cytokines proinflammatoires par les macrophages, les éosinophiles, les lymphocytes, les cellules dendritiques, les astrocytes et les cellules de la microglie (Bost et al., 1992; Bost and Pascual, 1992; Joos et al., 2000; Killingsworth et al., 1997; Weinstock et al., 1988).

2. Synthèse

La SP est synthétisée au niveau des ganglions dorsaux et se retrouve principalement dans la partie non myélinisée des fibres C. Elle est aussi fréquemment synthétisée dans les cellules de type B via les ganglions dorsaux, pour ensuite être transportée au niveau central et périphérique (Goto and Tanaka, 2002). La SP agit via sa liaison à un récepteur couplé aux protéines G endogène de haute affinité appelé NK-1R (Ho and Douglas, 2004).

3. Récepteurs et activités pharmacologiques

Il existe trois types de récepteurs des tachykinines, le NK-1R, le NK-2R et le NK-3R (Gerard et al., 1990; Takahashi et al., 1992; Takeda et al., 1991). Ce sont des glycoprotéines à sept passages transmembranaires et ils font aussi partie de la grande famille des récepteurs couplés à une protéine G (Hershey and Krause, 1990; O'Connor et al., 2004). Le NK-1R est activé préférentiellement par la SP alors que le NK-2R et le NK-3R le sont respectivement par la Nk A et la Nk B (Cascieri et al., 1992; Nakanishi, 1991).

La distribution de ces trois récepteurs au niveau du système nerveux central (SNC) et des tissus périphériques diffère énormément. En effet, le NK-1R est exprimé au niveau du SNC ainsi que dans les tissus périphériques (tissus osseux, cellules intestinales, cellules myoïdes, cellules du système immunitaire, lymphocytes, monocytes/macrophages et cellules de la microglie), le NK-2R se retrouve principalement dans les tissus périphériques (partie interne du muscle circulaire) et le NK-3R est exprimé faiblement au niveau du tractus gastro-intestinal et fortement dans le SNC (O'Connor et al., 2004).

Le NK-1R humain est composé de 407 résidus d'acides aminés (MM : 46 kDa) (Gerard et al., 1990; Hopkins et al., 1991). Les deuxième et troisième domaines membranaires de ce dernier sont impliqués dans la liaison à un agoniste ou à un antagoniste, la troisième boucle cytoplasmique est responsable de l'interaction avec la

protéine G et la partie C-terminale cytoplasmique contient des résidus Ser et Thr qui causent la désensibilisation du récepteur une fois qu'il est phosphorylé (O'Connor et al., 2004). Le NK-1R a une large distribution et il est présent dans plusieurs cellules du système immunitaire et de la microglie (Ho et al., 1997; Lucey et al., 1994; Payan et al., 1984; Shanahan et al., 1985; Stanisz et al., 1987; Wozniak et al., 1989). Ce récepteur spécifique à la SP est aussi exprimé par les cellules dendritiques et il a été démontré que les NK-1R présents dans les cellules immunitaires sont similaires, voir même identiques, à ceux exprimés par les neurones (Bost and Pascual, 1992; Marriott and Bost, 2001; McGillis et al., 1990). La liaison de la SP au NK-1R induit une endocytose et une internalisation du récepteur, contribuant ainsi à désensibiliser les cellules au signal de la SP. Cette liaison de la SP à son récepteur de haute affinité amène aussi l'hydrolyse du phosphoinositol en IP₃ et en DAG via une phospholipase C (O'Connor et al., 2004). Cette cascade crée ainsi la mobilisation du calcium provenant du réticulum et active la voie des MAPK.

La SP est impliquée dans la transmission nociceptive (de la douleur) se propageant de la périphérie vers le système nerveux central et ce, en association avec d'autres peptides (Otsuka and Yoshioka, 1993). Elle a aussi un rôle établi dans l'immunité ainsi que dans le déclenchement de réactions inflammatoires. En effet, la SP induit la dégranulation des mastocytes permettant la relâche d'histamine, l'activation des nerfs sensitifs et la relâche de médiateurs inflammatoires, pour ainsi augmenter la perméabilité vasculaire (Pernow, 1983). La SP joue aussi un rôle de peptide proinflammatoire dans l'organisme en induisant la sécrétion de différents médiateurs tels que : l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, l'IL-12 et le TNF- α (Folks et al., 1987; Folks et al., 1988; Ho et al., 1996; Kincy-Cain and Bost, 1997). La SP est aussi associée à plusieurs fonctions intestinales incluant la motilité, la perméabilité des muqueuses et la sécrétion acide (HCl) (Lordal et al., 1996; Pernow, 1983). Elle assure ces différentes fonctions du système digestif suite à sa fixation au récepteur de haute affinité, le NK-1R, exprimé dans la plupart des cellules intestinales. La SP, une fois liée au NK-1R, joue aussi un rôle important dans la physiopathologie des inflammations intestinales (O'Connor et al., 2004).

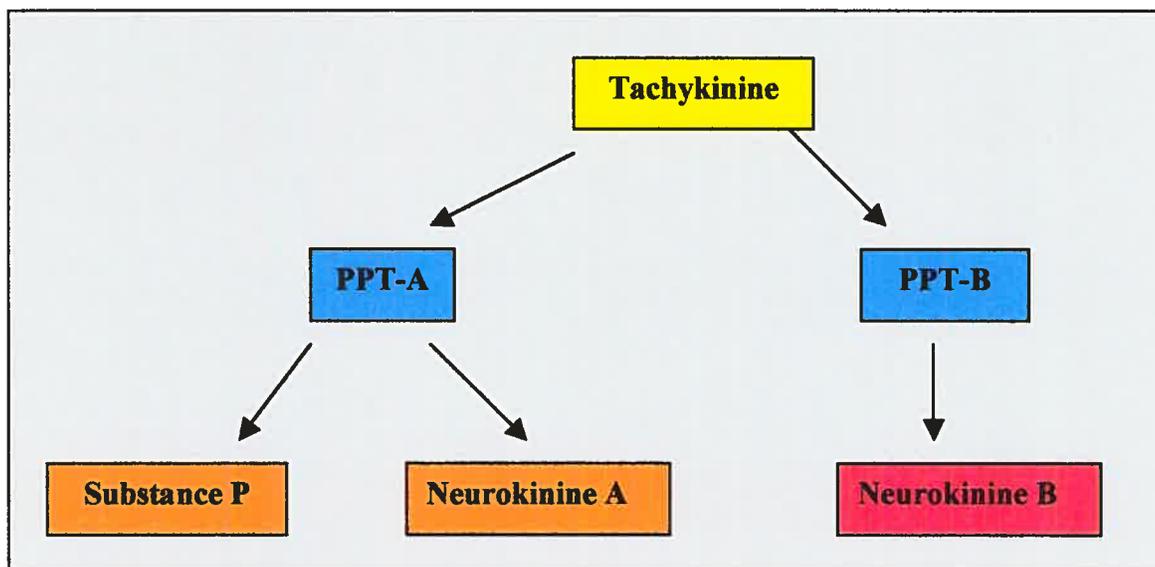


Figure 7. La famille des tachykinines, le produit de deux gènes. PPT-A ; pré-pro-tachykinine A, PPT-B; pré-pro-tachykinine B (Ho and Douglas, 2004).

4. Rôle physiopathologique

La SP et la neurokinine A sont libérées à partir des terminaisons nerveuses des fibres C et jouent un rôle important dans la physiopathologie des maladies respiratoires (Moreaux et al., 2000). En effet, il a été démontré dans diverses études que ces deux peptides participent à la régulation tonique des muscles lisses qui composent les voies respiratoires, à la sécrétion du mucus, à l'extravasation des protéines plasmatiques ainsi qu'à la migration cellulaire et la neurotransmission cholinergique (Advenier et al., 1997; Barnes et al., 1991; Ellis and Udem, 1994; Lagente and Advenier, 1998; Lundberg, 1996; Maggi, 1993; Maggi et al., 1993). La SP peut aussi induire la toux et conduire à une bronchoconstriction, suite à la stimulation des fibres C par différentes substances incluant l'acide citrique et la capsaïcine.

5. Métabolisme

La SP est inactivée et dégradée dans la circulation sanguine principalement par trois enzymes soient : l'EPN, la DPPIV et l'ECA (Joos et al., 2000). Le métabolisme de la SP intravasculaire est principalement contrôlé par l'EPN et l'ECA (Shore et al., 1988). En effet, ces deux peptidases sont très actives au niveau des poumons, elles sont impliquées dans le processus inflammatoire des voies respiratoires et diffèrent dans leur localisation (Nadel, 1994; Patchett and Cordes, 1985). L'ECA est principalement localisée sur les cellules endothéliales contrairement à l'EPN qui est plutôt retrouvée au niveau des cellules épithéliales (Nadel, 1994).

L'EPN est responsable de maintenir, dans des conditions basales, les taux de SP dans les liquides extracellulaires. L'EPN a été localisée dans les poumons de différentes espèces animales et elle est aussi présente dans les cellules alvéolaires de type II, les neutrophiles, les nerfs, les veinules post-capillaires et les cellules basales de l'épithélium (Nadel and Borson, 1991; O'Connor et al., 2004). L'EPN clive la SP aux liens peptidiques $\text{Gln}^6\text{-Phe}^7$, $\text{Phe}^7\text{-Phe}^8$ et $\text{Gly}^9\text{-Leu}^{10}$ et libère le dipeptide $\text{Leu}^{10}\text{-Met}^{10}\text{-NH}_2$ (Skidgel and Erdos, 2004). Une variété d'irritants environnementaux tels que le toluène, la fumée de cigarette et certains pathogènes (virus de l'influenza) peuvent diminuer la concentration d'EPN et donc contribuer à accroître la réponse des voies respiratoires à différentes tachykinines (SP et neurokinine A), contrairement à la présence de glucocorticoïdes qui provoque une augmentation de la synthèse d'EPN. (Borson, 1991; Nadel, 1991; Piedimonte et al., 1990).

La DPPIV module l'inflammation neurogénique en modifiant les taux de SP et elle agit en clivant les deux dipeptides situés en position N-terminale de la molécule. Le clivage de la SP par cette enzyme induit la formation de deux fragments de la SP soient: le fragment $\text{SP}_{(3-11)}$ et $\text{SP}_{(5-11)}$ (Ahmad et al., 1992). Les peptides restants suite à ce clivage demeurent actifs comme transmetteurs pour les nerfs sensitifs, mais ils perdent leur forte affinité ainsi que leur spécificité pour leur récepteur respectif tout en perdant aussi leur capacité à stimuler la relâche d'histamine via les mastocytes (De Meester et al., 1999).

L'ECA a un rôle important dans la dégradation de la SP puisqu'elle induit principalement la relâche d'un dipeptide (Leu-Met- NH₂) ou d'un tripeptide (Gly-Leu-Met-NH₂) placé en C-terminal à partir de la SP (Cascieri et al., 1992; Skidgel and Erdos, 2004; Yokosawa et al., 1983). L'hydrolyse de la SP par l'ECA est chlore (Cl⁻) dépendante et provoque le clivage de la SP aux liens peptidiques Phe⁸-Gly⁹ et Gly⁹-Leu¹⁰ (Skidgel and Erdos, 2004). Cette enzyme provoque la libération d'un tripeptide préférentiellement à partir de la SP ester méthylée et uniquement d'un dipeptide à partir de la SP sous forme d'acide libre et ce, dans un ratio d'environ 4 :1 (Skidgel and Erdos, 2004).

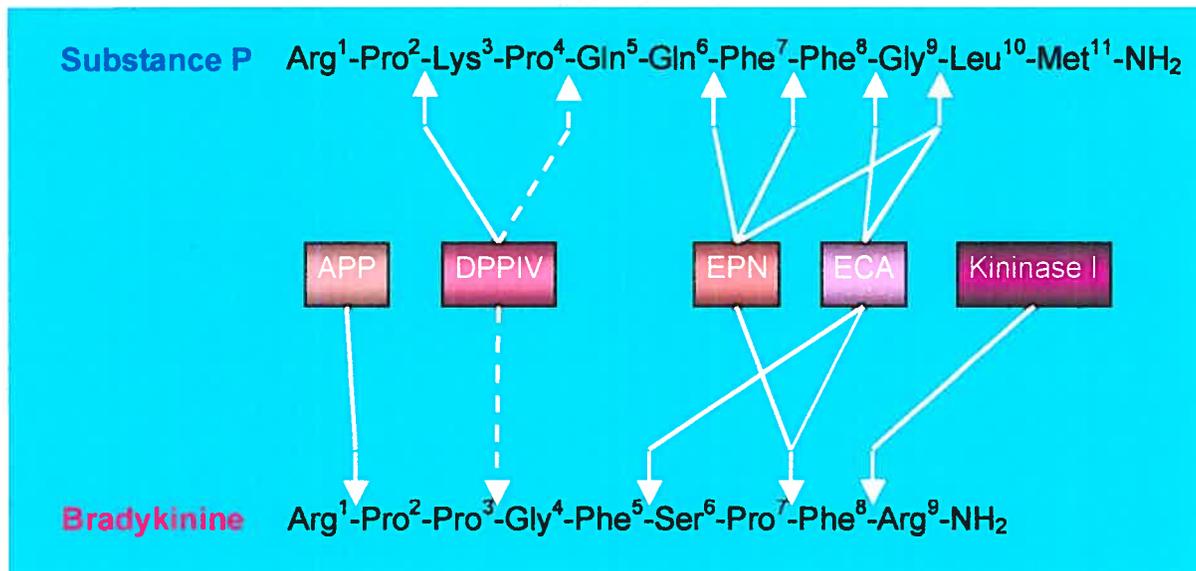


Figure 8. Le métabolisme de la substance P en relation avec celui de la BK.

6. Relation avec les kinines

L'exposition des voies respiratoires à des solutions acides stimule en fait les terminaisons nerveuses et les neurones sensibles à la capsaïcine, causant ainsi différentes réponses respiratoires (Ricciardolo, 2001). En effet, la capsaïcine est un stimuli très fort de la toux causant aussi la bronchoconstriction et agissant au niveau des terminaisons nerveuses pour induire la libération de la SP et des tachykinines via

l'activation du B₂R de la BK. La BK agit ensuite directement sur les fibres C et indirectement sur la relâche de prostaglandines ayant eux aussi des propriétés favorisant le développement de la toux (Semple, 1995). Il a aussi été démontré dans une étude effectuée sur le cochon d'Inde, que l'implication du NK-2R et du NK-1R dans la bronchoconstriction induite par l'acide citrique était médiée par la libération de la BK endogène. En fait, la BK et les tachykinines libérées suite à l'acidification des voies respiratoires peuvent aussi moduler la bronchoconstriction induite par l'acide citrique via leur habilité à produire la libération subséquente de NO bronchoprotecteur par les cellules endothéliales. La bronchoconstriction induite principalement par la stimulation des NK-2R serait donc contrecarrée par la libération de NO suite à l'activation du B₂R et du NK-1R de l'épithélium respiratoire (Semple, 1995) (figure 9).

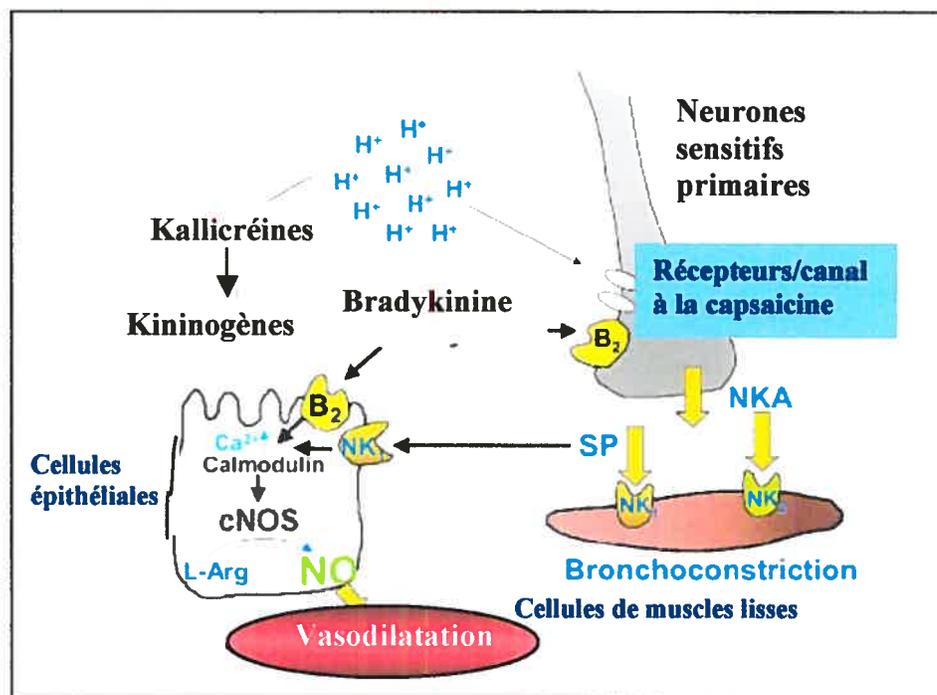


Figure 9. Vasodilatation et bronchoconstriction activée par des protons. L'augmentation de la concentration de protons dans les voies respiratoires provoque la libération de tachykinines (SP et NKA) via l'activation directe du récepteur/canal sensible à la capsaïcine ou par la formation de BK. L'activation des B₂R (B₂) et NK-1R (NK₁) épithéliaux provoque la libération de NO via la NOS constitutive et conduit à une bronchodilatation (Ricciardolo, 2001).

IV But du travail

Notre travail de maîtrise vise à mieux comprendre la physiopathologie de différents types d'AO. Pour ce faire, nous nous sommes fixé trois objectifs principaux.

1) Dans un premier temps, nous étudierons le métabolisme des kinines exogènes dans le plasma de patients atteints d'AOA de nature idiopathique. Pour ce faire, nous définirons la demi vie de dégradation de la BK et de la des-Arg⁹-BK en utilisant une méthode mise au point précédemment (Cyr et al., 2001; Decarie et al., 1994; Raymond et al., 1995). Nous documenterons également l'activité enzymatique des métallopeptidases (ECA, CPN, APP) responsables de leur catabolisme (Cuchacovich et al., 2002; Cyr et al., 2001; Cyr et al., 2001; Lendeckel et al., 1996; Molinaro et al., 2005).

Chez ces mêmes patients, nous doserons pour la première fois la SP dans les urines recueillies dans le décours d'un épisode d'AO et nous comparerons les concentrations de SP retrouvées avec celles d'un groupe témoin.

2) Dans un deuxième temps, nous documenterons en parallèle et, pour la première fois, le métabolisme des kinines et celui de la substance P dans le plasma de patients américains hypertendus ayant présenté un épisode d'AOA associé au traitement par iECA. Dans ce cas, nous doserons l'activité des peptidases communes au métabolisme de ces deux classes de peptides et en particulier celle de la DPPIV.

3) Enfin, en utilisant une approche plus moléculaire, nous poursuivrons l'étude de la régulation du récepteur B₁ *in vivo* chez le lapin et *in vitro* dans un modèle de fibroblastes en culture.

L'ensemble des protocoles expérimentaux utilisés dans ce mémoire ont été approuvés par les comités d'éthique de l'Université de Grenoble, de Vanderbilt, de Laval et de Montréal.

Les échantillons de plasma et d'urine ont été obtenus après un consentement libre et éclairé des patients ou des témoins.

V Méthodologie

Objectif 1 :

Étude du métabolisme des kinines exogènes dans le plasma de patients atteints d'AOA de nature idiopathique.

1. Échantillons de plasma

Les échantillons de plasma obtenus chez 16 patients atteints d'AOA idiopathique nous ont été fournis de manière anonyme par le Dr. Christian Drouet du CHU de Grenoble. Cinq mL de sang ont été prélevés par ponction veineuse de l'avant-bras et recueillis dans des tubes contenant 0,5 mL de citrate de sodium (0,1 mol/L). Après centrifugation (22°C, 15 minutes, 2500xg), le plasma a été décanté et conservé à – 80°C dans des tubes de polypropylène jusqu'au moment des investigations biochimiques.

Les échantillons formant le groupe témoin ont été définis et analysés précédemment dans notre laboratoire (Cyr et al., 2001).

2. Définition de la demi-vie de dégradation de la BK et de la des-Arg⁹-BK

2.1 Procédure d'incubation

Le plasma (495 μL) est incubé à 37°C sous agitation avec 5 μL de BK exogène (Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USA) à une concentration finale de 48 μM . Des aliquots de 50 μL de plasma sont prélevés à différents temps d'incubation, soit 0, 40, 60, 120, 180, 300, 420, 540, 720 secondes. La réaction est arrêtée avec l'ajout de 2 mL d'éthanol anhydre froid à une concentration finale de 80% v/v. Les échantillons sont ensuite centrifugés (à 4°C, 15 minutes, 1750xg) afin d'assurer la précipitation complète des protéines, dont les kininogènes. Le surnageant éthanolique est ensuite évaporé à sec dans le Speed Vac (Thermo Savant, Holbrook, NY). Les culots sont conservés à -20°C jusqu'au moment du dosage des kinines (Cyr et al., 2001).

2.2 Quantification de la BK et de la des-Arg⁹-BK

Les culots des extraits éthanoliques évaporés sont remis en solution dans 300 μL de tampon d'incubation (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,05% v/v, pH 7,4) (Fisher Scientific, Montréal, QC, Canada). Pour effectuer le dosage des kinines, des IgGs polyclonales de lapin dirigées contre la partie C-terminale de la BK ou de la des-Arg⁹-BK (Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USA) ainsi qu'un traceur couplé à la digoxigenin-3-0-methylcarboxyl- ϵ -aminocaproic-acid-N-hydroxysuccinide (DIG-OSu, Fisher Scientific, Montréal, QC, Canada) sont utilisés (Cyr et al., 2001; Decarie et al., 1994; Raymond et al., 1995). Des plaques de 96 puits (demi-surface) sont recouvertes d'IgGs anti-BK ou anti-des-Arg⁹-BK (100 ng/puits dans un volume de 50 μL) dans un tampon de fixation (bicarbonate 100 mM, pH 9,5) et sont ensuite incubées pendant une nuit à 4°C sans agitation (étape de coating). Les IgGs non fixés sont éliminés par lavage et les plaques sont saturées avec le tampon d'incubation pendant 2 heures à 37 °C. Les plaques sont lavées avec du tampon d'incubation avant de procéder à la réaction de compétition entre le traceur et la kinine (BK ou des-Arg⁹-BK) présente dans la courbe de calibration ou dans l'échantillon à doser. Les plaques

sont incubées sous agitation à 4°C pendant une nuit. Après une nouvelle série de lavages, les complexes immuns formés sont incubés, avec agitation pendant 2 heures à la température ambiante avec des fragments Fab antidigoxigénine couplé à la peroxydase de Raifort (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Après une dernière étape de lavages, la présence de complexes immuns est mesurée par révélation de l'activité peroxydasique au moyen d'un substrat chromogène (o-phénylènediamine 0,4 mg/mL (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada)), en solution dans un tampon composé de : citrate de sodium 50 mM, d'acide citrique 30 mM et de peroxyde d'urée 0,1% p/v, pH 5,0. L'absorption de chaque puits est mesurée à $\lambda = 450$ nm avec une référence à $\lambda = 630$ nm (Bio-Tek Instrument, Winooski, VT, USA).

2.3 Paramètres cinétiques

La constante d'hydrolyse (k) des kinines (S) a été obtenue à l'aide de l'équation d'ordre 1 : $S = S_0 \times e^{-kt}$, et la valeur de la demi-vie de dégradation ($t_{1/2}$) a été calculée avec $t_{1/2} = \ln(2)/k$ (Moore and Pearson, 1981).

3. Dosage de l'activité enzymatique des métallopeptidases (APP, ECA et CPN) responsables du catabolisme de la BK et la des-Arg⁹-BK

3.1 L'aminopeptidase P

Le dosage de l'activité de l'APP plasmatique s'effectue en cinétique à l'aide d'un substrat Lys(dinitrophényl)Pro-Pro-Gly-Lys(o-acide aminobenzoïque) fluorescent (Lys(Dnp)Pro-Pro-Gly-Lys (Abz)) (synthétisé par le Pr. A. Camona, département de biophysique, Escola Paulista de Medecine, Universidade Federal de Sa'õ Paulo, Sa'õ Paulo, Brésil). Chaque échantillon est dosé en triplicata dans des plaques multipuits (Costar UV plate transparent Flat Bottom, non-stérile, acrylic, Corning Incorporated, NY). Le milieu d'incubation (volume : 400 μ L/puits) consiste en 10 μ L de plasma à doser, 125 μ L de tampon HEPES (0.1 mM, à pH 7,4) et 15 μ L de substrat

Lys(Dnp)Pro-Pro-Gly-Lys (Abz) (concentration finale de 10 μM) préincubé à 37°C. L'émission de fluorescence est mesurée en cinétique pendant 90 min à $\lambda = 420$ nm (excitation $\lambda = 350$ nm) au moyen d'un appareil FL600 microplate fluorescence reader (BioTek, Winooski, VT, USA). L'activité de l'APP est exprimée en μmol de substrat hydrolysée sachant que 8500 unités de fluorescence, dans les conditions expérimentales utilisées, correspondent à 1 μmol de substrat (Molinaro et al., 2005).

3.2 L'enzyme de conversion de l'angiotensine

L'activité de l'ECA est mesurée par méthode radioenzymatique au moyen d'un substrat tritié (^3H -Hippuryl-Gly-Gly) (Bühlmann ACE Radioenzymatic, ALPCO Diagnostics) en suivant les informations du fabricant. Le plasma (10 μL) est incubé avec 100 μL de substrat radioactif en tampon HEPES (0.1 mM, pH 8,0) pour une durée de 60 minutes à 37°C. L'acide chlorhydrique (50 μL) est alors ajouté et le produit d'hydrolyse (acide ^3H -hippurique) est extrait par 1,5 mL de liquide à scintillation avant la mesure de la radioactivité β en coups par minute (cpm). L'activité de l'ECA (en μmol d'acide hippurique/min/L de sérum) est calculée en utilisant la procédure suivante :

- 1- Calculer la moyenne en cpm pour chacun des échantillons, zéro et blanc
- 2- Soustraire la moyenne des blancs de chacun des échantillons en utilisant leur moyenne respective en cpm

$\text{cpm net} = \text{cpm moyen} - \text{cpm moyen des blancs (zéro/standard contenu dans le kit fourni par le fournisseur)}$

- 3- Mesure de l'activité de l'ECA à l'aide de cette formule :

$$\text{Activité de ECA} = \frac{(\text{cpm échantillon} - \text{cpm du blanc de l'échantillon})}{(\text{cpm du standard} - \text{cpm du standard zéro})}$$

3.3 La carboxypeptidase N

L'activité enzymatique de la CPN plasmatique est mesurée au moyen d'une méthode fluorimétrique (Cyr et al., 2001; Skidgel, 1995). Elle consiste à incuber une

heure à 37°C, 180 µL de tampon HEPES (0.1 M à pH 7,4) et 20 µL du plasma en présence de 50 µL de substrat (Dansyl-Ala-Arg, 1 mM, Bachem, Torrance, CA, USA). L'arrêt de la réaction est obtenu par acidification du milieu d'incubation en ajoutant 150 µL d'un tampon citrate/acide citrique (1 M, pH 3,1). Le dansyl-Ala libéré au cours de la réaction est alors extrait par 3 mL de chloroforme. Après centrifugation (10 minutes, à 15°C, 200xg), la phase organique est décantée et la lecture de la fluorescence (excitation $\lambda = 340$ nm, émission $\lambda = 490$ nm) est effectuée (Fluorometer, TD-700). Une courbe de calibration obtenue au moyen de 5 dilutions successives d'une solution de dansyl-Ala (0,125 mM) permet d'obtenir la quantité de substrat hydrolysé.

Une unité d'activité CPN est définie comme : 1 nanomole de dansyl-Ala libéré/minute/mL de sérum d'échantillon.

4. Dosage de la SP dans les urines recueillies dans le décours d'un épisode d'AO

4.1 Échantillons d'urine

Les échantillons (n=13) provenant de patients atteints d'AOA nous ont été fournis de manière anonyme par le Dr. Christian Drouet du CHU de Grenoble. Les échantillons témoins ont été obtenus chez 12 volontaires sains.

Une miction de 50 mL est recueillie, additionnée de 500 µL d'HCl et soigneusement homogénéisée. Après centrifugation (à 4°C, 15 minutes, 1750xg), le surnageant est décanté et conservé à -20°C.

4.2 Extraction des neurokinines urinaires.

La purification des urines a été effectuée par chromatographie hydrophobe sur colonnes C8 (Waters, Milford, MA). L'urine (1 mL) est diluée avec 1 mL d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,1% et ensuite centrifugée (à 4°C, 15 minutes, 800xg). Les colonnes sont conditionnées par lavages successifs au moyen d'acétonitrile (ACN) (3

mL) et de TFA 0,1% (2 mL). Les échantillons d'urine sont déposés et les colonnes sont ensuite lavées successivement au moyen de TFA 0,1% (3 mL) et d'ACN 10%/TFA 0,1% (v/v) (3 mL). La fraction retenue sur la colonne contenant les neurokinines est éluée au moyen d'une solution d'ACN 40%/TFA 0,1% (v/v) (2,5 mL) (Raymond et al., 1995). Ces éluants sont ensuite évaporés à sec dans un Speed Vac (Thermo Savant, Holbrook, NY) durant toute la nuit.

4.3 Dosage de la SP urinaire

La SP urinaire a été dosée en utilisant un immunoessai enzymatique commercial et en suivant les instructions du manufacturier (MD Biosciences Inc., St-Paul, MN, USA).

4.3.1 Principe du dosage

Ce dosage met en œuvre une compétition entre le traceur (SP-biotinylé) et la SP de la courbe de calibration ou des échantillons pour des fragments Fc d'anticorps de lapin dirigés contre la SP. La révélation des complexes immuns est obtenue par réaction du traceur avec des anticorps couplés à la streptavidine et à la peroxydase de Raifort. La révélation est obtenue au moyen d'un substrat 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). L'absorption pour chacun des puits est mesurée à $\lambda = 450$ nm avec une référence à $\lambda = 630$ nm (Bio-Tek Instrument, Winooski, VT, USA). Ce dosage est caractérisé par une spécificité (estimée par le pourcentage de réaction croisée) de 100% pour la SP, les fragments SP₍₂₋₁₁₎, SP₍₃₋₁₁₎, SP₍₄₋₁₁₎ et SP₍₅₋₁₁₎ ainsi que de 5% et <0,01% pour les fragments SP₍₆₋₁₁₎ et SP₍₇₋₁₁₎ respectivement.

5. Traitement statistique des résultats

La significativité de la différence retrouvée entre les divers groupes a été vérifiée en utilisant le test de *t* par l'approche Satterwaite-Welch où l'hétérogénéité possible des variances a été prise en compte. L'ANOVA a aussi été utilisée afin de tester les multiples comparaisons entre le groupe contrôle et les autres groupes. Une valeur de *p*

inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative (Neter et al., 1996).

Objectif 2 :

Étude du métabolisme des kinines et celui de la substance P dans le plasma de patients américains hypertendus ayant présenté un épisode d'AOA associé au traitement par iECA.

1. Échantillons de plasma

Nous avons investigué le métabolisme de la BK, de la des-Arg⁹-BK et de la SP dans le plasma de 38 patients hypertendus présentant un AOA associé à la prise d'iECA ainsi que 67 témoins exposés ou non aux iECA. Sept des échantillons plasmatiques de patients atteints d'AOA ont été obtenus durant un épisode d'AOA associé à la prise d'iECA et 52 des échantillons de témoins étaient exposés aux iECA au moment du recueil de l'échantillon de plasma (voir tableau III). Le sexe des individus de cette étude est similaire entre le groupe de témoins exposés aux iECA et celui de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA. Parmi la population étudiée, on retrouve environ cinquante pourcent de noirs américains et cinquante pourcent de blancs américains. La prévalence à la cigarette était similaire dans les deux groupes et la prévalence à développer du diabète était plus faible dans le groupe de patients lorsque comparée à celle du groupe témoin. Ces échantillons nous ont été fournis congelés de manière anonyme par le Dr. Nancy Brown de l'Université de Vanderbilt (Nashville, Tennessee).

	AOA associé à la prise d'iECA (38)	Témoins exposés aux iECA (67)
Noirs : Blancs	15 : 32	37 : 30
Hommes : Femmes	19 : 19	33 : 34
Âge moyen (années)	59.0 ± 14.6	58.4 ± 9.7
Non-fumeurs : fumeurs : inconnu (N)	23 : 13 : 2	52 : 15 : 0
Non-diabétique : Diabétique : inconnu (N)	30 : 7 : 1	43 : 24 : 0
Exposés aux iECA : Non-exposés aux iECA	13 : 24	56 : 11

Tableau III. Caractéristiques particulières des patients et des témoins de l'étude

2. Méthodes analytiques

2.1 Définition de la demi-vie de dégradation de BK et des-Arg⁹-BK

L'étude du métabolisme de la BK et de son métabolite actif, la des-Arg⁹-BK, a été effectuée en utilisant la même approche analytique que celle décrite sous l'objectif 1.

2.2 Définition de la demi-vie de dégradation de la SP

2.2.1 Incubation

Quatre tubes contenant chacun 100 µL de plasma sont incubés à 37°C sous agitation avec 100 µL de SP exogène à une concentration finale de 10 µg/mL (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada). La réaction est arrêtée après 0, 30, 60, 90 minutes avec l'ajout de 800 µL d'éthanol anhydre froid à une concentration finale de 80% v/v. Les échantillons sont ensuite centrifugés (à 4°C, 15 minutes, 1750xg) afin d'assurer la précipitation complète des protéines. Le surnageant éthanolique est ensuite évaporé

à sec dans le Speed Vac (Savant, Farmingdale, NY, USA). Les culots sont conservés à -20°C jusqu'au dosage de la SP.

2.2.2 Dosage de la substance P par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Les culots des extraits éthanoliques évaporés sont remis en solution dans 200 μL de phase A (5 mM KH_2PO_4 , ACN 25%, pH 3,0) contenant 1% de H_3PO_4 . Les échantillons sont ensuite centrifugés (à 4°C , 10min, 200xg,) et le surnageant est soumis à une chromatographie sur une colonne échangeuse de cations (PolySulfoéthyl Aspartamine de 4.6 mm x. 100 mm, The Nest Group Inc., Southborough, MA, USA), en utilisant l'appareil Agilent 1100 Series system (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). Les deux phases mobiles utilisées ont les compositions suivantes : phase A (5 mM KH_2PO_4 , 25% ACN et de pH 3,0) et phase B (300mM de KCl dans 5 mM de KH_2PO_4 , 25% ACN et de pH 3,0). Le gradient passe de 100% de phase A (0 mM de KCl) à 100% de phase B (300 mM de KCl) à un débit de 1 mL/min. Le temps de rétention et la hauteur des pics de la SP des échantillons sont comparés avec ceux de la SP de référence. Le temps de rétention de la SP native (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) est de 24,5 minutes et la détection est obtenue à $\lambda = 214 \text{ nm}$. Pour chaque échantillon, la demi-vie de dégradation a été calculée de façon semblable à celle de la BK et de la des-Arg⁹-BK sous l'objectif 1 (Moore and Pearson, 1981).

2.3 Dosage de l'activité enzymatique des métallopeptidases (APP, ECA et APN) responsables du catabolisme de BK et de des-Arg⁹-BK

Le dosage de l'APP et de l'ECA a été effectué en utilisant les méthodes décrites sous l'objectif 1.

2.3.1 L'aminopeptidase N

Le dosage de l'activité de l'APN s'effectue également par mesure cinétique de l'absorption de la lumière à 450 nm en utilisant une méthode semblable à celle pour la DPPIV. Le milieu d'incubation a la composition suivante : 20 µL de plasma, 130 µL de tampon PBS (NaCl 135 mM, KCl 2.5 mM, NaHPO₄ 1.5 mM, KH₂PO₄ 1.7 mM, pH 7.4) et 50 µL de substrat Ala-pNA (5 mM) (Bachem, Torrance, CA, USA). L'activité enzymatique de l'APN est exprimée en nmol de substrat hydrolysées /mL /min, grâce à une courbe de calibration ayant été obtenue, dans ce cas, aussi au moyen de para-nitraniline (Lendeckel et al., 1996).

2.4 Dosage de la DPPIV

2.4.1 Dosage de l'activité enzymatique de la DPPIV responsable du catabolisme de la BK, de la des-Arg⁹-BK et de la SP

Le dosage de l'activité de la DPPIV s'effectue en suivant la cinétique d'hydrolyse du Gly-Pro-pNitroaniline (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada). Le milieu d'incubation est le suivant : 20 µL de plasma, 130 µL de tampon Tris-HCl (50 mM, à pH 8.3) et 50 µL de substrat Gly-Pro-pNA, 2 mM). Ce milieu est placé dans une plaque multipuits (plaques Nunc, PolySorp) et il est incubé à 37°C. La mesure de l'absorption à 450 nm de chaque puits est effectuée toutes les 5 min pendant 30 min. L'activité enzymatique de la DPPIV s'exprime en nmol de substrat hydrolysées /mL /min, grâce à une courbe de calibration ayant été obtenue au moyen de para-nitraniline (Lambeir et al., 2003).

2.4.2 Dosage de la DPPIV immunoréactive

Le dosage de la DPPIV immunoréactive a été effectué en utilisant un kit ELISA commercial (CD26, Bender MedSystems, San Bruno, CA).

3. Traitement statistique des résultats

Le traitement statistique des résultats obtenus dans cette partie de notre travail de maîtrise a été effectué en utilisant une méthode identique à celle décrite sous l'objectif 1.

Objectif 3 :

Étude de l'effet de différents traitements pharmacologiques sur l'expression du récepteur B1 in vivo dans le modèle de lapin et in vitro dans le modèle de fibroblastes en culture.

1.1 Protocoles expérimentaux

Ceux-ci ont été réalisés dans le laboratoire du Dr. François Marceau de l'Université de Laval à Québec.

1.1.1 In vitro : culture de fibroblastes, de muscle lisse vasculaire et essai de liaison

Les fibroblastes dermiques ont été cultivés à partir d'explants de tissus sous-cutanés dépourvus de graisse prélevés à la partie interne de la peau de lapin (Zealand White, 1.5-2 kg) (Marceau and Tremblay, 1986). Les fibroblastes ont été mis en culture dans le milieu DMEM (Invitrogen) contenant un supplément de 10% de sérum bovin fœtal et d'antibiotiques. Le muscle lisse dérivé de l'aorte de lapin est utilisé dans certaines expériences comparatives (cellules dérivées explants désendothélialisés, propagées dans milieu 199 avec 10% de sérum bovin fœtal et antibiotiques) (Levesque et al., 1993).

Les fibroblastes dermiques ainsi que les cellules musculaires lisses d'aorte de lapin ont été incubées avec différents agents pharmacologiques (saline physiologique, TNF- α , IL-1 β , LPS) ou différents traitements en combinaison pour des périodes de 2 à 4 h (étanercept (20 μ g/mL), sel sodique du phosphate de dexaméthasone (100 nM)

et antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IRA, 50 ng/mL)) en fonction de la réponse étudiée (concentration de l'ARNm ou des récepteurs de surface). L'essai de liaison est basé sur le radioligand agoniste [^3H]Lys-des-Arg⁹-BK (aussi appelé [^3H]des-Arg¹⁰-KD, PerkinElmer, 64 Ci/mmol) et réalisé comme indiqué précédemment (Sabourin et coll., 2002). Brièvement, les cellules de l'un ou l'autre type sontensemencées dans des plaques de 12 puits (surfaces de culture gélatinées) et cultivées dans le milieu avec sérum. À confluence, on sèvre les cellules en sérum (24 h pour le muscle lisse, 48 h pour les fibroblastes) afin de minimiser l'expression de B₁R; en effet, le sérum de veau fœtal favorise l'expression de ce récepteur (Sabourin et coll., 2002). On a traité les cellules pour des période de 4 h avec des cytokines et, optionnellement, on les a co-traité avec des médicaments inhibiteurs appliqués 30 min avant les cytokines ou leur solvant (saline). L'essai de liaison fut appliqué par la suite. Les puits sont lavés 2 fois avec le milieu de liaison (milieu de culture 199 sans sérum supplémenté avec 0.1% d'albumine bovine sérique, 3 μM amastatine, 1 μM captopril, 1 μM phosphoramidon (Sigma-Aldrich), et 0.02% (poids/vol) NaN₃) et rempli chaque puits d'un mL de ce milieu pré-réchauffé (37°C). Le radioligand (1 nM) et, optionnellement un excès (1 μM) de la version non radioactive de Lys-des-Arg⁹-BK (pour la détermination de la liaison non spécifique) sont alors ajoutés aux cellules. Après 60 min d'incubation à 37°C, chaque puit est lavé 3 fois avec 2 mL de PBS glacé (0°C, pH 7.4) et laissé à sec. Un mL de NaOH 0.1 M est finalement ajouté pour dissoudre les cellules et ce matériel resuspendu est compté par scintillation (5–10 min/vial).

1.2 Extraction de l'ARN

1.2.1 Fibroblastes

L'extraction de l'ARN total contenu dans les fibroblastes dermiques de lapin a été effectuée après 3 h selon une technique mise au point précédemment, et ce, spécifiquement pour les cellules en culture (Chomczynski and Sacchi, 1987).

2. La technique de PCR en temps réel (*real-time PCR*, RT-PCR)

2.1 Transcription de l'ARN en ADNc

L'obtention des séquences d'ADNc pour les échantillons d'ARN des fibroblastes dermiques de lapin s'effectue par une transcription inverse. Deux μL d'oligo-d(T) (5 mM) sont mélangés à 1 μL d'eau stérile, auxquels 5 μL d'ARN provenant des fibroblastes est ajouté. Après une incubation de 3 minutes à 70-85°C et une centrifugation (4°C, 10 secondes), 2 μL de tampon de PCR (contenant 25 mM de MgCl_2), 4 μL de chlorure de magnésium (MgCl_2), 4 μL de déoxynucleotide triphosphates (dNTPs), 1 μL d'inhibiteur de RNase et 1 μL de *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase* (MuLV) (Applied Biosystems, Foster City, CA) sont ajoutés à chacun des échantillons. Ils sont ensuite vortexés et centrifugés (4°C, 10 secondes). La transcription s'effectue dans l'appareil PTC-2000 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, MA) sous les conditions suivantes, 1 heure à 42°C, 10 minutes à 99°C et se termine à 5°C. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à leur prochaine utilisation.

L'obtention de séquences d'ADNc pour les échantillons de muscle lisse d'aorte de lapin s'effectue elle aussi par une transcription inverse, mais en utilisant une enzyme différente soit la Transcriptor RT enzyme (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). En effet, 3.5 μL d'oligo-d(T) (5 mM) sont mélangés à 2 μL d'eau stérile, 4 μL de tampon de PCR (10X + 25 mM de MgCl_2), 8 μL de solution de dNTPs, 1 μL d'inhibiteur de RNase et 0,5 μL de Transcriptor RT enzyme, auxquels 1 μL d'ARN provenant de chacun des échantillons de muscles lisses d'aorte de lapin est ajouté. Les échantillons sont vortexés et centrifugés (4°C, environ 10 secondes). La transcription s'effectue dans l'appareil PTC-2000 Peltier Thermal Cycler sous les conditions suivantes; 30 minutes à 55 °C, 10 minutes à 99 °C et se termine à 5 °C.

<i>ARNm cible</i>	<i>Séquences des nucléotides (5'-3')</i>	<i>Longueur</i>
GAPDH sens (1)	CTG AAC GGG AAA CTC ACT G	19
GAPDH anti-sens (1)	CCT GGT CCT CGG TGT AG	17
B₁R sens (1)	ACT GAG TGT GGC AGA AAT	18
B₁R anti-sens (1)	AAC AGG TTG GCC TTG AT	17
GAPDH sens (2)	CAC CAT CTT CCA GGA GCG AGA TCC	24
GAPDH anti-sens (2)	GTC TTC TGG GTG GCA GTG ATG GC	23
B₁R sens (2)	TGT CCC GGC CGA GTC ACT GTG	21
B₁R anti-sens (2)	GCA CCA GCA CGC TGT AGC GGT	21

Tableau IV. Séquences des oligonucléotides utilisés pour le RT-PCR de l'ARN provenant des fibroblastes dermiques de lapin (1) et des cellules de muscles lisses d'aorte de lapin (2)

2.2 Amplification de l'ADNc du récepteur B₁ par RT-PCR

L'amplification de l'ADNc est effectuée à l'aide de la technique de PCR en temps réel (RT-PCR) sous l'action d'une enzyme appelée polymérase. La technique de RT-PCR requiert l'utilisation d'une paire d'amorces spécifiques, composés d'environ 20 nucléotides complémentaires à une séquence définie des deux brins d'ADNc (tableau IV). Deux μL d'ADNc provenant de chacun des échantillons sont placés dans un volume final de 20 μL contenant 2 mM de MgCl_2 (0,8 μL) et 0,7 μM de chacune des deux amorces sens et anti-sens, de l'eau stérile et 2 μL de LightCycler FastStart DNA SYBRGreen I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Après l'activation initiale à 95°C durant 10 minutes de l'ADN polymérase contenue dans le FastStart DNA SYBRGreen I, l'amplification de l'ADNc est effectuée suite à 47 cycles dont chacun est composé de trois étapes déterminantes :

l'ADNc subit d'abord une dénaturation à 95°C durant 15 secondes, une hybridation de 10 secondes à 60°C pour la réaction avec le GAPDH et le B₁R, suivit d'une élongation à 72°C. Le temps d'élongation est calculé selon la longueur de l'amplicon (nombre de paires de bases/25). La mesure de la fluorescence est obtenue durant la phase d'élongation. Suite à l'amplification, une courbe d'analyse de fusion allant de 65°C à 98°C, selon une vitesse d'augmentation de la température de 0,1°C/s, et ayant une acquisition continue de fluorescence est obtenue.

3. Traitement des résultats

L'efficacité du RT-PCR correspondant à un cycle dans la phase exponentielle est obtenue à partir de la pente des courbes obtenues par le logiciel du Light Cycler correspondant à l'équation suivante:

$$E = 10^{[-1/\text{pente}]} \quad (\text{Pfaffl, 2001})$$

La quantification est effectuée en utilisant un modèle mathématique basé sur l'équation ci-dessous pour déterminer la quantification relative des gènes cibles comparée au gène de référence.

$$\text{Rapport normalisé} = \frac{E_R^{CpR(S)}}{E_T^{CpT(S)}} \quad (\text{Pfaffl, 2001})$$

La quantification relative des échantillons transcrits est basée sur l'efficacité du PCR des transcrits individuels et des déviations des points de croisement (« crossing point » (Cp)) d'un gène de référence et d'un échantillon cible. Les résultats obtenus ont été exprimés en rapport normalisé, rapport donné à partir du gène de référence soit le GAPDH et du gène d'intérêt, le B₁R. L'expression relative du rapport peut être obtenue tel que montré à l'équation (2) où E représente l'efficacité de la réaction, R, le gène de référence, CpR, le crossing point du gène de référence, S, l'échantillon de tissu ou de fibroblaste, T, le gène d'intérêt (B₁R) et CpT, le crossing point du gène d'intérêt.

VI Résultats

Objectif 1 :

Étude du métabolisme des kinines exogènes dans le plasma de patients atteints d'AOA de nature idiopathique.

1. Définition de la demi-vie de dégradation de la BK et de la des-Arg⁹-BK

Les demi-vies de dégradation de la BK et la des-Arg⁹-BK mesurées dans le plasma d'un groupe de patients atteints d'AOA de nature idiopathique et d'une population de référence sont représentées aux figures 10 et 11. La demi-vie de dégradation de la BK dans le groupe de patients (87 ± 8 secondes) est significativement plus élevée que celle du groupe témoin (27 ± 1 secondes). Par contre, il n'y a aucune différence significative entre la demi-vie de dégradation de la des-Arg⁹-BK dans le groupe de patients (541 ± 58 secondes) lorsque comparée au groupe témoin (643 ± 41 secondes).

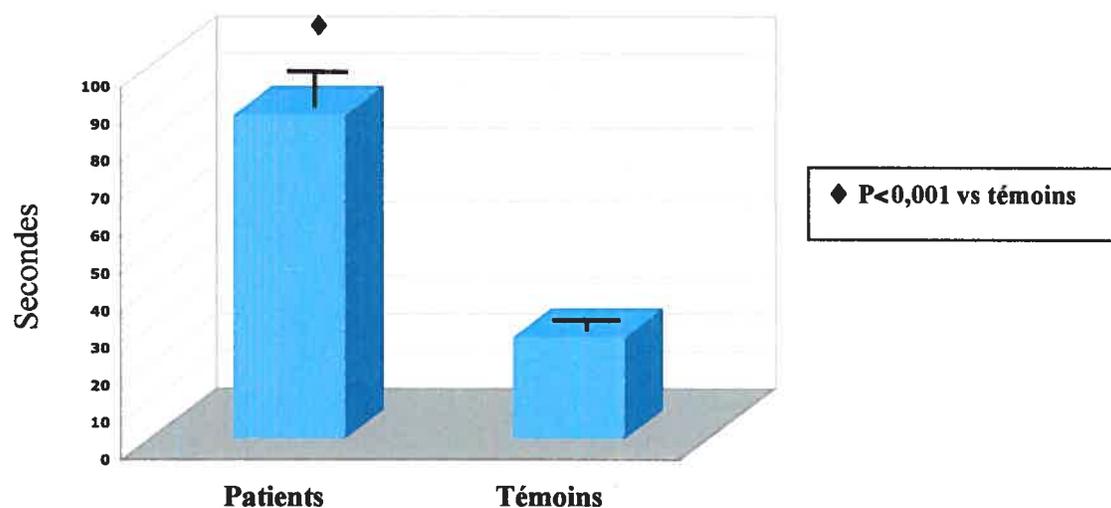


Figure 10. Demi-vie de dégradation de la BK dans le groupe de patients atteints d'AOA de nature idiopathique et dans le groupe témoin

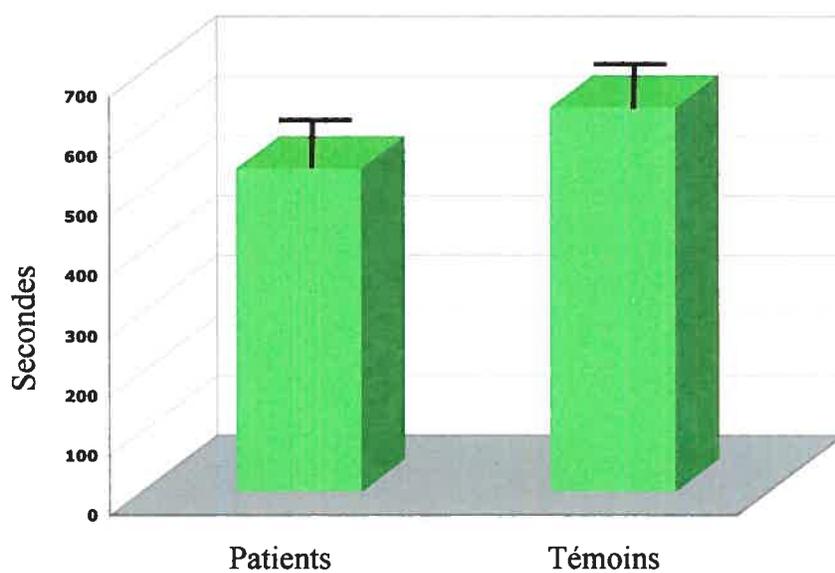


Figure 11. Demi-vie de dégradation de la des-Arg⁹-BK dans le groupe de patients atteints d'AOA de nature idiopathique et dans le groupe témoin

2. Dosage de l'activité enzymatique des métallopeptidases (APP, ECA et CPN) responsables du catabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK

La figure 12 représente les valeurs de l'activité enzymatique de l'APP plasmatique dans le groupe de patients atteints d'AOA de nature idiopathique comparativement à celle du groupe témoin. L'activité enzymatique de l'APP du groupe de patients (178 ± 18 pmol/mL/min) est diminuée de façon significative lorsque comparée avec celle du groupe témoins (317 ± 27 pmol/mL/min).

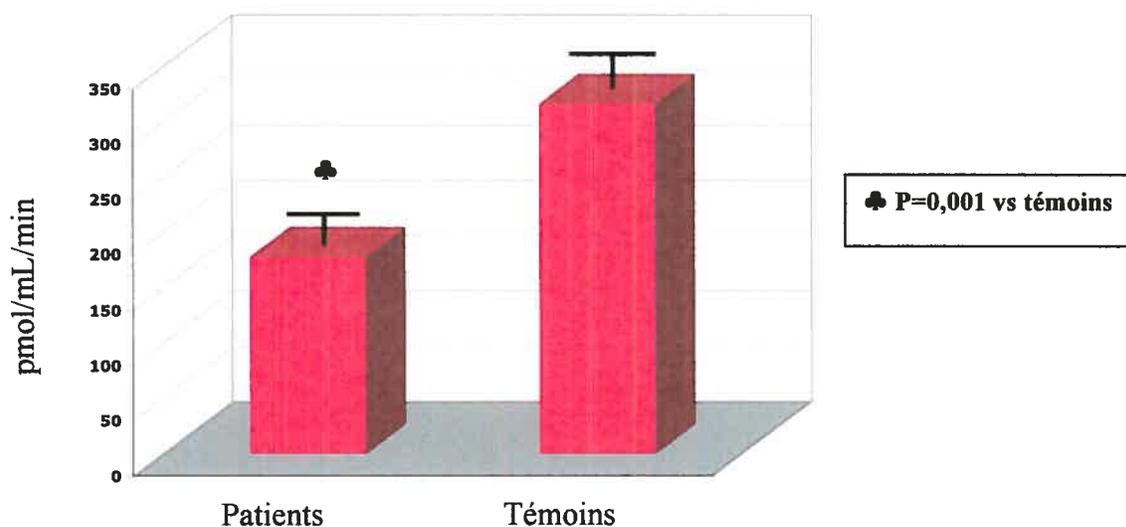


Figure 12. Activité de l'APP dans le groupe de patients atteints d'AOA idiopathique et dans le groupe témoin

De même, la figure 13 montre que l'activité enzymatique moyenne de l'ECA dans le groupe d'AOA (39 ± 2 nmol/mL/min) est significativement diminuée lorsque comparée au groupe témoin (44 ± 1 nmol/mL/min).

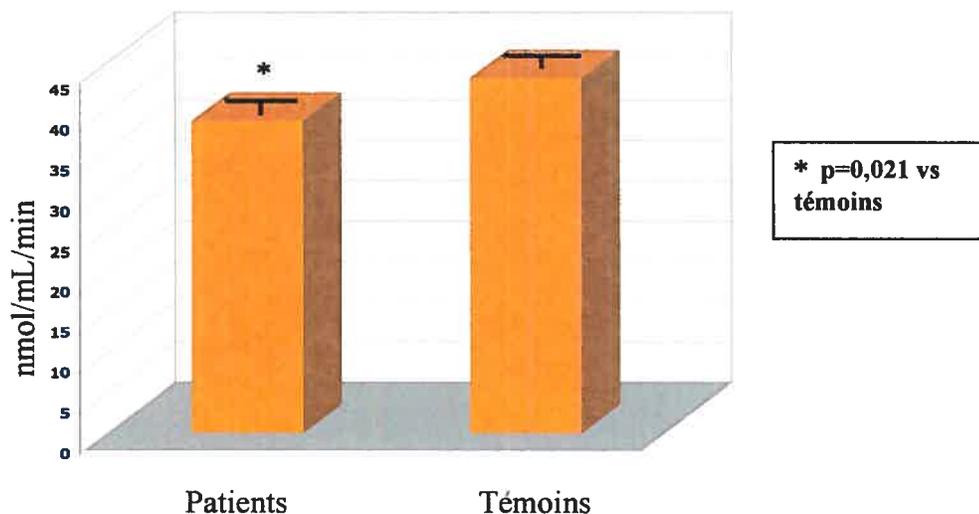


Figure 13. Activité de l'ECA dans le groupe de patients atteints d'AOA de nature idiopathique et dans le groupe témoin

Enfin, nous n'avons pas pu mesurer de différence significative pour l'activité enzymatique de la CPN entre les deux groupes de plasma analysé (AOA : 65 ± 3 nmol/mL/min, témoin : 68 ± 1 nmol/mL/min).

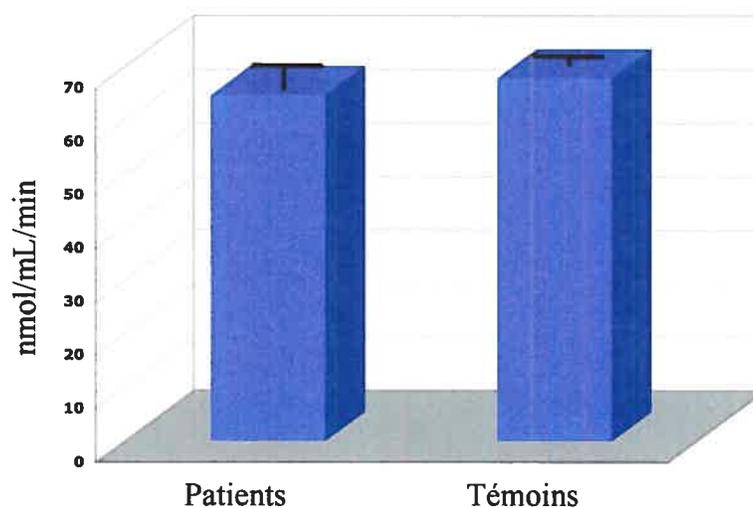


Figure 14. Activité de la CPN dans le groupe de patients atteints d'AOA idiopathique et dans le groupe témoin

3. Dosage de la substance P dans les urines recueillies dans le décours d'un épisode d'AO

La figure 15 représente de façon comparative les concentrations de SP urinaire immunoréactive pour le groupe de patients atteints d'AOA et le groupe témoin. L'analyse statistique des résultats ne révèle aucune différence significative entre les deux groupes (AOA : $0,21 \pm 0,04$ ng/mL, témoin : $0,23 \pm 0,09$ ng/mL).

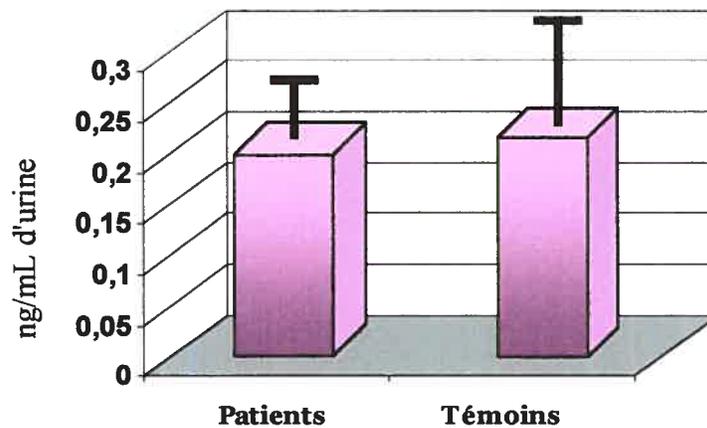


Figure 15. Concentration urinaire de la SP dans le groupe de patients atteints d'AOA de nature idiopathique et dans le groupe témoin

Objectif 2 :

Étude du métabolisme des kinines et celui de la SP dans le plasma de patients américains hypertendus ayant présenté un épisode d'AOA associé au traitement par iECA.

1. Définition de la demi-vie de dégradation de la BK et de la des-Arg⁹-BK

Les demi-vies de dégradation de la BK et de la des-Arg⁹-BK mesurées au niveau plasmatique dans le groupe de patients atteints d'AOA et dans le groupe témoin sont représentées aux figures 16 et 17. Le traitement au moyen d'un iECA augmente de façon significative la demi-vie de dégradation de la BK (AO iECA+ : 157 ± 2 secondes, AO iECA- : 41 ± 4 secondes, témoins iECA+ : 263 ± 29 secondes, témoins iECA- : 52 ± 20) et de la des-Arg⁹-BK (AO iECA+ : 1262 ± 214 secondes, AO iECA- : 456 ± 47 secondes, témoins iECA+ : 2021 ± 224 secondes, témoins iECA- : 507 ± 71). En effet, la présence d'un iECA diminue de façon significative l'activité de l'ECA chez les patients hypertendus (AO iECA+ : 6 ± 3 nmol/mL/min) et chez les patients témoins (témoins iECA+ : $1,7 \pm 0,1$ nmol/mL/min) lorsque comparée aux groupes de patients hypertendus et de témoins en absence d'inhibition de l'ECA (AO iECA- : 54 ± 4 nmol/mL/min, témoins iECA- : 49 ± 4 nmol/mL/min). Par contre, aucune différence significative n'a pu être mesurée entre les deux groupes de patients pour la demi-vie de dégradation de la BK et de la des-Arg⁹-BK. Ces résultats sont à mettre en relation avec les activités de l'ECA (figure 20). Enfin, la race du patient n'affecte pas le métabolisme de ces deux kinines et l'activité de l'ECA.

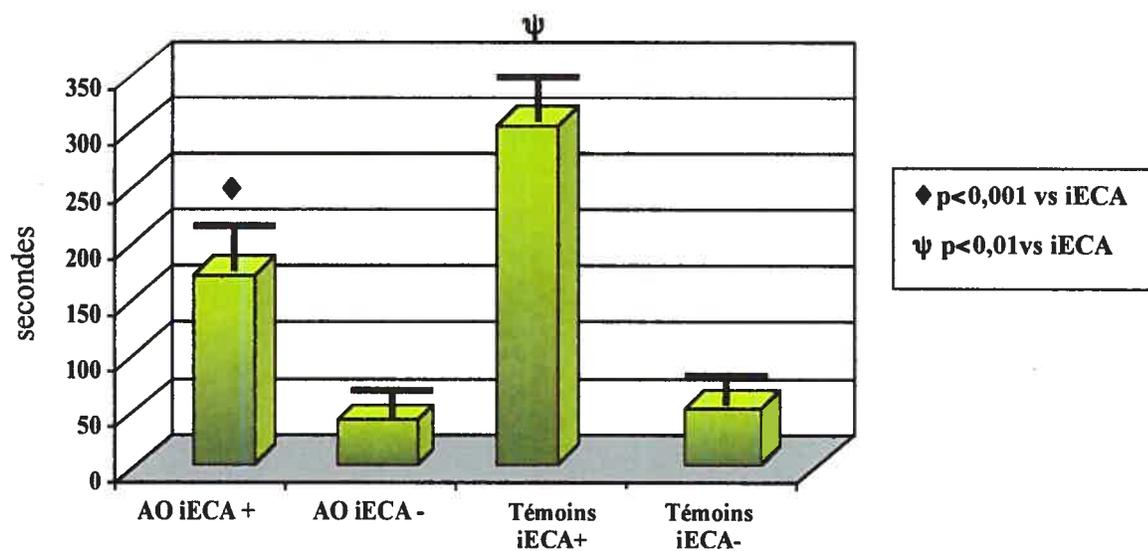


Figure 16. Demi-vie de dégradation de la BK dans le groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et dans le groupe de témoins traités ou non aux iECA

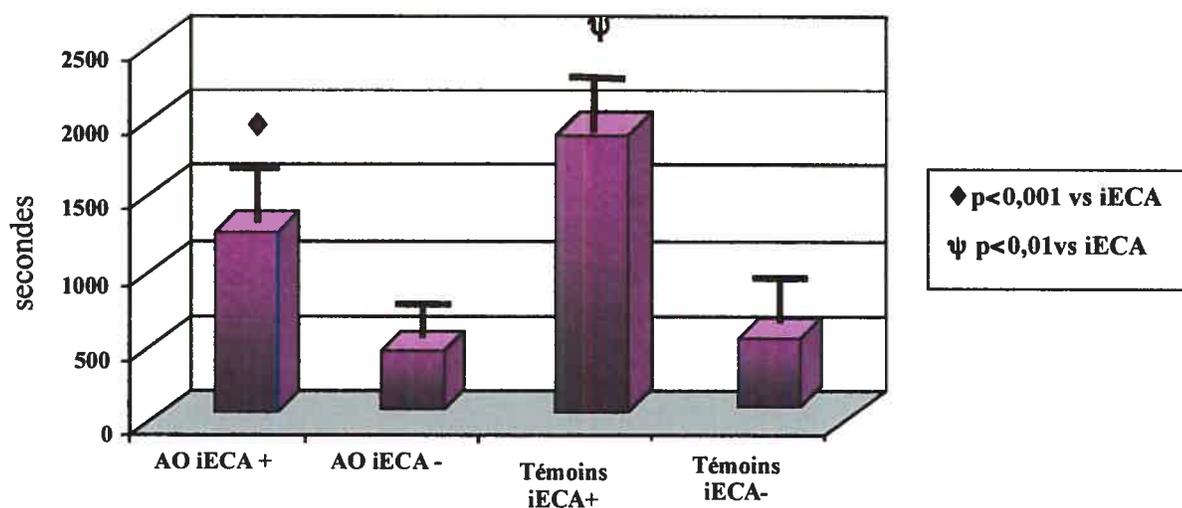


Figure 17. Demi-vie de dégradation de la des-Arg⁹-BK dans le groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et dans le groupe de témoins traités ou non aux iECA

2. Définition de la demi-vie de dégradation de la SP

La figure 18 représente les valeurs de demi-vie de dégradation de la SP dans les groupes de patients atteints d'AOA et dans les groupes témoins. La demi-vie de dégradation de la SP est supérieure dans le groupe de patients AO+ traités par un iECA lorsque comparée à celle des patients non traités par un iECA, mais cette différence ne s'est pas montrée significative après l'analyse statistique des résultats (AO iECA+ : 4005 ± 556 secondes, AO iECA- : 2844 ± 384 secondes). En plus, l'analyse des résultats montre qu'il n'y a aucune différence significative au niveau de la demi-vie de dégradation de la SP entre les patients traités aux iECA et les témoins exposés ou non aux iECA (témoins iECA+ : 3777 ± 221 secondes, témoins iECA- : 4038 ± 934 secondes).

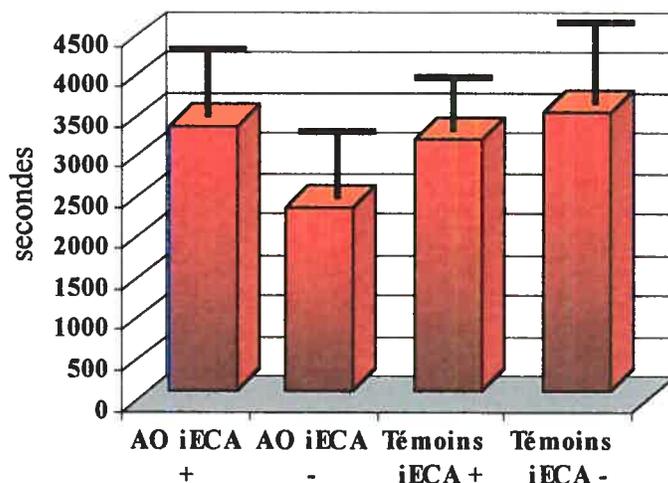


Figure 18. Demi-vie de dégradation de la SP dans le groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et dans le groupe de témoins traités ou non aux iECA

3. Dosage de l'activité enzymatique des métallopeptidases (APP, ECA, APN) responsables du catabolisme de BK et de la des-Arg⁹-BK

Aucune différence significative pour l'activité enzymatique de l'APP n'a pu être mesurée entre les patients hypertendus et les témoins autant en présence qu'en absence d'inhibition de l'ECA (AO iECA+ : 184 ± 50 μmol de substrat hydrolysé/min, AO iECA- : 200 ± 35 μmol de substrat hydrolysé/min, témoins iECA+ : 223 ± 24 μmol de substrat hydrolysé/min, témoins iECA- : 254 ± 45 μmol de substrat hydrolysé/min). Le profil enzymatique de l'APP pour chacun des quatre groupes est illustré à la figure 19. Par contre, l'activité de l'APP est plus faible chez les sujets de race blanche comparativement aux sujets de race noire.

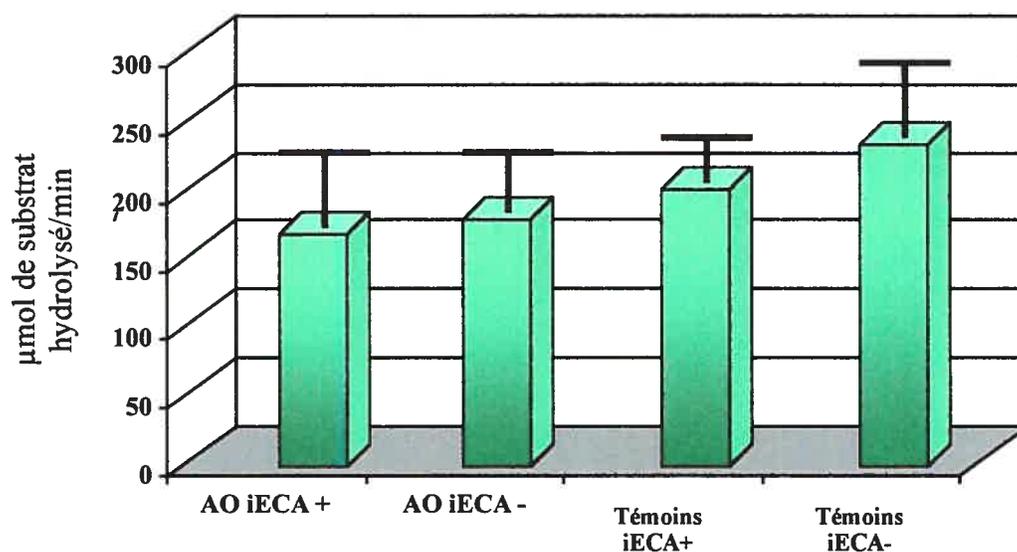


Figure 19. Activité de l'APP dans le groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et dans le groupe de témoins traités ou non aux iECA

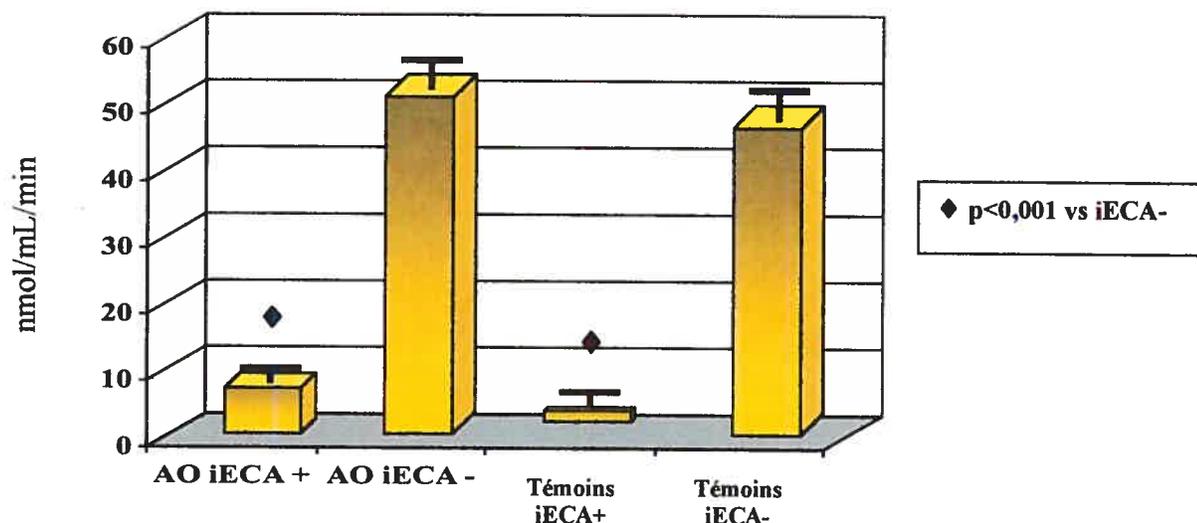


Figure 20. Activité de l'ECA dans le groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et dans le groupe de témoins traités ou non aux iECA (♦ $p < 0,001$ vs iECA-)

La figure 21 illustre les valeurs de l'activité enzymatique de l'APN pour chacun des quatre groupes. L'analyse statistique montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les divers groupes de patients hypertendus (AO iECA+ : 31 ± 2 nmol/mL/min, AO iECA- : 37 ± 2 nmol/mL/min) et de témoins exposés ou non aux iECA (témoins iECA+ : 35 ± 2 nmol/mL/min, témoins iECA- : 37 ± 1 nmol/mL/min).

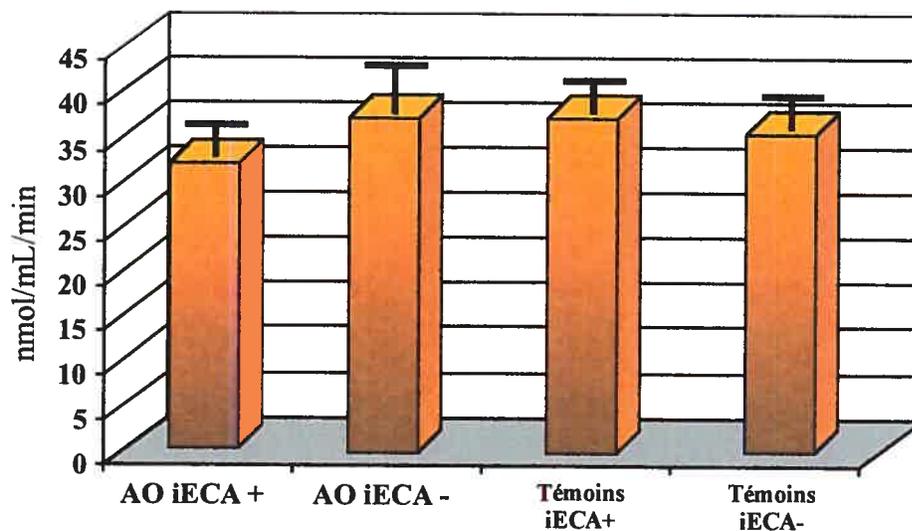


Figure 21. Activité de l'APN dans le groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et dans le groupe de témoins traités ou non aux iECA

4. Dosage de la DPPIV

4.1 Dosage de l'activité enzymatique de la DPPIV responsable du catabolisme de la BK, de la des-Arg⁹-BK et de la SP

Le profil enzymatique de la DPPIV pour chacun des quatre groupes est représenté à la figure 22. L'activité de la DPPIV est diminuée de façon significative chez les patients hypertendus traités aux iECA (AO iECA+ : 21 ± 2 nmol/mL/min) lorsque comparée aux témoins exposés ou non aux iECA (témoins iECA+ : 29 ± 1 nmol/mL/min, témoins iECA- : 25 ± 1 nmol/mL/min) et aux patients hypertendus atteints d'AOA en absence d'inhibition de l'ECA (25 ± 1 nmol/mL/min).

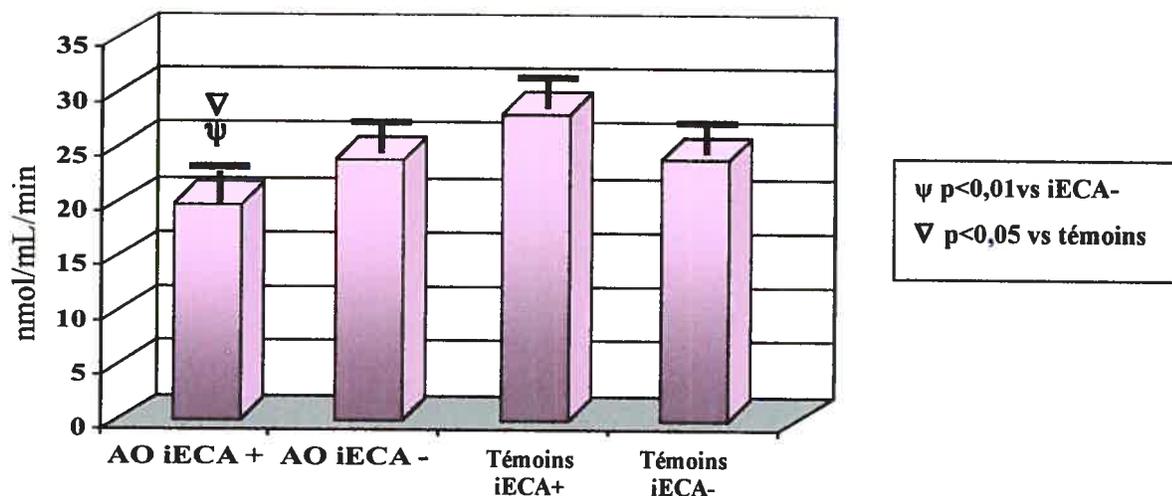


Figure 22. Activité de la DPPIV dans un groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et dans un groupe de témoins traités ou non aux iECA

4.2 Dosage de la DPPIV immunoréactive

La figure 23 représente la concentration de DPPIV immunoréactive mesurée dans les deux groupes de patients hypertendus et les deux groupes témoins. La concentration de DPPIV immunoréactive est significativement diminuée dans le groupe de patients hypertendus (AO iECA+ : 363 ± 38 ng/mL, AO iECA- : 341 ± 24 ng/mL) comparativement au groupe de témoins exposés ou non aux iECA (témoins iECA+ : 505 ± 18 ng/mL, témoins iECA- : 468 ± 25 ng/mL). Cette diminution de la concentration de DPPIV immunoréactive entre les patients et les témoins est aussi observée dans la population d'américains de race noire et de race blanche, une fois analysée séparément.

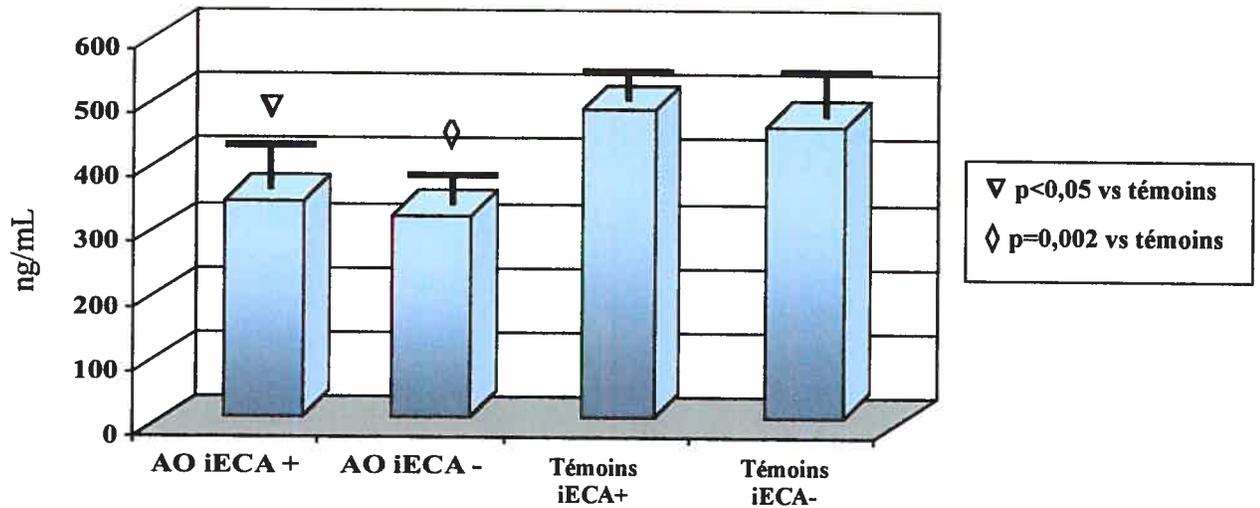


Figure 23. Concentration de DPPIV immunoréactive dans un groupe de patients atteints d'AOA associé à la prise d'iECA et un groupe de témoins traités ou non aux iECA (▽ p<0,05 vs témoins, ◇ p=0,002 vs témoins)

Objectif 3 :

Étudier l'effet de différents traitements pharmacologiques sur l'expression du récepteur B₁ dans un modèle de lapin in vivo et dans un modèle in vitro de fibroblastes en culture.

1. Expression du récepteur B₁ pour les échantillons d'ADN de fibroblastes dermiques de lapin et de muscles lisses d'aorte de lapin amplifiés par PCR

Les dérivées premières négatives des courbes de fusion pour notre gène d'intérêt (récepteur B₁) comparé au gène de référence (GAPDH) sont présentées à la figure 24. On observe un seul pic propre à chaque amplicon correspondant au produit de taille attendue. L'analyse des courbes de fusion du Light Cycler ainsi que l'amplification

des échantillons testés et des échantillons de référence résulte en une température de fusion spécifique à chacun des produits.

La spécificité des produits de PCR pour les échantillons d'ARN de fibroblastes dermiques de lapin et de muscles lisses d'aorte de lapin a été confirmée sur un gel d'agarose illustré respectivement aux figures 25 et 26.

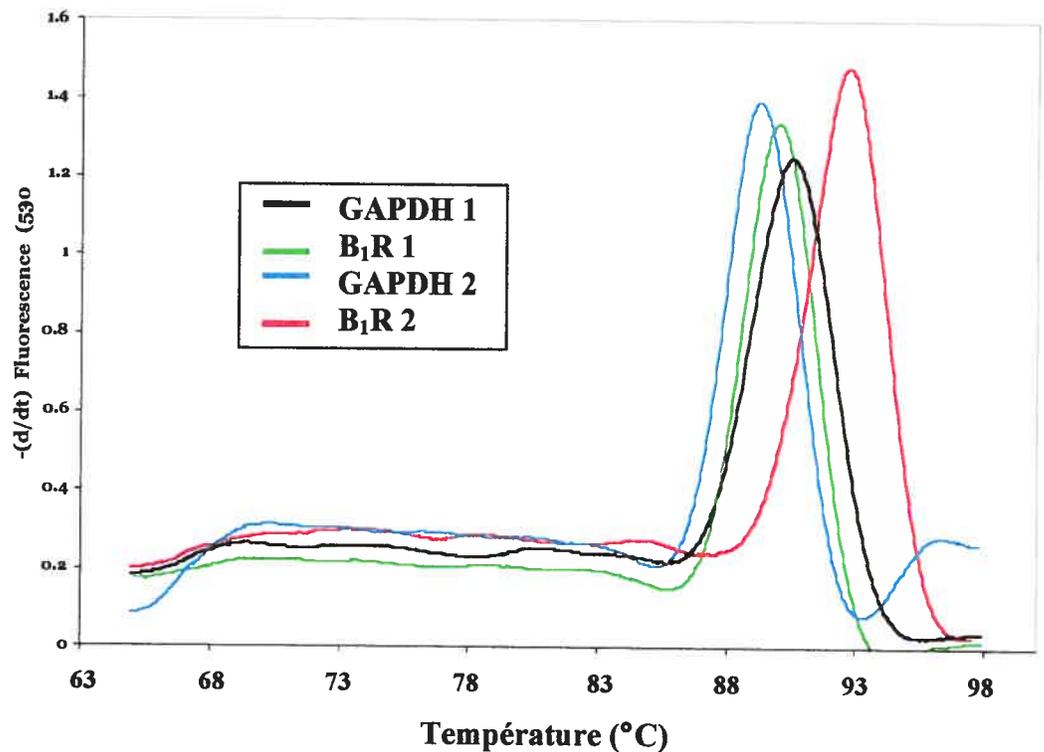


Figure 24. La courbe de dissociation de chacun des produits de PCR pour les fibroblastes (1) et les cellules de muscles lisses d'aorte de lapin (2) (analyse des températures de fusion) est présentée ici et résulte en une température de fusion spécifique à chacun des produits

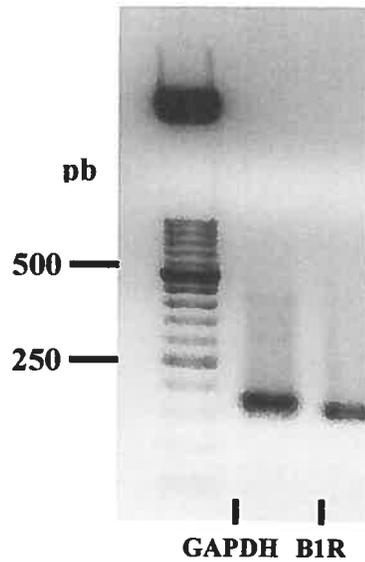


Figure 25. La spécificité de l'amplification par le PCR en temps réel provenant des fibroblastes dermique de lapin. La spécificité des produits du PCR pour chacune des amorces est visualisée dans un gel d'agarose 2% et résulte en la production de bandes uniques représentant le poids moléculaire tel qu'attendu pour chacun des amplicons amplifiés.

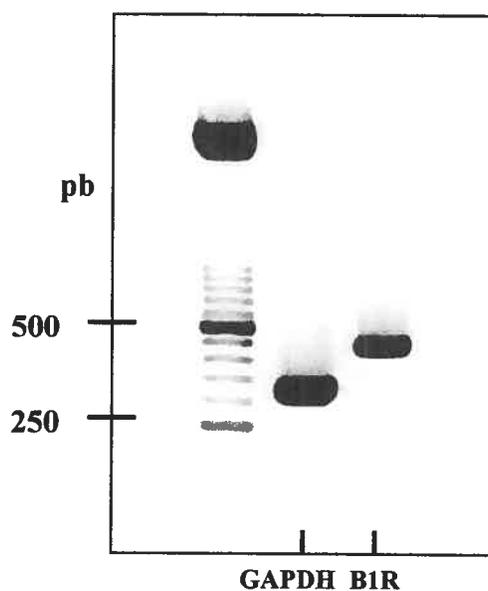


Figure 26. La spécificité de l'amplification par le PCR en temps réel provenant des cellules de muscles lisses d'aorte de lapin. La spécificité des produits du PCR pour chacune des amorces est visualisée dans un gel d'agarose 2% et résulte en la production de bandes uniques représentant le poids moléculaire tel qu'attendu pour chacun des amplicons amplifiés.

1.1 Effets des différents traitements pharmacologiques sur l'expression de surface du B₁R

Les résultats des études de liaison portant sur l'effet stimulant des cytokines dans deux modèles cellulaires sont présentés dans la figure 27. Dans le muscle lisse dérivé de l'aorte de lapin, l'IL-1 β augmente en 4 h la densité de surface des récepteurs B₁, tel que rapporté antérieurement (Sabourin et al., 2002), mais le TNF- α est inactif. Cela justifie l'introduction d'un 2^e type cellulaire, les fibroblastes dermiques, qui répondent aux deux cytokines (figure 27) et qui permettront d'étudier les médicaments inhibiteurs de chacune. Les combinaisons de l'IL- β 1 ou du TNF- α avec

des drogues inhibitrices introduites dans les cultures de fibroblastes 30 min avant les cytokines sont présentées à la figure 28A. Ces expériences ont montré que l'étanercept (20 µg/mL), dépourvu d'effet direct, agit en diminuant l'effet du TNF-α seulement, et que l'IRA (50 µg/mL) réduit de façon spécifique celui de l'IL-1β. Le sel sodique du phosphate de dexaméthasone (100 nM) n'exerce qu'un effet inhibiteur modeste sur l'action inductrice de ces deux cytokines.

Dans une étude additionnelle, nous avons comparé le potentiel inhibiteur du sel sodique du phosphate de dexaméthasone avec celui du dexaméthasone (figure 28B). La concentration inhibitrice optimale de l'ester de dexaméthasone sur l'effet inducteur de l'IL-β1 sur l'expression du B₁R est de 1 µM. Le dexaméthasone a un potentiel inhibiteur au moins 100 fois supérieur à son ester phosphate. Cette observation laisse supposer que le sel sodique du phosphate de dexaméthasone serait une pro-drogue.

1.2 Effet des cytokines et/ou leurs antagonistes sur le rapport ARNm B₁R / ARNm GAPDH déterminé par RT-PCR en temps réel sur des fibroblastes dermiques de lapin et des cellules de muscles lisses d'aorte de lapin

La relation précédemment observée en utilisant les essais de liaison du radioligand a été essentiellement confirmée en mesurant les concentrations d'ARNm après 2 h de stimulation; comme dans la figure 29 où les cellules de muscle lisse répondent uniquement au traitement à l'IL-1β et les fibroblastes dermiques répondent au TNF-α ou l'IL-1β (variations du rapport B₁R / GAPDH, figures 29A et 29B). Il est intéressant de noter qu'une forte concentration de lipopolysaccharide extrait de *E. coli* n'influence pas l'expression de l'ARNm de B₁R dans l'un ou l'autre type cellulaire, suggérant que l'effet inducteur bien connu du LPS *in vivo* est indirect et médié par des cytokines secondairement relâchées. L'inhibition sélective du TNF-α par l'étanercept en co-traitement et celle de l'IL-1β par l'IRA ont aussi été confirmées,

ainsi que le modeste effet inhibiteur non sélectif du sel sodique du phosphate de dexaméthasone (figure 29A).

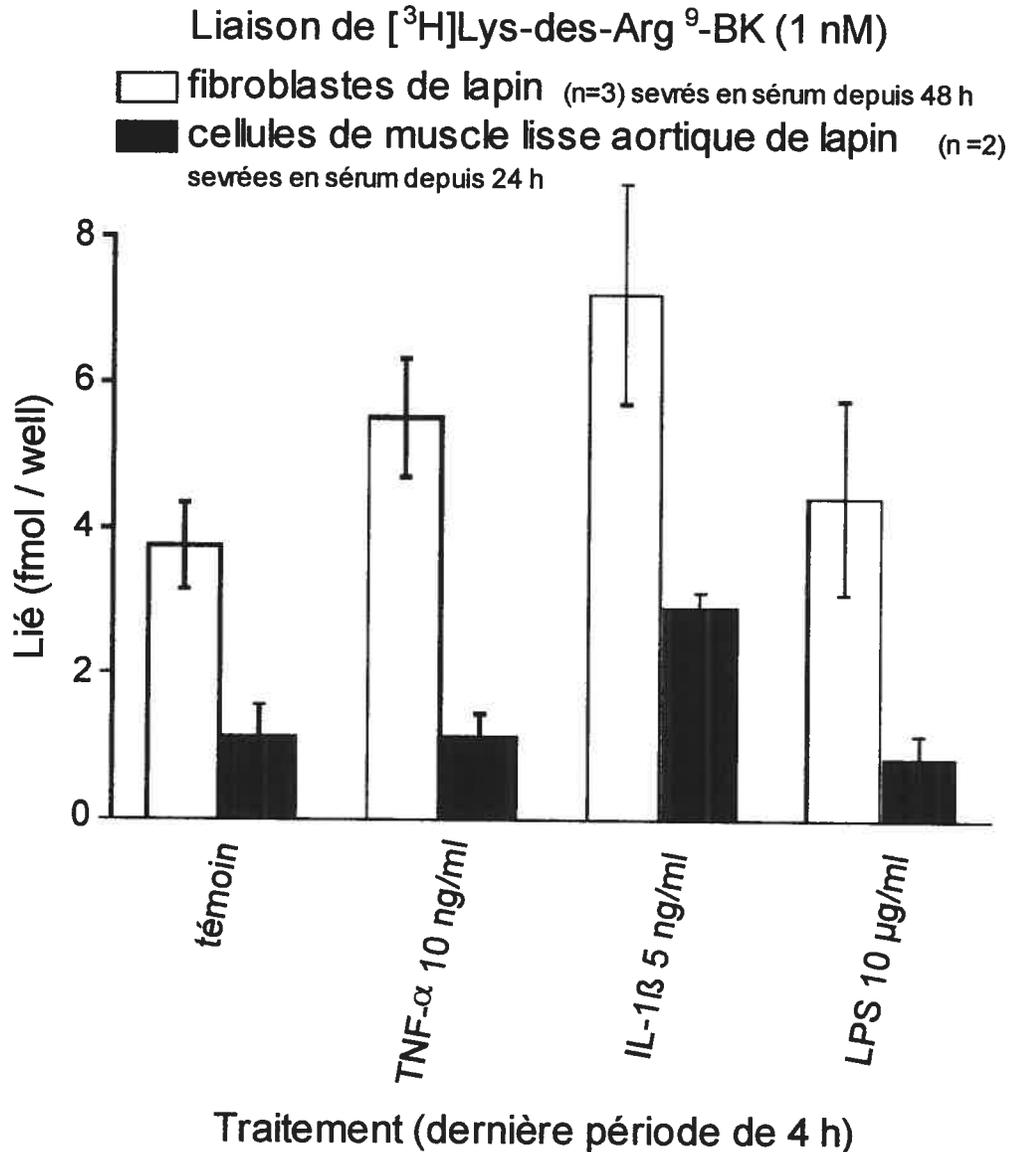


Figure 27. Effet de stimulations de 4 h avec des cytokines ou du LPS (10 µg/ml) sur l'expression de surface du B₁R dans deux types cellulaires du lapin. Une concentration saturante (1 nM) du radioligand agoniste [³H]Lys-des-Arg⁹-BK était utilisée (les valeurs présentées sont les moyennes ± erreur type du nombre de déterminations indiquées par n).

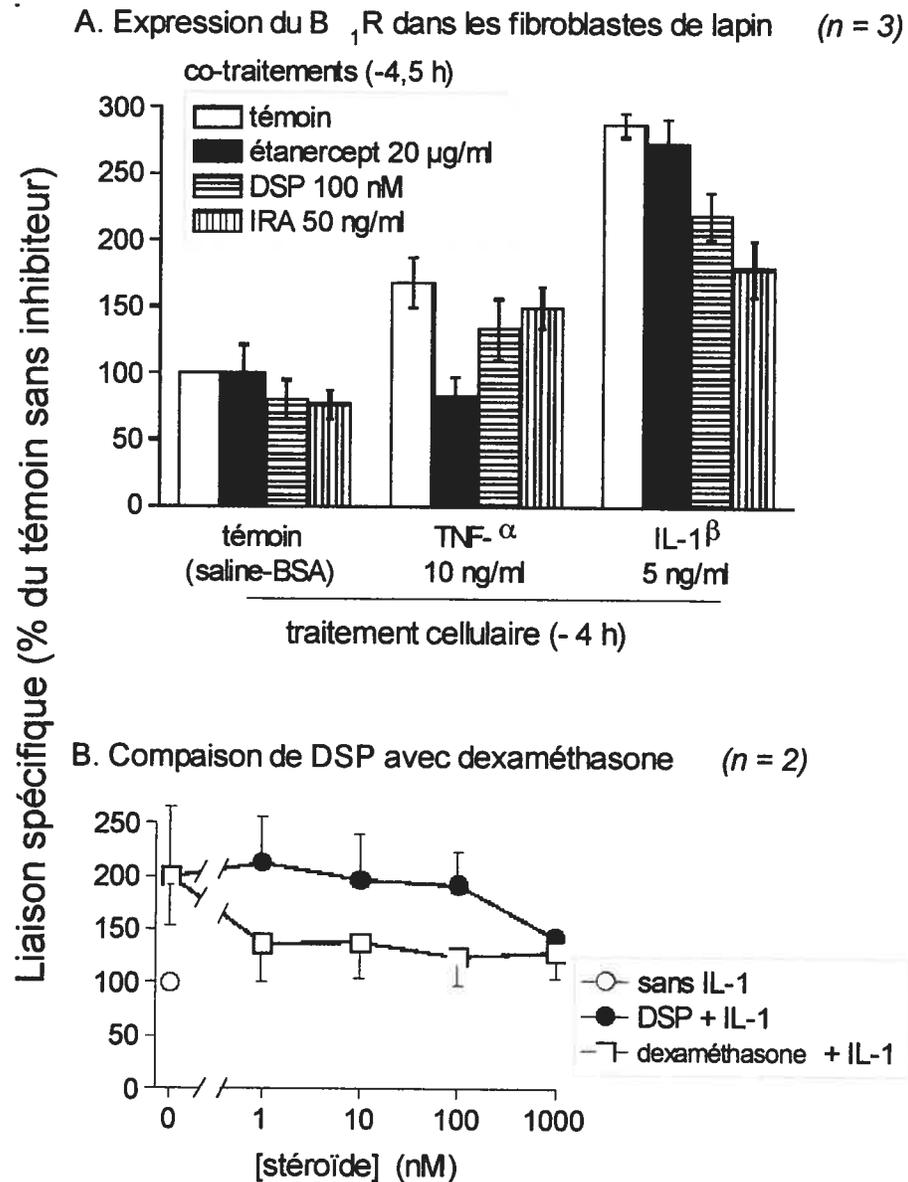


Figure 28. A. Effet d'une drogue inhibitrice (co-traitement d'une durée de 4.5 h) sur l'expression du récepteur B₁ des kinines dans des fibroblastes de lapin en culture stimulés par des cytokines (4 h). La liaison spécifique d'une concentration saturante (1 nM) d'agoniste radioligand [³H]Lys-des-Arg⁹-BK est présentée en pourcentage de la valeur témoin sans drogue inhibitrice établie dans chaque expérience (valeur moyenne ± erreur type provenant de 3 expériences effectuées en duplicata). La valeur absolue de la moyenne des témoins est de 1.53 ± 0.19 fmol/puits. **B. Comparaison des effets du sel sodique du phosphate de dexaméthasone avec le dexaméthasone authentique sur l'action inductrice de l'IL-1β dans les fibroblastes de lapin (n = 2).**

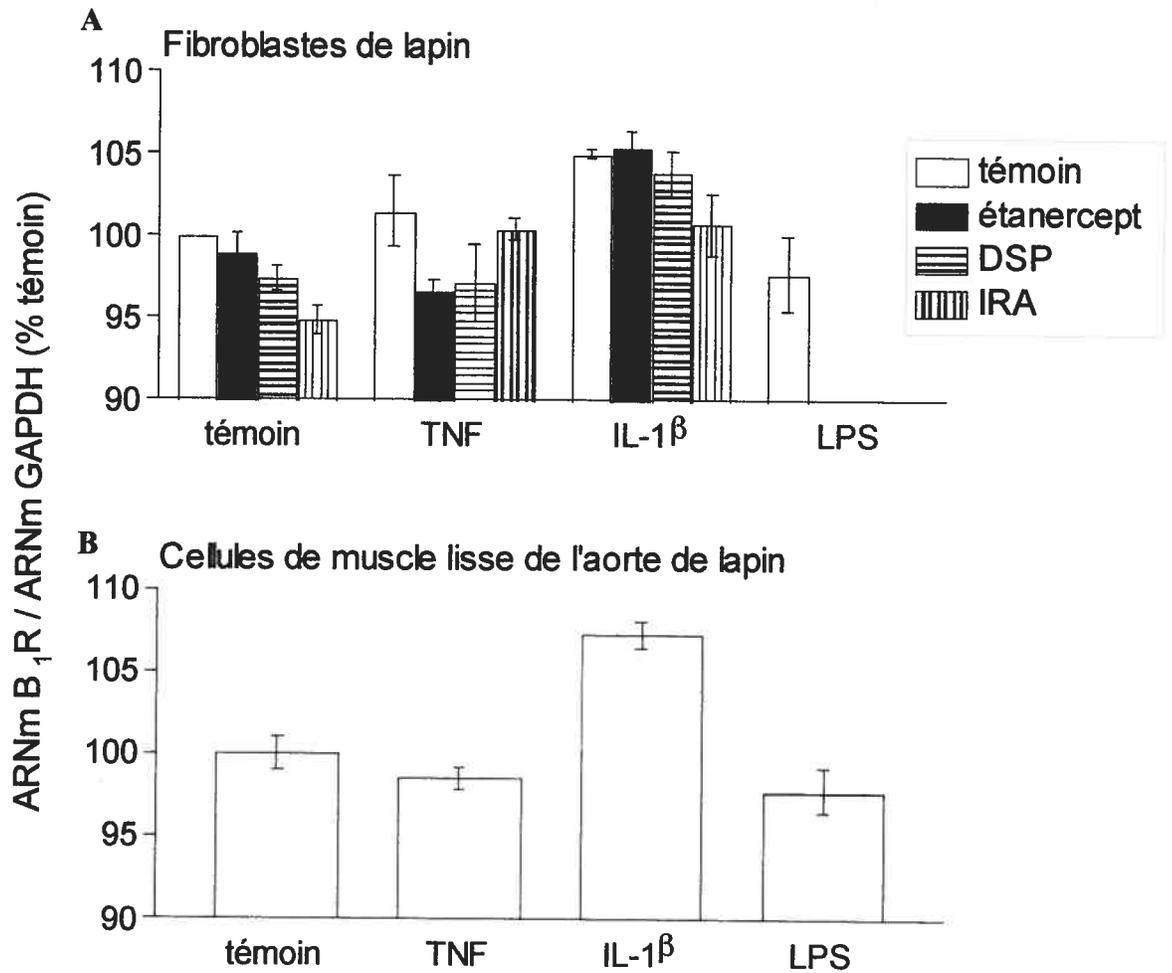


Figure 29. Effet des cytokines et/ou leurs antagonistes sur le rapport ARNm B₁R / ARNm GAPDH déterminé par RT-PCR en temps réel sur des fibroblastes dermiques de lapin (A) et des cellules de muscles lisses d'aorte de lapin (B). Les concentrations de drogue sont semblables à celles de la figure 28, mais les cytokines ou le LPS (10 μ g/mL) sont donnés 2 h avant la collecte des cellules, et l'antagoniste (étanercept, dexaméthasone sodium phosphate, IRA) 2.5 h avant la collecte. Les résultats présentés sont la moyenne de 3 déterminations établies à l'aide de différentes lignées cellulaires.

VII Discussion

La physiopathologie de l'angiooedème décrite pour la première fois il y a plus d'un siècle, reste à ce jour mal comprise. Le manque de connaissances résulte de plusieurs raisons. D'une part, l'AO est une maladie rare. D'autre part, l'AO est une réaction inflammatoire locale, difficilement accessible aux investigations biochimiques et pharmacologiques de ses médiateurs potentiels. Celles-ci sont donc effectuées sur des milieux biologiques plus accessibles comme le sérum et le plasma, mais demeure un reflet indirect de la réaction angiooedémateuse. Enfin, une même symptomatologie clinique correspond à différentes étiologies. En effet, à côté d'une forme d'origine génétique due à un déficit quantitatif ou qualitatif en C estérase inhibiteur, d'autres formes, considérées jusqu'à présent comme acquises, sont associées à la prise de certains médicaments ou sont d'origine inconnue.

Notre travail de maîtrise s'inscrit dans un ensemble d'investigations menées depuis bientôt dix ans dans le laboratoire de recherche du Professeur Albert Adam. Celles-ci visent à mieux comprendre la physiopathologie de différentes formes d'AO et ce, afin d'en faciliter le diagnostic et le traitement.

Les premiers travaux ont permis de définir le métabolisme des kinines, médiateurs potentiels de l'AO au niveau du plasma humain normal (Cyr et al., 2001). M. Cyr a montré que la BK est métabolisée par trois métallopeptidases étant respectivement et par ordre d'importance, l'ECA, l'APP et la CPN. La des-Arg⁹-BK, par contre, n'est inactivée que par deux peptidases : l'APP et l'ECA. Elle a aussi défini les paramètres cinétiques qui caractérisent le métabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK libérés lors de l'activation du système de contact, voie kininomatrice considérée comme principale au niveau du plasma humain.

En utilisant ces travaux comme bases, G. Molinaro a montré que des patients hypertendus d'origine européenne ayant souffert d'AO associés à la prise d'iECA, présentent au niveau de leur plasma une anomalie de dégradation de la des-Arg⁹-BK

associée à une activité diminuée de l'APP (Molinaro et al., 2002). Cette même anomalie métabolique a également été décelée dans le plasma de patients ayant présenté un effet secondaire aigu aux iECA lors d'une séance d'hémodialyse (Blais et al., 1999) ou d'une transfusion sanguine (Arnold et al., 2004).

Cette activité diminuée de l'APP n'était pas due à un inhibiteur circulant mais à un polymorphisme au niveau du promoteur du gène (XPNPEP2) codant pour l'APP membranaire (Duan et al., 2005). Le clonage de cette APPm (Molinaro et al., 2005) et sa caractérisation enzymatique ont permis la mise en évidence de son inhibition non spécifique par certains iECA.

De cet ensemble d'observations, il ressort que l'AO associé aux iECA est de nature multifactorielle et résulte lui aussi d'une prédisposition génétique.

Face à ces observations montrant une anomalie du métabolisme de la des-Arg⁹-BK dans les AO associés aux iECA, le métabolisme des kinines a été documenté dans d'autres formes d'AO. En effet, J. Robillard (Mémoire de maîtrise de Josée Robillard, Rôle des kinines en pathologie humaine : Approche expérimentale, 2005) a montré que certains patients atteints d'AOH de type I présentent aussi une activité d'APP diminuée au niveau plasmatique. Chez ces mêmes patients, un traitement au danazol augmentait l'activité de l'APP et normalisait le métabolisme de la des-Arg⁹-BK. Ainsi, certains de ces patients présentent, outre une anomalie du contrôle du pouvoir du plasma, un métabolisme diminué de la des-Arg⁹-BK. Ce double déficit conduit à des symptômes cliniques plus graves. Plus récemment, M. Trépanier (Mémoire de maîtrise de Marlène Trépanier, 2006) a étudié le métabolisme des kinines dans une cohorte de patients ayant présenté un AO associé à la prise de contraceptifs oraux. Elle a montré que ceux-ci diminuent de façon significative l'activité de l'APP plasmatique, celle-ci se normalisant avec la suppression de la thérapie contraceptive.

Dans le présent mémoire, nous appliquons à deux groupes d'AOA la méthodologie utilisée précédemment. Nous élargissons aussi notre champ d'investigations aux neurokinines et plus particulièrement à la SP. Nous poursuivons

aussi chez l'animal de laboratoire des études visant à mieux comprendre la régulation du récepteur B₁.

Jusqu'à présent, aucune anomalie biochimique n'a permis de caractériser les AOA de nature idiopathique. Le C1INH immunoréactif et fonctionnel étant normal chez ces patients, nous nous sommes donc attaché non pas à la formation des kinines lors de l'activation du système de contact, mais à leur catabolisme par les trois peptidases discutées précédemment. Nous appliquons donc aux plasmas de ces patients une approche analytique développée et validée dans notre laboratoire (Cyr et al., 2001).

Cette façon de faire nous permet de mettre en évidence une anomalie de la dégradation de la BK. En effet, la BK exogène ajoutée au plasma de ces patients à une concentration finale de 48μM, a une demi-vie de dégradation allongée lorsque comparée à la population de référence de cette précédente. Cette anomalie est à mettre en relation avec une activité significativement diminuée de l'ECA et de l'APP, les deux voies métaboliques principales de l'agoniste B₂R. En plus, la présence d'une activité moindre de ces deux enzymes présente uniquement chez les patients atteints d'AOA suggère l'implication de certains facteurs génétiques et environnementaux, qui prédisposeraient ces individus à développer cette réaction inflammatoire aiguë locale. La présence de mutations au niveau génique chez certains de ces patients pourrait aussi conduire à une activité plus faible de l'ECA et de l'APP et, par le fait même, les prédisposer à développer un épisode d'AOA.

Curieusement, cette double anomalie n'affecte pas la dégradation de la des-Arg⁹-BK et nous n'observons aucune différence significative au niveau de l'activité de la CPN entre les deux groupes.

Cette observation nouvelle devrait être confirmée par un nombre plus important d'échantillons en mesurant le métabolisme des kinines endogènes générées lors de l'activation du système de contact du plasma. Elle devrait aussi donner lieu à des études au niveau génique comme nous l'avons fait par le passé pour les AOA associés

aux iECA. Le polymorphisme de l'APP et de l'ECA devrait être documenté puisque nous avons en effet démontré une influence de ces derniers sur l'activité de ces enzymes et leur capacité à dégrader les kinines. L'affinité de l'ECA et de l'APP pour la BK et la des-Arg⁹-BK devrait aussi être soigneusement caractérisée.

Quoiqu'il en soit, notre observation présente un intérêt thérapeutique potentiel. En effet, ces patients atteints d'AO idiopathique et présentant cette anomalie du métabolisme de la BK, constituent des candidats potentiels pour un traitement au moyen de HOE140 (Icatibant), antagoniste des récepteurs B₂ actuellement en développement clinique. Même si le plasma a été jusqu'à présent le milieu privilégié pour l'étude des médiateurs potentiels de la réaction angiooedémateuse et en particulier des kinines, nous ne pouvons exclure que dans le décours d'un épisode aigu d'AO, ces médiateurs soient éliminés par voie rénale. Précédemment, M. Trépanier avait dosé la BK et la des-Arg⁹-BK urinaire chez de tels patients et n'avait pas mesuré des concentrations significativement plus élevées lorsque comparée à des sujets de référence. De la même manière, nous n'avons pas mesuré une excrétion accrue de SP immunoréactive chez ces mêmes patients. Ainsi, nous pouvons conclure que la fin d'une réaction oedémateuse pourrait aussi être due à une modulation de l'expression des récepteurs aux kinines.

Parmi les agents pharmacologiques potentiellement responsables de l'AO, les kinines ont été les plus étudiées. Cependant, nous ne pouvons pas exclure une participation des neurokinines et en particulier de la SP. En effet, différents arguments cliniques et fondamentaux décrits dans notre introduction plaident pour une telle participation.

C'est la raison pour laquelle nous avons observé cette problématique en documentant, non seulement le métabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK, mais aussi celui de la SP exogène dans le sérum d'un groupe de patients nord américains hypertendus ayant présenté un AOA associé à la prise d'iECA. La sélection des patients et l'approche expérimentale sont différentes de celles utilisées précédemment. Pour ces raisons, nous n'avons pas mis en évidence les anomalies métaboliques touchant la des-Arg⁹-

BK et l'APP chez les patients angiooedémateux d'origine européenne. Il en est de même pour la SP, aucune différence significative de $t_{1/2}$ n'a pu être mesurée entre les quatre groupes de patients. Chez ces mêmes patients, nous avons également mesuré l'activité enzymatique et dosé l'immunoréactivité de la DPPIV, peptidase connue au métabolisme des kinines et de la SP. Dans ce cas, l'activité enzymatique était significativement diminuée chez les patients atteints d'AO traités par un iECA alors que la protéine immunoréactive était en concentration plus faible dans le plasma de patients traités ou non au moyen d'un iECA. La présence d'une concentration de DPPIV immunoréactive diminuée chez tous les patients lorsque comparée aux témoins et d'une diminution de l'activité de la DPPIV uniquement retrouvée chez les patients durant une crise d'AOA associé à la prise d'iECA suggère que des facteurs environnementaux ou alors que l'inhibition elle-même de l'iECA pourrait moduler l'activité spécifique de la DPPIV immunoréactive. En effet, certaines conditions physiopathologiques telles que l'infection au VIH, l'arthrite rhumatoïde et la transplantation pourraient altérer l'activité spécifique de la DPPIV (Lambeir et al., 2003). Hypothétiquement, la présence de conditions physiopathologiques ainsi que de facteurs environnementaux chez des individus présentant une expression constitutive faible de DPPIV immunoréactive pourrait précipiter les crises d'AOA. Certains facteurs génétiques ou environnementaux diminuant l'activité de la DPPIV pourraient donc prédisposer les individus à développer un AOA associé à la prise d'iECA. Ces résultats relatifs à la SP et à la DPPIV demeurent tout de même exploratoires et donc difficilement interprétables.

Dans cette partie de notre travail, nous avons aussi observé que la demi-vie de dégradation de la BK varie de façon inversement proportionnelle à l'activité de l'ECA et ce, chez chacun des sujets. Par contre, la demi-vie de dégradation de la SP corrèle inversement avec l'activité de la DPPIV et de l'APN durant l'inhibition de l'ECA. En fait, cette relation peut être expliquée par le fait que la DPPIV contribue de façon majoritaire à la dégradation de la SP lorsque l'ECA est inhibée. Ceci expliquerait donc pourquoi la demi-vie de dégradation de la SP est augmentée en présence d'inhibition de l'ECA et d'une activité enzymatique de la DPPIV diminuée.

En se basant sur des études effectuées précédemment chez le rat au cours desquelles la SP contribuait au développement de l'AOA associé à la prise d'iECA (Emanuelli et al., 1998; Sulpizio et al., 2004), nous avons établi une hypothèse de recherche. Celle-ci proposait que l'allongement de la demi-vie de dégradation de la SP chez des individus traités aux iECA et présentant une concentration de DPPIV immunoréactive ou une activité de DPPIV faible, contribuait au développement d'AOA. Cependant, contrairement à notre hypothèse, la demi-vie de dégradation de la SP *ex vivo* observée n'était pas prolongée chez les individus atteints d'AOA associé à la prise d'iECA. Cette différence au niveau des résultats peut être expliquée par le fait que la concentration de DPPIV immunoréactive ainsi que l'activité de la DPPIV ont été mesurées au niveau plasmatique, alors que la DPPIV est une peptidase de la surface cellulaire (Lambeir et al., 2003). La régulation de l'expression de la DPPIV serait donc spécifique au tissu et la concentration de DPPIV immunoréactive pourrait refléter non seulement l'expression, mais aussi le clivage de la DPPIV à partir de la surface cellulaire. De cette façon, la dégradation *ex vivo* de la SP ne reflèterait pas exactement le métabolisme *in vivo* local. Afin de continuer nos recherches dans ce sens tout en prenant compte des limites de cette étude, il serait intéressant de valider une technique nous permettant d'étudier l'activité de la DPPIV ainsi que la concentration de DPPIV immunoréactive au niveau cellulaire. Il serait aussi intéressant d'étudier soigneusement l'affinité spécifique de la DPPIV pour la SP.

Précédemment, ME Moreau (Moreau et al., 2005) a montré chez le porc qu'un traitement chronique mais, non aigu, au moyen d'un iECA induit la synthèse du récepteur B₁ immunoréactif au niveau d'un tissu oropharyngé, siège de l'angiooedème, et au niveau rénal, cible particulièrement importante.

Afin de continuer d'approfondir nos recherches sur le récepteur B₁, la dernière partie de notre mémoire de maîtrise consiste en l'étude de l'effet de différents traitements pharmacologiques sur l'expression de ce récepteur dans un modèle de lapin *in vivo* et *in vitro* dans un modèle de fibroblastes en culture. En fait, cette partie de notre projet étudie plus particulièrement l'effet de différents agents

pharmacologiques (saline physiologique, TNF- α , IL-1 β et LPS) ou différents traitements en combinaison (étanercept, sel sodique du phosphate de dexaméthasone et IRA), sur l'induction du récepteur B₁ des kinines.

Des tests préliminaires ont démontré que l'étanercept réduit de façon sélective l'effet inducteur du TNF- α sur l'expression du récepteur B₁ dans les fibroblastes de lapin. Les effets de ce traitement pharmacologique se produisent sans toutefois interférer avec l'effet inducteur de l'IL-1 β sur l'expression du B₁R, contrairement au traitement à l'IRA, qui a un potentiel inhibiteur important sur l'effet inducteur de l'IL- β , mais n'inhibe pas celui du TNF- α . En plus, l'utilisation d'un nouveau modèle cellulaire soit; les fibroblastes dermiques de lapin, s'est montré plus efficace afin d'étudier l'effet pharmacologique du TNF- α que les cellules de muscle lisse d'aorte de lapin, ce dernier s'étant précédemment montré réfractaire aux différentes cytokines.

Les résultats obtenus précédemment suggèrent aussi qu'il y a un manque de récepteurs au TNF- α dans les cellules fraîchement isolées ou les cellules de muscle lisse d'aorte de lapin obtenues en culture. En effet, cette hypothèse se base sur l'absence de résultats rapportant une augmentation de la réponse contractile aux agonistes du B₁R induite par l'IL-1 β , suite au traitement par le TNF- α (Deblois et al., 1988).

En plus, nous constatons que, même à une concentration élevée de 10 μ g/mL, le LPS n'a aucun effet sur la concentration d'ARNm dans les deux modèles cellulaires. Ceci suggère donc un manque de Toll-like receptor 4 (TLR4), une des molécules essentielles nécessaires afin de permettre au complexe immunitaire inné d'émettre des signaux sur les fibroblastes et les cellules de muscle lisse, étant toutes les deux des lignées cellulaires non-hématopoïétiques. Par le fait même, l'induction de l'expression du B₁R dans les cellules isolées de muscle lisse d'aorte de lapin par le traitement au LPS serait donc déterminée par le relâchement de cytokines provenant

d'autres types cellulaires comme les leucocytes circulants et réticuloendothéliaux (Bouthillier et al., 1987; Regoli et al., 1981; Sabourin et al., 2001).

En plus, il est intéressant d'observer que le sel sodique du phosphate de dexaméthasone (100 nM) a un effet inhibiteur non sélectif plus faible que celui de la dexaméthasone sur l'induction de l'expression du B₁R par le TNF- α et l'IRA. Le sel sodique du phosphate de dexaméthasone serait donc une pro-drogue hydrosoluble du dexaméthasone qui est principalement formé par l'hydrolyse d'un lien ester intracellulaire. Dans des cellules isolées d'aorte de lapin, le potentiel inhibiteur du dexaméthasone sur l'effet inducteur de l'IL-1 β sur l'expression du B₁R dans les fibroblastes de lapin s'est avéré beaucoup plus fort que celui de son sel. L'usage du sel de dexaméthasone se situerait donc préférentiellement dans les systèmes cellulaires afin de valider différentes drogues puisqu'il a une forme hydrosoluble et injectable, lui permettant d'être ainsi utilisé de façon subséquente dans les modèles *in vivo*.

Dans notre mémoire de maîtrise, nous montrons que l'ARNm du récepteur B₁ est traduite en un récepteur de surface détecté par le radioligand spécifique. L'induction de ce récepteur par différentes cytokines proinflammatoires est cependant spécifique au tissu analysé.

Cependant, dans ce protocole, l'approche expérimentale utilisée n'a pas permis une relation entre l'immunoréactivité de ce récepteur et sa fonction pharmacologique.

En conclusion, notre travail de maîtrise contribue de façon significative à une meilleure compréhension de la physiopathologie de la réaction angiooedémateuse, d'une part, en investiguant d'autres groupes de patients angiooedémateux et, d'autres part, en étudiant la nature des investigations. Le point principal de notre travail est cependant la mise en évidence d'une anomalie métabolique importante affectant le métabolisme de la BK chez un groupe de patients affectés d'une forme d'AOA considérée comme idiopathique.

VIII Conclusion

Notre travail de maîtrise nous a permis d'améliorer notre compréhension de la physiopathologie de l'angiooedème chez deux groupes de patients atteints soit d'AOA de nature idiopathique ou associé à la prise d'iECA. En effet, nous avons étudié le métabolisme des kinines exogènes dans le plasma de patients atteints d'AOA de nature idiopathique et nous avons documenté en parallèle et, pour la première fois, le métabolisme des kinines et celui de la substance P dans le plasma de patients américains hypertendus ayant présenté un épisode d'AOA associé au traitement par iECA. En plus, en utilisant une approche plus moléculaire, nous avons poursuivi l'étude de la régulation du récepteur B₁ *in vitro* dans un modèle de fibroblastes en culture.

Les différentes investigations biochimiques et pharmacologiques effectuées sur le plasma de patients atteints d'AOA de nature idiopathique nous ont permis de mettre en évidence la présence d'une anomalie de dégradation de la BK reliée à une diminution de l'activité de l'APP et de l'ECA. Celle-ci affecte ainsi le métabolisme de cette kinine chez le groupe de patients atteints d'une forme d'AO considérée comme idiopathique.

Notre travail nous a aussi permis de constater que la présence de conditions physiopathologiques ainsi que de facteurs environnementaux chez des individus présentant une expression constitutive faible de DPPIV immunoréactive pourrait précipiter les crises d'AOA et que, certains facteurs génétiques ou environnementaux diminuant l'activité de la DPPIV, pourraient prédisposer les individus à développer un AOA associé à la prise d'iECA.

Finalement, la poursuite des travaux entamés précédemment par ME Moreau au sein de notre laboratoire de recherche nous permet de montrer que l'ARNm du récepteur B₁ est traduite en un récepteur de surface pharmacologiquement fonctionnel et que l'induction de ce récepteur, par différentes cytokines proinflammatoires,

demeure spécifique au tissu analysé et varie selon le type de traitement pharmacologique utilisé.

Références

Adam, A., Albert, A., Calay, G., Closset, J., Damas, J., and Franchimont, P.: Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values. *Clin Chem* **31** (3): 423-6, 1985.

Adam, A., Cugno, M., Molinaro, G., Perez, M., Lepage, Y., and Agostoni, A.: Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors. *Lancet* **359** (9323): 2088-9, 2002.

Advenier, C., Lagente, V., and Boichot, E.: The role of tachykinin receptor antagonists in the prevention of bronchial hyperresponsiveness, airway inflammation and cough. *Eur Respir J* **10** (8): 1892-906, 1997.

Agostoni, A., Aygoren-Pursun, E., Binkley, K. E., Blanch, A., Bork, K., Bouillet, L., Bucher, C., Castaldo, A. J., Cicardi, M., Davis, A. E., De Carolis, C., Drouet, C., Duponchel, C., Farkas, H., Fay, K., Fekete, B., Fischer, B., Fontana, L., Fust, G., Giacomelli, R., Groner, A., Hack, C. E., Harmat, G., Jakenfelds, J., Juers, M., Kalmar, L., Kaposi, P. N., Karadi, I., Kitzinger, A., Kollar, T., Kreuz, W., Lakatos, P., Longhurst, H. J., Lopez-Trascasa, M., Martinez-Saguer, I., Monnier, N., Nagy, I., Nemeth, E., Nielsen, E. W., Nuijens, J. H., O'Grady, C., Pappalardo, E., Penna, V., Perricone, C., Perricone, R., Rauch, U., Roche, O., Rusicke, E., Spath, P. J., Szendei, G., Takacs, E., Tordai, A., Truedsson, L., Varga, L., Visy, B., Williams, K., Zanichelli, A., and Zingale, L.: Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol* **114** (3 Suppl): S51-131, 2004.

Agostoni, A., and Cicardi, M.: Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore)* **71** (4): 206-15, 1992.

Ahmad, S., Wang, L., and Ward, P. E.: Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **260** (3): 1257-61, 1992.

Ahmad, S., Wang, L., and Ward, P. E.: Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **260** (3): 1257-61., 1992.

Ahmad, S., and Ward, P. E.: Role of aminopeptidase activity in the regulation of the pressor activity of circulating angiotensins. *J Pharmacol Exp Ther* **252** (2): 643-50, 1990.

Altamura, M., Meini, S., Quartara, L., and Maggi, C. A.: Nonpeptide antagonists for kinin receptors. *Regul Pept* **80** (1-2): 13-26, 1999.

Andujar-Sanchez, M., Camara-Artigas, A., and Jara-Perez, V.: A calorimetric study of the binding of lisinopril, enalaprilat and captopril to angiotensin-converting enzyme. *Biophys Chem* **111** (2): 183-9, 2004.

Antczak, C., De Meester, I., and Bauvois, B.: Ectopeptidases in pathophysiology. *Bioessays* **23** (3): 251-60, 2001.

Arnold, D. M., Molinaro, G., Warkentin, T. E., DiTomasso, J., Webert, K. E., Davis, I., Lesiuk, L., Dunn, G., Heddle, N. M., Adam, A., and Blajchman, M. A.: Hypotensive transfusion reactions can occur with blood products that are leukoreduced before storage. *Transfusion* **44** (9): 1361-6, 2004.

Austin, C. E., Faussner, A., Robinson, H. E., Chakravarty, S., Kyle, D. J., Bathon, J. M., and Proud, D.: Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. *J Biol Chem* **272** (17): 11420-5, 1997.

Bachvarov, D. R., Hess, J. F., Menke, J. G., Larrivee, J. F., and Marceau, F.: Structure and genomic organization of the human B1 receptor gene for kinins (BDKRB1). *Genomics* **33** (3): 374-81, 1996.

Bachvarov, D. R., Landry, M., Pelletier, I., Chevrette, M., Betard, C., Houde, I., Bergeron, J., Lebel, M., and Marceau, F.: Characterization of two polymorphic sites in the human kinin B1 receptor gene: altered frequency of an allele in patients with a history of end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* **9** (4): 598-604, 1998.

Barnes, P. J., Baraniuk, J. N., and Belvisi, M. G.: Neuropeptides in the respiratory tract. Part I. *Am Rev Respir Dis* **144** (5): 1187-98, 1991.

Beaubien, G., Rosinski-Chupin, I., Mattei, M. G., Mbikay, M., Chretien, M., and Seidah, N. G.: Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. *Biochemistry* **30** (6): 1628-35, 1991.

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

Blais, C., Jr., Marc-Aurele, J., Simmons, W. H., Loute, G., Thibault, P., Skidgel, R. A., and Adam, A.: Des-Arg9-bradykinin metabolism in patients who presented hypersensitivity reactions during hemodialysis: role of serum ACE and aminopeptidase P. *Peptides* **20** (4): 421-30, 1999.

Blais, C., Jr., Marceau, F., Rouleau, J. L., and Adam, A.: The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides* **21** (12): 1903-40., 2000.

- Blaukat, A., Pizard, A., Rajerison, R. M., Alhenc-Gelas, F., Muller-Esterl, W., and Dikic, I.: Activation of mitogen-activated protein kinase by the bradykinin B2 receptor is independent of receptor phosphorylation and phosphorylation-triggered internalization. *FEBS Lett* **451** (3): 337-41., 1999.
- Bockaert, J., and Pin, J. P.: Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* **18** (7): 1723-9, 1999.
- Boissonnas, R. A., Guttmann, S., Jaquenoud, P. A., Konzett, H., and Stuermer, E.: Synthesis and biological activity of peptides related to bradykinin. *Experientia* **16**: 326, 1960.
- Borson, D. B.: Roles of neutral endopeptidase in airways. *Am J Physiol* **260** (4 Pt 1): L212-25, 1991.
- Bost, K. L., Breeding, S. A., and Pascual, D. W.: Modulation of the mRNAs encoding substance P and its receptor in rat macrophages by LPS. *Reg Immunol* **4** (2): 105-12, 1992.
- Bost, K. L., and Pascual, D. W.: Substance P: a late-acting B lymphocyte differentiation cofactor. *Am J Physiol* **262** (3 Pt 1): C537-45, 1992.
- Bouthillier, J., Deblois, D., and Marceau, F.: Studies on the induction of pharmacological responses to des-Arg⁹- bradykinin in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* **92** (2): 257-64, 1987.
- Busse, R., and Fleming, I.: Molecular responses of endothelial tissue to kinins. *Diabetes* **45 Suppl 1**: S8-13., 1996.
- Cadwell, J., Ruddy, S., Schur, P., and Austen, K.: Acquired C1 inhibitor deficiency in lymphosarcoma. *Clin Immunol Immunopathol* **1**: 39-52, 1972.
- Campbell, D. J.: The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28** (12): 1060-5., 2001.
- Campos, M. M., Souza, G. E., and Calixto, J. B.: Modulation of kinin B1 but not B2 receptors-mediated rat paw edema by IL-1beta and TNFalpha. *Peptides* **19** (7): 1269-76, 1998.
- Caras, I. W., and Weddell, G. N.: Signal peptide for protein secretion directing glycopospholipid membrane anchor attachment. *Science* **243** (4895): 1196-8, 1989.
- Cascieri, M. A., Huang, R. R., Fong, T. M., Cheung, A. H., Sadowski, S., Ber, E., and Strader, C. D.: Determination of the amino acid residues in substance P conferring selectivity and specificity for the rat neurokinin receptors. *Mol Pharmacol* **41** (6): 1096-9, 1992.

Chai, K. X., Ni, A., Wang, D., Ward, D. C., Chao, J., and Chao, L.: Genomic DNA sequence, expression, and chromosomal localization of the human B1 bradykinin receptor gene BDKRB1. *Genomics* **31** (1): 51-7, 1996.

Chang, M. M., and Leeman, S. E.: Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *J Biol Chem* **245** (18): 4784-90, 1970.

Chang, M. M., Leeman, S. E., and Niall, H. D.: Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol* **232** (29): 86-7, 1971.

Chansel, D., Czekalski, S., Vandermeersch, S., Ruffet, E., Fournie-Zaluski, M. C., and Ardaillou, R.: Characterization of angiotensin IV-degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. *Am J Physiol* **275** (4 Pt 2): F535-42, 1998.

Cheung, P. P., Cannizzaro, L. A., and Colman, R. W.: Chromosomal mapping of human kininogen gene (KNG) to 3q26----qter. *Cytogenet Cell Genet* **59** (1): 24-6, 1992.

Chomczynski, P., and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162** (1): 156-9, 1987.

Cicardi, M., Beretta, A., Colombo, M., Gioffre, D., Cugno, M., and Agostoni, A.: Relevance of lymphoproliferative disorders and of anti-C1 inhibitor autoantibodies in acquired angio-oedema. *Clin Exp Immunol* **106** (3): 475-80, 1996.

Cicardi, M., Bergamaschini, L., Marasini, B., Boccassini, G., Tucci, A., and Agostoni, A.: Hereditary angioedema: an appraisal of 104 cases. *Am J Med Sci* **284** (1): 2-9, 1982.

Cicardi, M., Frangi, D., Bergamaschini, L., Gardinali, M., Sacchi, G., and Agostoni, A.: Acquired C1 inhibitor deficiency with angioedema symptoms in a patient infected with *Echinococcus granulosus*. *Complement* **2** (2-3): 133-9, 1985.

Clements, J., Hooper, J., Dong, Y., and Harvey, T.: The expanded human kallikrein (KLK) gene family: genomic organisation, tissue-specific expression and potential functions. *Biol Chem* **382** (1): 5-14., 2001.

Colman, R. W., Jameson, B. A., Lin, Y., Johnson, D., and Mousa, S. A.: Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostat) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. *Blood* **95** (2): 543-50, 2000.

Colman, R. W., Pixley, R. A., Najamunnisa, S., Yan, W., Wang, J., Mazar, A., and McCrae, K. R.: Binding of high molecular weight kininogen to human endothelial cells is mediated via a site within domains 2 and 3 of the urokinase receptor. *J Clin Invest* **100** (6): 1481-7, 1997.

Cottrell, G. S., Hooper, N. M., and Turner, A. J.: Cloning, expression, and characterization of human cytosolic aminopeptidase P: a single manganese(II)-dependent enzyme. *Biochemistry* **39** (49): 15121-8., 2000.

Couture, R., Harrisson, M., Vianna, R. M., and Cloutier, F.: Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* **429** (1-3): 161-76., 2001.

Cuchacovich, M., Gatica, H., Vial, P., Yovanovich, J., Pizzo, S. V., and Gonzalez-Gronow, M.: Streptokinase promotes development of dipeptidyl peptidase IV (CD26) autoantibodies after fibrinolytic therapy in myocardial infarction patients. *Clin Diagn Lab Immunol* **9** (6): 1253-9, 2002.

Cyr, M., Eastlund, T., Blais, C., Jr., Rouleau, J. L., and Adam, A.: Bradykinin metabolism and hypotensive transfusion reactions. *Transfusion* **41** (1): 136-50., 2001.

Cyr, M., Lepage, Y., Blais, C., Jr., Gervais, N., Cugno, M., Rouleau, J. L., and Adam, A.: Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281** (1): H275-83, 2001.

Davis, A. E., 3rd: C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema. *Annu Rev Immunol* **6**: 595-628, 1988.

Davis, A. E., 3rd: The pathophysiology of hereditary angioedema. *Clin Immunol* **114** (1): 3-9, 2005.

De Meester, I., Korom, S., Van Damme, J., and Scharpe, S.: CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today* **20** (8): 367-75, 1999.

de Meester, I., Lambeir, A. M., Proost, P., and Scharpe, S.: Dipeptidyl peptidase IV substrates. An update on in vitro peptide hydrolysis by human DPPIV. *Adv Exp Med Biol* **524**: 3-17, 2003.

de Weerd, W. F., and Leeb-Lundberg, L. M.: Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem* **272** (28): 17858-66, 1997.

deBlois, D., Bouthillier, J., and Marceau, F.: Effect of glucocorticoids, monokines and growth factors on the spontaneously developing responses of the rabbit isolated aorta to des- Arg9-bradykinin. *Br J Pharmacol* **93** (4): 969-77, 1988.

- Deblois, D., Bouthillier, J., and Marceau, F.: Effect of glucocorticoids, monokines and growth factors on the spontaneously developing responses of the rabbit isolated aorta to des-Arg⁹-bradykinin. *Br J Pharmacol* **93** (4): 969-77, 1988.
- deBlois, D., Bouthillier, J., and Marceau, F.: Pharmacological modulation of the up-regulated responses to des-Arg⁹- bradykinin in vivo and in vitro. *Immunopharmacology* **17** (3): 187-98, 1989.
- Decarie, A., Drapeau, G., Closset, J., Couture, R., and Adam, A.: Development of digoxigenin-labeled peptide: application to chemiluminoenzyme immunoassay of bradykinin in inflamed tissues. *Peptides* **15** (3): 511-8, 1994.
- Decarie, A., Raymond, P., Gervais, N., Couture, R., and Adam, A.: Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol* **271** (4 Pt 2): H1340-7, 1996.
- Dehm, P., and Nordwig, A.: The cleavage of prolyl peptides by kidney peptidases. Partial purification of an "X-prolyl-aminopeptidase" from swine kidney microsomes. *Eur J Biochem* **17** (2): 364-71., 1970.
- DeLa Cadena, R. A., and Colman, R. W.: Structure and functions of human kininogens. *Trends Pharmacol Sci* **12** (7): 272-5, 1991.
- Delmas, B., Gelfi, J., Kut, E., Sjostrom, H., Noren, O., and Laude, H.: Determinants essential for the transmissible gastroenteritis virus-receptor interaction reside within a domain of aminopeptidase-N that is distinct from the enzymatic site. *J Virol* **68** (8): 5216-24, 1994.
- Donaldson, V. H., and Evans, R. R.: A Biochemical Abnormality In Hereditary Angioneurotic Edema: Absence Of Serum Inhibitor Of C' 1-Esterase. *Am J Med* **35**: 37-44, 1963.
- Donaldson, V. H., Rosen, F. S., and Bing, D. H.: Role of the second component of complement (C₂) and plasmin in kinin release in hereditary angioneurotic edema (H.A.N.E.) plasma. *Trans Assoc Am Physicians* **90**: 174-83, 1977.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E., and Acton, S.: A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* **87** (5): E1-9, 2000.
- Drouin, J. N., Gaudreau, P., St-Pierre, S., and Regoli, D.: Biological activities of kinins modified at the N- or at the C-terminal end. *Can J Physiol Pharmacol* **57** (9): 1018-23, 1979.

- Drouin, J. N., St-Pierre, S. A., and Regoli, D.: Receptors for bradykinin and kallidin. *Can J Physiol Pharmacol* **57** (4): 375-9, 1979.
- Duan, Q. L., Nikpoor, B., Dube, M. P., Molinaro, G., Meijer, I. A., Dion, P., Rochefort, D., Saint-Onge, J., Flury, L., Brown, N. J., Gainer, J. V., Rouleau, J. L., Agostoni, A., Cugno, M., Simon, P., Clavel, P., Potier, J., Wehbe, B., Benarbia, S., Marc-Aurele, J., Chanard, J., Foroud, T., Adam, A., and Rouleau, G. A.: A variant in XPNPEP2 is associated with angioedema induced by angiotensin I-converting enzyme inhibitors. *Am J Hum Genet* **77** (4): 617-26, 2005.
- Dunn, J. T., Silverberg, M., and Kaplan, A. P.: The cleavage and formation of activated human Hageman factor by autodigestion and by kallikrein. *J Biol Chem* **257** (4): 1779-84, 1982.
- Elliott, D. F., Horton, E. W., and Lewis, G. P.: Actions of pure bradykinin. *J Physiol* **153**: 473-80, 1960.
- Ellis, J. L., and Udem, B. J.: Pharmacology of non-adrenergic, non-cholinergic nerves in airway smooth muscle. *Pulm Pharmacol* **7** (4): 205-23, 1994.
- Emanuelli, C., Grady, E. F., Madeddu, P., Figini, M., Bunnett, N. W., Parisi, D., Regoli, D., and Geppetti, P.: Acute ACE inhibition causes plasma extravasation in mice that is mediated by bradykinin and substance P. *Hypertension* **31** (6): 1299-304, 1998.
- Erdős, E., and Skidgel, R.: Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease. *In* The kinin system, ed. by S. Farmer, pp. 111-141, Academic Press, San Diego, 1997.
- Euler, U. v., and Gaddum, J.: An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* **72**: 74-89, 1931.
- Ewald, D., Pang, I., Sternweis, P., and Miller, R.: Different G protein-mediated coupling of neurotransmitter receptors to Ca²⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neuron* **2** (1185-1193), 1989.
- Faussner, A., Proud, D., Towns, M., and Bathlon, J.: Influence of the cytosolic carboxy termini of B1 and B2 receptors on ligand internalization., International Multidisciplinary Symposium on Peptide Receptor, Montreal, Canada, 1996.
- Fiedler, E., Hellmann, A., Marsch, W., and Helmbold, P.: [Angioedema in hereditary deficiency of complement factor 1 esterase inhibitor and alpha 1-antitrypsin]. *Dtsch Med Wochenschr* **130** (4): 150-2, 2005.

- Fleming, I., Fisslthaler, B., and Busse, R.: Calcium signaling in endothelial cells involves activation of tyrosine kinases and leads to activation of mitogen-activated protein kinases. *Circ Res* **76** (4): 522-9, 1995.
- Fleming, I., Fisslthaler, B., and Busse, R.: Interdependence of calcium signaling and protein tyrosine phosphorylation in human endothelial cells. *J Biol Chem* **271** (18): 11009-15, 1996.
- Fogaca, S. E., Melo, R. L., Pimenta, D. C., Hosoi, K., Juliano, L., and Juliano, M. A.: Differences in substrate and inhibitor sequence specificity of human, mouse and rat tissue kallikreins. *Biochem J* **380** (Pt 3): 775-81, 2004.
- Folks, T. M., Justement, J., Kinter, A., Dinarello, C. A., and Fauci, A. S.: Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line. *Science* **238** (4828): 800-2, 1987.
- Folks, T. M., Justement, J., Kinter, A., Schnittman, S., Orenstein, J., Poli, G., and Fauci, A. S.: Characterization of a promonocyte clone chronically infected with HIV and inducible by 13-phorbol-12-myristate acetate. *J Immunol* **140** (4): 1117-22, 1988.
- Fong, D., Smith, D. I., and Hsieh, W. T.: The human kininogen gene (KNG) mapped to chromosome 3q26-qter by analysis of somatic cell hybrids using the polymerase chain reaction. *Hum Genet* **87** (2): 189-92, 1991.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., and Schioth, H. B.: The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63** (6): 1256-72, 2003.
- Frigas, E.: Angioedema with acquired deficiency of the C1 inhibitor: a constellation of syndromes. *Mayo Clin Proc* **64** (10): 1269-75, 1989.
- Fukasawa, K. M., Fukasawa, K., Sahara, N., Harada, M., Kondo, Y., and Nagatsu, I.: Immunohistochemical localization of dipeptidyl aminopeptidase IV in rat kidney, liver, and salivary glands. *J Histochem Cytochem* **29** (3): 337-43, 1981.
- Furuhashi, M., Mizutani, S., Kurauchi, O., Kasugai, M., Narita, O., and Tomoda, Y.: In vitro degradation of opioid peptides by human placental aminopeptidase M. *Exp Clin Endocrinol* **92** (2): 235-7, 1988.
- Gabra, B. H., Couture, R., and Sirois, P.: [Functional duality of kinin receptors in pathophysiology]. *Med Sci (Paris)* **19** (11): 1101-10, 2003.
- Ganju, P., Davis, A., Patel, S., Nunez, X., and Fox, A.: p38 stress-activated protein kinase inhibitor reverses bradykinin B(1) receptor-mediated

- component of inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* **421** (3): 191-9, 2001.
- Gelfand, J. A., Boss, G. R., Conley, C. L., Reinhart, R., and Frank, M. M.: Acquired C1 esterase inhibitor deficiency and angioedema: a review. *Medicine (Baltimore)* **58** (4): 321-8, 1979.
- Georgiadis, D., Beau, F., Czarny, B., Cotton, J., Yiotakis, A., and Dive, V.: Roles of the two active sites of somatic angiotensin-converting enzyme in the cleavage of angiotensin I and bradykinin: insights from selective inhibitors. *Circ Res* **93** (2): 148-54, 2003.
- Gerard, N. P., Eddy, R. L., Jr., Shows, T. B., and Gerard, C.: The human neurokinin A (substance K) receptor. Molecular cloning of the gene, chromosome localization, and isolation of cDNA from tracheal and gastric tissues. *J Biol Chem* **265** (33): 20455-62, 1990.
- Gigli, I., Mason, J. W., Colman, R. W., and Austen, K. F.: Interaction of plasma kallikrein with the C1 inhibitor. *J Immunol* **104** (3): 574-81., 1970.
- Giros, B., Gros, C., Solhonne, B., and Schwartz, J. C.: Characterization of aminopeptidases responsible for inactivating endogenous (Met⁵)enkephalin in brain slices using peptidase inhibitors and anti-aminopeptidase M antibodies. *Mol Pharmacol* **29** (3): 281-7, 1986.
- Gobeil, F., Neugebauer, W., Filteau, C., Jukic, D., Allogho, S. N., Pheng, L. H., Nguyen-Le, X. K., Blouin, D., and Regoli, D.: Structure-activity studies of B1 receptor-related peptides. Antagonists. *Hypertension* **28** (5): 833-9, 1996.
- Gohla, A., Oftermanns, S., Wilkie, T., and Schultz, G.: Differential involvement of G α 12 and G α 13 in receptor-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* **274**: 17901-17907, 1999.
- Gorrell, M. D., Gysbers, V., and McCaughan, G. W.: CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol* **54** (3): 249-64, 2001.
- Goto, T., and Tanaka, T.: Tachykinins and tachykinin receptors in bone. *Microsc Res Tech* **58** (2): 91-7, 2002.
- Gougat, J., Ferrari, B., Sarran, L., Planchenault, C., Poncelet, M., Maruani, J., Alonso, R., Cudennec, A., Croci, T., Guagnini, F., Urban-Szabo, K., Martinolle, J. P., Soubrie, P., Finance, O., and Le Fur, G.: SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl)amino]-3-(4-[[2R,6S]-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor:

biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* **309** (2): 661-9, 2004.

Greaves, M., and Lawlor, F.: Angioedema: manifestations and management. *J Am Acad Dermatol* **25** (1 Pt 2): 155-61; discussion 161-5, 1991.

Guo, Y. L., and Colman, R. W.: Two faces of high-molecular-weight kininogen (HK) in angiogenesis: bradykinin turns it on and cleaved HK (HKa) turns it off. *J Thromb Haemost* **3** (4): 670-676., 2005.

Gutowski, S., Smrcka, A., Nowak, L., Wu, D., Simon, M., and Sternweis, P.: Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunit attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate hydrolysis by hormones. *J Biol Chem* **266**: 20519-20524, 1991.

Hagaman, J. R., Moyer, J. S., Bachman, E. S., Sibony, M., Magyar, P. L., Welch, J. E., Smithies, O., Krege, J. H., and O'Brien, D. A.: Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (5): 2552-7, 1998.

Harris, M. B., Ju, H., Venema, V. J., Blackstone, M., and Venema, R. C.: Role of heat shock protein 90 in bradykinin-stimulated endothelial nitric oxide release. *Gen Pharmacol* **35** (3): 165-70., 2000.

Hasan, A. A., Cines, D. B., Ngaiza, J. R., Jaffe, E. A., and Schmaier, A. H.: High-molecular-weight kininogen is exclusively membrane bound on endothelial cells to influence activation of vascular endothelium. *Blood* **85** (11): 3134-43., 1995.

Hasan, A. A., Zisman, T., and Schmaier, A. H.: Identification of cytokeratin 1 as a binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (7): 3615-20., 1998.

Hershey, A. D., and Krause, J. E.: Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor. *Science* **247** (4945): 958-62, 1990.

Herwald, H., Dedio, J., Kellner, R., Loos, M., and Muller-Esterl, W.: Isolation and characterization of the kininogen-binding protein p33 from endothelial cells. Identity with the gC1q receptor. *J Biol Chem* **271** (22): 13040-7, 1996.

Herwald, H., Hasan, A. A., Godovac-Zimmermann, J., Schmaier, A. H., and Muller-Esterl, W.: Identification of an endothelial cell binding site on kininogen domain D3. *J Biol Chem* **270** (24): 14634-42, 1995.

Herwald, H., Renne, T., Meijers, J. C., Chung, D. W., Page, J. D., Colman, R. W., and Muller-Esterl, W.: Mapping of the discontinuous kininogen binding

site of prekallikrein. A distal binding segment is located in the heavy chain domain A4. *J Biol Chem* **271** (22): 13061-7., 1996.

Higashiyama, S., Ohkubo, I., Ishiguro, H., Sasaki, M., Matsuda, T., and Nakamura, R.: Heavy chain of human high molecular weight and low molecular weight kininogens binds calcium ion. *Biochemistry* **26** (23): 7450-8, 1987.

Hildebrandt, M., Reutter, W., Arck, P., Rose, M., and Klapp, B. F.: A guardian angel: the involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition and immune defence. *Clin Sci (Lond)* **99** (2): 93-104, 2000.

Ho, W. Z., and Douglas, S. D.: Substance P and neurokinin-1 receptor modulation of HIV. *J Neuroimmunol* **157** (1-2): 48-55, 2004.

Ho, W. Z., Kaufman, D., Uvaydova, M., and Douglas, S. D.: Substance P augments interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha release by human cord blood monocytes and macrophages. *J. Neuroimmunol.* **171**: 73-80, 1996.

Ho, W. Z., Lai, J. P., Zhu, X. H., Uvaydova, M., and Douglas, S. D.: Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol* **159** (11): 5654-60, 1997.

Hock, F. J., Wirth, K., Albus, U., Linz, W., Gerhards, H. J., Wiemer, G., Henke, S., Breipohl, G., Konig, W., Knolle, J., and et al.: Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br J Pharmacol* **102** (3): 769-73., 1991.

Hooper, N. M., and Turner, A. J.: Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. Aminopeptidase P is anchored by a glycosyl-phosphatidylinositol moiety. *FEBS Lett* **229** (2): 340-4., 1988.

Hopkins, B., Powell, S. J., Danks, P., Briggs, I., and Graham, A.: Isolation and characterisation of the human lung NK-1 receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* **180** (2): 1110-7, 1991.

Hubert, C., Houot, A. M., Corvol, P., and Soubrier, F.: Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* **266** (23): 15377-83, 1991.

Inokuchi, J., and Nagamatsu, A.: Tripeptidyl carboxypeptidase activity of kininase II (angiotensin-converting enzyme). *Biochim Biophys Acta* **662** (2): 300-7, 1981.

Jiang, Y. P., Muller-Esterl, W., and Schmaier, A. H.: Domain 3 of kininogens contains a cell-binding site and a site that modifies thrombin activation of platelets. *J Biol Chem* **267** (6): 3712-7, 1992.

Jones, S., Brown, D., Milligan, G., Willer, E., Burckley, N., and Caufield, M.: Bradykinin excites rat sympathetic neurons by inhibition of M current through a mechanism involving B2 receptors and G alpha q11. *Neuron* **14**: 399-405, 1995.

Joos, G. F., Germonpre, P. R., and Pauwels, R. A.: Role of tachykinins in asthma. *Allergy* **55** (4): 321-37, 2000.

Joseph, K., Ghebrehiwet, B., Peerschke, E. I., Reid, K. B., and Kaplan, A. P.: Identification of the zinc-dependent endothelial cell binding protein for high molecular weight kininogen and factor XII: identity with the receptor that binds to the globular "heads" of C1q (gC1q-R). *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (16): 8552-7, 1996.

Ju, H., Venema, V. J., Liang, H., Harris, M. B., Zou, R., and Venema, R. C.: 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. *Biochem J* **351** (Pt 1): 257-64, 2000.

Kaplan, A. P., and Greaves, M. W.: Angioedema. *J Am Acad Dermatol* **53** (3): 373-88; quiz 389-92, 2005.

Kaplan, A. P., Joseph, K., Shibayama, Y., Nakazawa, Y., Ghebrehiwet, B., Reddigari, S., and Silverberg, M.: Bradykinin formation. Plasma and tissue pathways and cellular interactions. *Clin Rev Allergy Immunol* **16** (4): 403-29., 1998.

Kaplan, A. P., Joseph, K., Shibayama, Y., Reddigari, S., Ghebrehiwet, B., and Silverberg, M.: The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation. *Adv Immunol* **66**: 225-72, 1997.

Kaplan, A. P., Joseph, K., and Silverberg, M.: Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol* **109** (2): 195-209, 2002.

Kato, H., Matsumura, Y., and Maeda, H.: Isolation and identification of hydroxyproline analogues of bradykinin in human urine. *FEBS Lett* **232** (1): 252-4, 1988.

Kehlen, A., Lendeckel, U., Dralle, H., Langner, J., and Hoang-Vu, C.: Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in thyroid carcinomas. *Cancer Res* **63** (23): 8500-6, 2003.

- Kellermann, J., Lottspeich, F., Henschen, A., and Muller-Esterl, W.: Completion of the primary structure of human high-molecular-mass kininogen. The amino acid sequence of the entire heavy chain and evidence for its evolution by gene triplication. *Eur J Biochem* **154** (2): 471-8, 1986.
- Kenny, A. J., Booth, A. G., George, S. G., Ingram, J., Kershaw, D., Wood, E. J., and Young, A. R.: Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush-border serine peptidase. *Biochem J* **157** (1): 169-82, 1976.
- Kenny, A. J., Booth, A. G., and Macnair, R. D.: Peptidases of the kidney microvillus membrane. *Acta Biol Med Ger* **36** (11-12): 1575-85, 1977.
- Kettmann, U., Humbel, B., and Holzhausen, H. J.: Ultrastructural localization of dipeptidylpeptidase IV in the glomerulum of the rat kidney. *Acta Histochem* **92** (2): 225-7, 1992.
- Killingsworth, C. R., Shore, S. A., Alessandrini, F., Dey, R. D., and Paulauskis, J. D.: Rat alveolar macrophages express preprotachykinin gene-I mRNA-encoding tachykinins. *Am J Physiol* **273** (5 Pt 1): L1073-81, 1997.
- Kincy-Cain, T., and Bost, K. L.: Substance P-induced IL-12 production by murine macrophages. *J Immunol* **158** (5): 2334-9, 1997.
- Kitamura, N., Kitagawa, H., Fukushima, D., Takagaki, Y., Miyata, T., and Nakanishi, S.: Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J Biol Chem* **260** (14): 8610-7, 1985.
- Lagente, V., and Advenier, C.: Tachykinins and airway function. *Pulm Pharmacol Ther* **11** (5-6): 331-40, 1998.
- Lambeir, A. M., Durinx, C., Scharpe, S., and De Meester, I.: Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci* **40** (3): 209-94, 2003.
- Landerman, N. S., Webster, M. E., Becker, E. L., and Ratcliffe, H. E.: Hereditary angioneurotic edema. II. Deficiency of inhibitor for serum globulin permeability factor and/or plasma kallikrein. *J Allergy* **33**: 330-41, 1962.
- Larrivee, J. F., Bachvarov, D. R., Houle, F., Landry, J., Huot, J., and Marceau, F.: Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. *J Immunol* **160** (3): 1419-26., 1998.
- Larrivee, J. F., Gera, L., Houle, S., Bouthillier, J., Bachvarov, D. R., Stewart, J. M., and Marceau, F.: Non-competitive pharmacological antagonism at the rabbit B(1) receptor. *Br J Pharmacol* **131** (5): 885-92, 2000.

Leeb-Lundberg, L. M., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D. J., and Zuraw, B. L.: International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* **57** (1): 27-77, 2005.

Lembeck, F., Griesbacher, T., Eckhardt, M., Henke, S., Breipohl, G., and Knolle, J.: New, long-acting, potent bradykinin antagonists. *Br J Pharmacol* **102** (2): 297-304, 1991.

Lendeckel, U., Arndt, M., Frank, K., Wex, T., and Ansorge, S.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (review). *Int J Mol Med* **4** (1): 17-27, 1999.

Lendeckel, U., Kahne, T., Riemann, D., Neubert, K., Arndt, M., and Reinhold, D.: Review: the role of membrane peptidases in immune functions. *Adv Exp Med Biol* **477**: 1-24, 2000.

Lendeckel, U., Wex, T., Reinhold, D., Kahne, T., Frank, K., Faust, J., Neubert, K., and Ansorge, S.: Induction of the membrane alanyl aminopeptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation. *Biochem J* **319** (Pt 3): 817-21, 1996.

Levesque, L., Drapeau, G., Grose, J. H., Rioux, F., and Marceau, F.: Vascular mode of action of kinin B1 receptors and development of a cellular model for the investigation of these receptors. *Br J Pharmacol* **109** (4): 1254-62, 1993.

Levesque, L., Larrivee, J. F., Bachvarov, D. R., Rioux, F., Drapeau, G., and Marceau, F.: Regulation of kinin-induced contraction and DNA synthesis by inflammatory cytokines in the smooth muscle of the rabbit aorta. *Br J Pharmacol* **116** (1): 1673-9, 1995.

Levin, Y., Skidgel, R. A., and Erdos, E. G.: Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase i). *Proc Natl Acad Sci U S A* **79** (15): 4618-22, 1982.

Liebmann, C., Graness, A., Ludwing, B., Adomeit, A., Boehmer, A., Boehmer, F., Nurnberg, B., and Wetzker, R.: Dual bradykinin receptor signalling in A431 human epidermoid carcinoma cells; activation of protein kinase C is counteracted by a Gs-mediated stimulation of the cyclic AMP pathway. *Biochem J* **313**: 109-118, 1996.

Lin, Y., Pixley, R. A., and Colman, R. W.: Kinetic analysis of the role of zinc in the interaction of domain 5 of high-molecular weight kininogen (HK) with heparin. *Biochemistry* **39** (17): 5104-10, 2000.

Linder, M., Ewald, D., Miller, R., and Guilman, A.: Purification and characterization of Go alpha and three types of Gi alpha after expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265**: 8243-8251, 1990.

Llorens-Cortes, C.: [Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and angiotensin III: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin secretion]. *C R Seances Soc Biol Fil* **192** (4): 607-18, 1998.

Lojda, Z.: Studies on dipeptidyl(amino)peptidase IV (glycyl-proline naphthylamidase). II. Blood vessels. *Histochemistry* **59** (3): 153-66, 1979.

Longhurst, H. J.: Emergency treatment of acute attacks in hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency: what is the evidence? *Int J Clin Pract* **59** (5): 594-9, 2005.

Lordal, M., Hallgren, A., Nylander, O., and Hellstrom, P. M.: Tachykinins increase vascular permeability in the gastrointestinal tract of the rat. *Acta Physiol Scand* **156** (4): 489-94, 1996.

Lucey, D. R., Novak, J. M., Polonis, V. R., Liu, Y., and Gartner, S.: Characterization of substance P binding to human monocytes/macrophages. *Clin Diagn Lab Immunol* **1** (3): 330-5, 1994.

Lucius, R., Sievers, J., and Mentlein, R.: Enkephalin metabolism by microglial aminopeptidase N (CD13). *J Neurochem* **64** (4): 1841-7, 1995.

Lundberg, J. M.: Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev* **48** (1): 113-78, 1996.

Ma, J. X., Wang, D. Z., Ward, D. C., Chen, L., Dessai, T., Chao, J., and Chao, L.: Structure and chromosomal localization of the gene (BDKRB2) encoding human bradykinin B2 receptor. *Genomics* **23** (2): 362-9, 1994.

Maggi, C. A.: Tachykinin receptors and airway pathophysiology. *Eur Respir J* **6** (5): 735-42, 1993.

Maggi, C. A., Patacchini, R., Rovero, P., and Giachetti, A.: Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J Auton Pharmacol* **13** (1): 23-93, 1993.

Mahabeer, R., and Bhoola, K. D.: Kallikrein and kinin receptor genes. *Pharmacol Ther* **88** (1): 77-89., 2000.

Maier, M., Reissert, G., Jerabek, I., Lottspeich, F., and Binder, B. R.: Identification of [hydroxyproline³]-lysyl-bradykinin released from human kininogens by human urinary kallikrein. *FEBS Lett* **232** (2): 395-8, 1988.

Mandle, R. J., Colman, R. W., and Kaplan, A. P.: Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73** (11): 4179-83., 1976.

- Marceau, F.: Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology* **30** (1): 1-26, 1995.
- Marceau, F.: A possible common pharmacophore in the non-peptide antagonists of the bradykinin B1 receptor. *Trends Pharmacol Sci* **26** (3): 116-8, 2005.
- Marceau, F., Hess, J. F., and Bachvarov, D. R.: The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* **50** (3): 357-86, 1998.
- Marceau, F., and Tremblay, B.: Mitogenic effect of bradykinin and of des-Arg⁹-bradykinin on cultured fibroblasts. *Life Sci* **39** (24): 2351-8, 1986.
- Margolius, H. S.: Kallikreins and kinins. Molecular characteristics and cellular and tissue responses. *Diabetes* **45 Suppl 1**: S14-9., 1996.
- Marin-Castano, M. E., Schanstra, J. P., Neau, E., Praddaude, F., Pecher, C., Ader, J. L., Girolami, J. P., and Bascands, J. L.: Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation* **105** (5): 627-32, 2002.
- Marrero, M. B., Venema, V. J., Ju, H., He, H., Liang, H., Caldwell, R. B., and Venema, R. C.: Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors. *Biochem J* **343 Pt 2**: 335-40., 1999.
- Marriott, I., and Bost, K. L.: Expression of authentic substance P receptors in murine and human dendritic cells. *J Neuroimmunol* **114** (1-2): 131-41, 2001.
- McGillis, J. P., Mitsuhashi, M., and Payan, D. G.: Immunomodulation by tachykinin neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci* **594**: 85-94, 1990.
- McLean, P. G., Perretti, M., and Ahluwalia, A.: Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc Res* **48** (2): 194-210, 2000.
- McMillin, C. R., Saito, H., Ratnoff, O. D., and Walton, A. G.: The secondary structure of human Hageman factor (factor XII) and its alteration by activating agents. *J Clin Invest* **54** (6): 1312-22., 1974.
- Medeiros, R., Cabrini, D. A., Ferreira, J., Fernandes, E. S., Mori, M. A., Pesquero, J. B., Bader, M., Avellar, M. C., Campos, M. M., and Calixto, J. B.: Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein: a critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *Circ Res* **94** (10): 1375-82, 2004.

Melamed, J., Alper, C. A., Cicardi, M., and Rosen, F. S.: The metabolism of C1 inhibitor and C1q in patients with acquired C1-inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol* **77** (2): 322-6, 1986.

Meloni, F. J., and Schmaier, A. H.: Low molecular weight kininogen binds to platelets to modulate thrombin-induced platelet activation. *J Biol Chem* **266** (11): 6786-94, 1991.

Mentzel, S., Dijkman, H. B., Van Son, J. P., Koene, R. A., and Assmann, K. J.: Organ distribution of aminopeptidase A and dipeptidyl peptidase IV in normal mice. *J Histochem Cytochem* **44** (5): 445-61, 1996.

Miller, B. C., Thiele, D. L., Hersh, L. B., and Cottam, G. L.: Methionine enkephalin is hydrolyzed by aminopeptidase N on CD4+ and CD8+ spleen T cells. *Arch Biochem Biophys* **311** (1): 174-9, 1994.

Milligan, G., and Grassie, M. A.: How do G-proteins stay at the plasma membrane? *Essays Biochem* **32**: 49-60, 1997.

Milton, J.: On giant urticaria. *Edinburgh Med J* **22**: 513-526, 1876.

Mizutani, S., Taira, H., Kurauchi, O., Ito, Y., Imaizumi, H., Furuhashi, M., Narita, O., and Tomoda, Y.: Effect of microsomal leucine aminopeptidase from human placenta (microsomal P-LAP) on pressor response to infused angiotensin II (A-II) in rat. *Exp Clin Endocrinol* **90** (2): 206-12, 1987.

Molinaro, G., Carmona, A. K., Juliano, M. A., Juliano, L., Malitskaya, E., Yessine, M. A., Chagnon, M., Lepage, Y., Simmons, W. H., Boileau, G., and Adam, A.: Human recombinant membrane-bound aminopeptidase P: production of a soluble form and characterization using novel, internally quenched fluorescent substrates. *Biochem J* **385** (Pt 2): 389-97, 2005.

Molinaro, G., Cugno, M., Perez, M., Lepage, Y., Gervais, N., Agostoni, A., and Adam, A.: Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor-Associated Angioedema Is Characterized by a Slower Degradation of des-Arginine9-Bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther* **303** (1): 232-237, 2002.

Montiel, J. L., Cornille, F., Roques, B. P., and Noble, F.: Nociceptin/orphanin FQ metabolism: role of aminopeptidase and endopeptidase 24.15. *J Neurochem* **68** (1): 354-61, 1997.

Moore, J., and Pearson, R.: *Kinetics and Mechanisms*, Wiley, Nex York, 1981.

Moreau, M. E., Dubreuil, P., Molinaro, G., Chagnon, M., Muller-Esterl, W., Lepage, Y., Marceau, F., and Adam, A.: Expression of metallopeptidases and kinin receptors in swine oropharyngeal tissues: effects of angiotensin I-

converting enzyme inhibition and inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* **315** (3): 1065-74, 2005.

Moreau, M. E., Dubreuil, P., Molinaro, G., Chagnon, M., Müller-Esterl, W., Lepage, Y., Marceau, F., and Adam, A.: Expression of metallopeptidases and kinin receptors in swine oropharyngeal tissues: effects of ACE inhibition and inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Submitted., 2005.

Moreau, M. E., Garbacki, N., Molinaro, G., Brown, N. J., Marceau, F., and Adam, A.: The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* **99** (1): 6-38, 2005.

Moreaux, B., Nemmar, A., Vincke, G., Halloy, D., Beerens, D., Advenier, C., and Gustin, P.: Role of substance P and tachykinin receptor antagonists in citric acid-induced cough in pigs. *Eur J Pharmacol* **408** (3): 305-12, 2000.

Mori, K., Sakamoto, W., and Nagasawa, S.: Studies on human high molecular weight (HMW) kininogen. III. Cleavage of HMW kininogen by the action of human salivary kallikrein. *J Biochem (Tokyo)* **90** (2): 503-9, 1981.

Motta, G., Rojkaer, R., Hasan, A. A., Cines, D. B., and Schmaier, A. H.: High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: a novel mechanism for contact activation. *Blood* **91** (2): 516-28, 1998.

Müller-Esterl, W., Iwanaga, S., and Nakanishi, S.: Kininogens revisited. *Trends Biochem Sci* **11**: 336-339, 1986.

Muller-Esterl, W., Vohle-Timmermann, M., Boos, B., and Dittman, B.: Purification and properties of human low molecular weight kininogen. *Biochim Biophys Acta* **706** (2): 145-52, 1982.

Nadel, J.: *Modulation of neurogenic inflammation by peptidases*, Dekker, New York, 1994.

Nadel, J. A.: Neutral endopeptidase modulates neurogenic inflammation. *Eur Respir J* **4** (6): 745-54, 1991.

Nadel, J. A., and Borson, D. B.: Modulation of neurogenic inflammation by neutral endopeptidase. *Am Rev Respir Dis* **143** (3 Pt 2): S33-6, 1991.

Nakanishi, S.: Mammalian tachykinin receptors. *Annu Rev Neurosci* **14**: 123-36, 1991.

Neter, J., Wasserman, W., and Kutner, M. H.: *Applied linear statistical models*, Irwing, Chicago, 1996.

- Nishikawa, K., Shibayama, Y., Kuna, P., Calcaterra, E., Kaplan, A. P., and Reddigari, S. R.: Generation of vasoactive peptide bradykinin from human umbilical vein endothelium-bound high molecular weight kininogen by plasma kallikrein. *Blood* **80** (8): 1980-8., 1992.
- Nzeako, U. C., Frigas, E., and Tremaine, W. J.: Hereditary angioedema: a broad review for clinicians. *Arch Intern Med* **161** (20): 2417-29, 2001.
- O'Connor, T. M., O'Connell, J., O'Brien, D. I., Goode, T., Bredin, C. P., and Shanahan, F.: The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* **201** (2): 167-80, 2004.
- Okamoto, H., and Greenbaum, L. M.: Isolation and structure of T-kinin. *Biochem Biophys Res Commun* **112** (2): 701-8, 1983.
- Olsen, J., Cowell, G. M., Konigshofer, E., Danielsen, E. M., Moller, J., Laustsen, L., Hansen, O. C., Welinder, K. G., Engberg, J., Hunziker, W., and et al.: Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. *FEBS Lett* **238** (2): 307-14, 1988.
- Orawski, A. T., and Simmons, W. H.: Purification and properties of membrane-bound aminopeptidase P from rat lung. *Biochemistry* **34** (35): 11227-36., 1995.
- Oshima, G., Hiraga, Y., Shirono, K., Oh-ishi, S., Sakakibara, S., and Kinoshita, T.: Cleavage of des-Arg⁹-bradykinin by angiotensin I-converting enzyme from pig kidney cortex. *Experientia* **41** (3): 325-8, 1985.
- Oshima, G., Kato, J., and Erdos, E. G.: Plasma carboxypeptidase N, subunits and characteristics. *Arch Biochem Biophys* **170** (1): 132-8., 1975.
- Osler, W.: Hereditary angio-neurotic edema. *Am J Med Sci* **95**: 362-367, 1888.
- Otsuka, M., and Yoshioka, K.: Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev* **73** (2): 229-308, 1993.
- Patchett, A. A., and Cordes, E. H.: The design and properties of N-carboxyalkyldipeptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **57**: 1-84, 1985.
- Payan, D. G., Brewster, D. R., Missirian-Bastian, A., and Goetzl, E. J.: Substance P recognition by a subset of human T lymphocytes. *J Clin Invest* **74** (4): 1532-9, 1984.
- Pernow, B.: Substance P. *Pharmacol Rev* **35** (2): 85-141, 1983.

- Pfaffl, M. W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29** (9): e45, 2001.
- Pfleiderer, G., and Celliers, P. G.: [Isolation Of An Aminopeptidase From Kidney Particles.]. *Biochem Z* **339**: 186-9, 1963.
- Piedimonte, G., McDonald, D. M., and Nadel, J. A.: Glucocorticoids inhibit neurogenic plasma extravasation and prevent virus-potentiated extravasation in the rat trachea. *J Clin Invest* **86** (5): 1409-15, 1990.
- Plummer, T. H., Jr., and Hurwitz, M. Y.: Human plasma carboxypeptidase N. Isolation and characterization. *J Biol Chem* **253** (11): 3907-12, 1978.
- Prada, A. E., Zahedi, K., and Davis, A. E., 3rd: Regulation of C1 inhibitor synthesis. *Immunobiology* **199** (2): 377-88, 1998.
- Prado, G. N., Taylor, L., and Polgar, P.: Effects of intracellular tyrosine residue mutation and carboxyl terminus truncation on signal transduction and internalization of the rat bradykinin B2 receptor. *J Biol Chem* **272** (23): 14638-42, 1997.
- Ratnoff, O. D., and Saito, H.: Interactions among Hageman factor, plasma prekallikrein, high molecular weight kininogen, and plasma thromboplastin antecedent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** (2): 958-61., 1979.
- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J.: MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **28** (1): 323-5, 2000.
- Raymond, P., Drapeau, G., Raut, R., Audet, R., Marceau, F., Ong, H., and Adam, A.: Quantification of des-Arg⁹-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation. *J Immunol Methods* **180** (2): 247-57, 1995.
- Reddigari, S. R., Shibayama, Y., Brunnee, T., and Kaplan, A. P.: Human Hageman factor (factor XII) and high molecular weight kininogen compete for the same binding site on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* **268** (16): 11982-7., 1993.
- Regoli, D., and Barabe, J.: Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* **32** (1): 1-46, 1980.
- Regoli, D., Barabe, J., and Park, W. K.: Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can J Physiol Pharmacol* **55** (4): 855-67., 1977.
- Regoli, D., Marceau, F., and Barabe, J.: De novo formation of vascular receptors for bradykinin. *Can J Physiol Pharmacol* **56** (4): 674-7, 1978.

Regoli, D., Nsa Allogho, S., Rizzi, A., and Gobeil, F. J.: Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol* **348** (1): 1-10, 1998.

Regoli, D. C., Marceau, F., and Lavigne, J.: Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol* **71** (1): 105-15, 1981.

Rhaleb, N. E., Gobeil, F., and Regoli, D.: Non-selectivity of new bradykinin antagonists for B1 receptors. *Life Sci* **51** (11): PL125-9, 1992.

Ricciardolo, F. L.: Mechanisms of citric acid-induced bronchoconstriction. *Am J Med* **111 Suppl 8A**: 18S-24S, 2001.

Riemann, D., Kehlen, A., and Langner, J.: CD13--not just a marker in leukemia typing. *Immunol Today* **20** (2): 83-8, 1999.

Ritchie, T. J., Dziadulewicz, E. K., Culshaw, A. J., Muller, W., Burgess, G. M., Bloomfield, G. C., Drake, G. S., Dunstan, A. R., Beattie, D., Hughes, G. A., Ganju, P., McIntyre, P., Bevan, S. J., Davis, C., and Yaqoob, M.: Potent and orally bioavailable non-peptide antagonists at the human bradykinin B(1) receptor based on a 2-alkylamino-5-sulfamoylbenzamide core. *J Med Chem* **47** (19): 4642-4, 2004.

Rizzu, P., and Baldini, A.: Three members of the human cystatin gene superfamily, AHSG, HRG, and KNG, map within one megabase of genomic DNA at 3q27. *Cytogenet Cell Genet* **70** (1-2): 26-8, 1995.

Robertson, M. J., Cunoosamy, M. P., and Clark, K. L.: Effects of peptidase inhibition on angiotensin receptor agonist and antagonist potency in rabbit isolated thoracic aorta. *Br J Pharmacol* **106** (1): 166-72, 1992.

Rosen, F. S., Alper, C. A., Pensky, J., Klemperer, M. R., and Donaldson, V. H.: Genetically determined heterogeneity of the C1 esterase inhibitor in patients with hereditary angioneurotic edema. *J Clin Invest* **50** (10): 2143-9, 1971.

Rosen, F. S., Pensky, J., Donaldson, V., and Charache, P.: Hereditary Angioneurotic Edema: Two Genetic Variants. *Science* **148**: 957-8, 1965.

Sabourin, T., Guay, K., Houle, S., Bouthillier, J., Bachvarov, D. R., Adam, A., and Marceau, F.: Absence of ligand-induced regulation of kinin receptor expression in the rabbit. *Br J Pharmacol* **133** (7): 1154-62, 2001.

Sabourin, T., Morissette, G., Bouthillier, J., Levesque, L., and Marceau, F.: Expression of kinin B(1) receptor in fresh or cultured rabbit aortic smooth muscle: role of NF-kappa B. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283** (1): H227-37, 2002.

- Saito, H.: The "contact system" in health and disease. *Adv Intern Med* **25**: 217-38, 1980.
- Sakamoto, W., Satoh, F., Gotoh, K., and Uehara, S.: Ile-Ser-bradykinin (T-kinin) and Met-Ile-Ser-bradykinin (Met-T-kinin) are released from T-kininogen by an acid proteinase of granulomatous tissues in rats. *FEBS Lett* **219** (2): 437-40, 1987.
- Salvesen, G., Parkes, C., Abrahamson, M., Grubb, A., and Barrett, A. J.: Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. *Biochem J* **234** (2): 429-34, 1986.
- Salvino, J. M., Seoane, P. R., Douty, B. D., Awad, M. M., Dolle, R. E., Houck, W. T., Faunce, D. M., and Sawutz, D. G.: Design of potent non-peptide competitive antagonists of the human bradykinin B2 receptor. *J Med Chem* **36** (17): 2583-4, 1993.
- Schapira, M., Scott, C. F., and Colman, R. W.: Contribution of plasma protease inhibitors to the inactivation of kallikrein in plasma. *J Clin Invest* **69** (2): 462-8, 1982.
- Schmaier, A. H.: Plasma kallikrein/kinin system: a revised hypothesis for its activation and its physiologic contributions. *Curr Opin Hematol* **7** (5): 261-5, 2000.
- Schmaier, A. H., Kuo, A., Lundberg, D., Murray, S., and Cines, D. B.: The expression of high molecular weight kininogen on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* **263** (31): 16327-33, 1988.
- Semple, P. F.: Putative mechanisms of cough after treatment with angiotensin converting enzyme inhibitors. *J Hypertens Suppl* **13** (3): S17-21, 1995.
- Shanahan, F., Denburg, J. A., Fox, J., Bienenstock, J., and Befus, D.: Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release. *J Immunol* **135** (2): 1331-7, 1985.
- Shariat-Madar, Z., Mahdi, F., and Schmaier, A. H.: Mapping binding domains of kininogens on endothelial cell cytokeratin 1. *J Biol Chem* **274** (11): 7137-45, 1999.
- Shipp, M. A., and Look, A. T.: Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* **82** (4): 1052-70, 1993.
- Shore, S. A., Stimler-Gerard, N. P., Coats, S. R., and Drazen, J. M.: Substance P-induced bronchoconstriction in the guinea pig. Enhancement by inhibitors

of neutral metalloendopeptidase and angiotensin-converting enzyme. *Am Rev Respir Dis* **137** (2): 331-6, 1988.

Silva, M. R. E., Beraldo, W., and Rosenfeld, G.: Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* **156**: 261-273, 1949.

Silverberg, M., Nicoll, J. E., and Kaplan, A. P.: The mechanism by which the light chain of cleaved HMW-kininogen augments the activation of prekallikrein, factor XI and Hageman factor. *Thromb Res* **20** (2): 173-89., 1980.

Simmons, W. H., and Orawski, A. T.: Membrane-bound aminopeptidase P from bovine lung. Its purification, properties, and degradation of bradykinin. *J Biol Chem* **267** (7): 4897-903., 1992.

Skeggs, L. T., Jr., Kahn, J. R., and Shumway, N. P.: The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med* **103** (3): 295-9, 1956.

Skidgel, R. A.: Basic carboxypeptidases: regulators of peptide hormone activity. *Trends Pharmacol Sci* **9** (8): 299-304, 1988.

Skidgel, R. A.: Human carboxypeptidase N: lysine carboxypeptidase. *Methods Enzymol* **248**: 653-63, 1995.

Skidgel, R. A., and Erdos, E. G.: Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. *Peptides* **25** (3): 521-5, 2004.

Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G., and Corvol, P.: Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** (24): 9386-90, 1988.

Sprinkle, T. J., Caldwell, C., and Ryan, J. W.: Cloning, chromosomal sublocalization 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. *Arch Biochem Biophys* **378** (1): 51-6., 2000.

Stanisz, A. M., Scicchitano, R., Dazin, P., Bienenstock, J., and Payan, D. G.: Distribution of substance P receptors on murine spleen and Peyer's patch T and B cells. *J Immunol* **139** (3): 749-54, 1987.

Stewart, J. M.: Bradykinin antagonists: development and applications. *Biopolymers* **37** (2): 143-55, 1995.

Su, D. S., Markowitz, M. K., DiPardo, R. M., Murphy, K. L., Harrell, C. M., O'Malley, S. S., Ransom, R. W., Chang, R. S., Ha, S., Hess, F. J., Pettibone, D. J., Mason, G. S., Boyce, S., Freidinger, R. M., and Bock, M. G.: Discovery of a potent, non-peptide bradykinin B1 receptor antagonist. *J Am Chem Soc* **125** (25): 7516-7, 2003.

Sulpizio, A. C., Pullen, M. A., Edwards, R. M., and Brooks, D. P.: The effect of acute angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase 24.11 inhibition on plasma extravasation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **309** (3): 1141-7, 2004.

Szeplaki, G., Varga, L., Osvath, L., Karadi, I., Fust, G., and Farkas, H.: Deep venous thrombosis associated with acquired angioedema type II in a patient heterozygous for the mutation of factor V Leiden: effective treatment and follow-up for four years. *Thromb Haemost* **95** (5): 898-9, 2006.

Tait, J. F., and Fujikawa, K.: Primary structure requirements for the binding of human high molecular weight kininogen to plasma prekallikrein and factor XI. *J Biol Chem* **262** (24): 11651-6, 1987.

Takagaki, Y., Kitamura, N., and Nakanishi, S.: Cloning and sequence analysis of cDNAs for human high molecular weight and low molecular weight prekininogens. Primary structures of two human prekininogens. *J Biol Chem* **260** (14): 8601-9, 1985.

Takahashi, K., Tanaka, A., Hara, M., and Nakanishi, S.: The primary structure and gene organization of human substance P and neuromedin K receptors. *Eur J Biochem* **204** (3): 1025-33, 1992.

Takeda, Y., Chou, K. B., Takeda, J., Sachais, B. S., and Krause, J. E.: Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **179** (3): 1232-40, 1991.

Tankersley, D. L., and Finlayson, J. S.: Kinetics of activation and autoactivation of human factor XII. *Biochemistry* **23** (2): 273-9, 1984.

Thompson, R. E., Mandle, R., Jr., and Kaplan, A. P.: Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J Clin Invest* **60** (6): 1376-80, 1977.

Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., and Turner, A. J.: A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* **275** (43): 33238-43, 2000.

- Turner, A. J., and Hooper, N. M.: The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **23** (4): 177-83., 2002.
- van der Graaf, F., Koedam, J. A., and Bouma, B. N.: Inactivation of kallikrein in human plasma. *J Clin Invest* **71** (1): 149-58, 1983.
- van der Velden, V. H., Wierenga-Wolf, A. F., Adriaansen-Soeting, P. W., Overbeek, S. E., Moller, G. M., Hoogsteden, H. C., and Versnel, M. A.: Expression of aminopeptidase N and dipeptidyl peptidase IV in the healthy and asthmatic bronchus. *Clin Exp Allergy* **28** (1): 110-20, 1998.
- van Iwaarden, F., de Groot, P. G., and Bouma, B. N.: The binding of high molecular weight kininogen to cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* **263** (10): 4698-703, 1988.
- Vanhoof, G., De Meester, I., van Sande, M., Scharpe, S., and Yaron, A.: Distribution of proline-specific aminopeptidases in human tissues and body fluids. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **30** (6): 333-8, 1992.
- Vavrek, R. J., and Stewart, J. M.: Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides* **6** (2): 161-4, 1985.
- Venema, R. C., Ju, H., Zou, R., Venema, V. J., and Ryan, J. W.: Cloning and tissue distribution of human membrane-bound aminopeptidase P. *Biochim Biophys Acta* **1354** (1): 45-8, 1997.
- Waksman, G., Hamel, E., Bouboutou, R., Besselievre, R., Fournie-Zaluski, M. C., and Roques, B. P.: [Regional distribution of enkephalinase in the rat brain by autoradiography]. *C R Acad Sci III* **299** (14): 613-5, 1984.
- Wang, L. H., Ahmad, S., Benter, I. F., Chow, A., Mizutani, S., and Ward, P. E.: Differential processing of substance P and neurokinin A by plasma dipeptidyl(amino)peptidase IV, aminopeptidase M and angiotensin converting enzyme. *Peptides* **12** (6): 1357-64, 1991.
- Webster, M. E., and Pierce, J. V.: The nature of the kallidins released from human plasma by kallikreins and other enzymes. *Ann N Y Acad Sci* **104**: 91-107, 1963.
- Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P., and Clauser, E.: The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J Biol Chem* **266** (14): 9002-8, 1991.
- Weinstock, J. V., Blum, A., Walder, J., and Walder, R.: Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis mansoni produce substance P. *J Immunol* **141** (3): 961-6, 1988.

- Werle, E.: [Plasma-Kinins.]. *Munch Med Wochenschr* **105**: 2486-93, 1963.
- Wiggins, R. C., Bouma, B. N., Cochrane, C. G., and Griffin, J. H.: Role of high-molecular-weight kininogen in surface-binding and activation of coagulation Factor XI and prekallikrein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** (10): 4636-40, 1977.
- Wilk-Balszaczak, M., Gutowski, S., Sternweis, P., and Belardetti, F.: Bradykinin modulate potassium and calcium currents in neuroblastoma hybrid cells via different pertussis toxin-intensitive pathways. *Neuron* **12**: 109-116, 1994.
- Wozniak, A., McLennan, G., Betts, W. H., Murphy, G. A., and Scicchitano, R.: Activation of human neutrophils by substance P: effect on FMLP-stimulated oxidative and arachidonic acid metabolism and on antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Immunology* **68** (3): 359-64, 1989.
- Yamamoto, Y., Kanazawa, H., Shimamura, M., Ueki, M., and Hazato, T.: Inhibitory action of spinorphin, an endogenous regulator of enkephalin-degrading enzymes, on carrageenan-induced polymorphonuclear neutrophil accumulation in mouse air-pouches. *Life Sci* **62** (19): 1767-73, 1998.
- Yang, H. Y., Erdos, E. G., and Levin, Y.: A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta* **214** (2): 374-6, 1970.
- Yang, H. Y., Erdos, E. G., and Levin, Y.: Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme). *J Pharmacol Exp Ther* **177** (1): 291-300, 1971.
- Yang, X., and Polgar, P.: Genomic structure of the human bradykinin B1 receptor gene and preliminary characterization of its regulatory regions. *Biochem Biophys Res Commun* **222** (3): 718-25, 1996.
- Yaron, A., and Mlynar, D.: Aminopeptidase-P. *Biochem Biophys Res Commun* **32** (4): 658-63., 1968.
- Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Cardellicchio, C. B., Shapiro, L. H., Look, A. T., and Holmes, K. V.: Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* **357** (6377): 420-2, 1992.
- Yokosawa, H., Endo, S., Ogura, Y., and Ishii, S.: A new feature of angiotensin-converting enzyme in the brain: hydrolysis of substance P. *Biochem Biophys Res Commun* **116** (2): 735-42, 1983.
- Yusuf, S., Sleight, P., Pogue, J., Bosch, J., Davies, R., and Dagenais, G.: Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on

cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* **342** (3): 145-53, 2000.

Zhao, Y., Qiu, Q., Mahdi, F., Shariat-Madar, Z., Rojkaer, R., and Schmaier, A. H.: Assembly and activation of HK-PK complex on endothelial cells results in bradykinin liberation and NO formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280** (4): H1821-9., 2001.

Zhou, G. X., Chao, L., and Chao, J.: Kallistatin: a novel human tissue kallikrein inhibitor. Purification, characterization, and reactive center sequence. *J Biol Chem* **267** (36): 25873-80, 1992.

Zini, S., Fournie-Zaluski, M. C., Chauvel, E., Roques, B. P., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C.: Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (21): 11968-73, 1996.

Annexe

Conditions du PCR pour les primers de lapin

Primers	GAPDH	B1R	TF	APN
Température d'hybridation	60°C	60°C	62°C	63°C
Temps d'élongation	20 sec	15 sec	10 sec	7sec
Concentration de Mg	2mM	2mM	2mM	2mM
Concentration de primers	0,7µM	0,7µM	1µM	0,5µM
Longueur de l'amplicon	172pb	162pb	180pb	169pb
Tm	60,2°C	59,8°C	60,4°C	59,7°C